L'hologramme situé sur la première de couverture de ce tome et le numéro d'identification EDQM (EPID) ci-dessous vous apportent la garantie que la publication que vous avez achetée bénéficie de la licence officielle de la Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé (EDQM), Strasbourg, France. Pour pouvoir bénéficier de notre support utilisateur ou en cas de doute sur l'authenticité de cette publication, veuillez consulter notre site internet

**http://www.edqm.eu**

pour enregistrer votre copie ou valider le numéro d'identification EPID.

*Imprimé sur papier sans acide par Druckerei C. H. Beck, Nördlingen (Allemagne)*

# PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 7e ÉDITION

## publiée le 15 juillet 2010

remplace la 6e Edition à date du 1er janvier 2011

Les tomes 1 et 2 de cet ouvrage 7.0 constituent la 7e Edition de la Pharmacopée Européenne. Ils seront complétés par des **suppléments non cumulatifs** qui doivent tous être conservés pendant la durée de la 7e Edition. 2 suppléments paraîtront en 2010 et 3 suppléments paraîtront chaque année en 2011 et 2012. Une liste cumulative des réactifs sera publiée dans les suppléments 7.4 et 7.7.

Pour des raisons réglementaires, la date officielle de publication d'un supplément de la Pharmacopée Européenne précède de 6 mois sa date de mise en application. Cependant, il se peut qu'en pratique un supplément soit disponible avant sa date officielle de publication. Veuillez noter que cette disponibilité anticipée ne modifie pas les dates officielles de publication et de mise en application.

Si vous utilisez la 7e Edition après le 1er avril 2011, assurez-vous que vous disposez de tous les suppléments parus et consultez l'index du dernier d'entre eux pour vérifier que vous vous référez aux versions les plus récentes des monographies et chapitres généraux.

Les **archives** de la Pharmacopée Européenne contiennent les 6 premières Editions en format PDF. Elles sont accessibles à tous les abonnés à la Pharmacopée Européenne ayant une souscription à jour (livre, internet ou clé USB) et un code EPID enregistré. Pour y accéder, veuillez enregistrer le code EPID figurant sur la 2e de couverture.

La page d'enregistrement est accessible sur le site internet de la DEQM à http://www.edqm.eu/register.

# PHARMACOPÉE EUROPÉENNE - VERSION ÉLECTRONIQUE

La 7e Edition est également disponible sous forme électronique (internet et clé USB) reprenant tous les textes, monographies et chapitres généraux, publiés dans la version imprimée. Elle fait l'objet d'une mise à jour cumulative à chaque publication d'un supplément.

En plus des textes officiels en anglais et en français, une version des textes en **espagnol** est disponible pour le confort des utilisateurs.

# PHARMEUROPA

## Forum de la Pharmacopée Européenne, à publication trimestrielle

Tous les projets de monographies (nouvelles ou révisées) sont publiés dans Pharmeuropa, ce qui permet à toutes les parties intéressées de commenter les spécifications proposées avant leur adoption. Pharmeuropa contient également des informations relatives au programme de travail et des articles d'intérêt général. L'abonnement à Pharmeuropa peut être souscrit auprès de la DEQM. Il comprend l'abonnement à Pharmeuropa Bio & Scientific Notes (articles scientifiques traitant de sujets en relation avec la pharmacopée). L'ensemble des numéros de Pharmeuropa publiés est aussi accessible en ligne, en tant que service complémentaire aux abonnés à la version imprimée de Pharmeuropa.

# HARMONISATION DES PHARMACOPÉES

Voir informations figurant dans le chapitre *5.8. Harmonisation des pharmacopées*.

# INTERNET

http://www.edqm.eu

http://www.edqm.eu/store (pour prix et commandes)

# HELPDESK

Pour poser une question ou contacter la DEQM, utiliser le système d'aide en ligne Helpdesk qui est accessible sur le site internet de la DEQM (consulter http://www.edqm.eu/site/FAQ_Helpdesk-261.html).

# KNOWLEDGE

Consulter la base de données gratuite Knowledge disponible sur http://www.edqm.eu pour obtenir des informations sur le programme de travail de la Pharmacopée Européenne, les numéros de Pharmeuropa et de suppléments dans lesquels un texte a été publié, des noms de marque de réactifs (notamment colonnes chromatographiques) utilisés lors de l'élaboration des monographies, l'historique des révisions d'un texte depuis sa publication dans la 5e Edition, les chromatogrammes représentatifs, la liste des étalons de référence utilisés et la liste des certificats de conformité délivrés.

# COMBISTATS

CombiStats est un logiciel dédié à l'analyse statistique des résultats de titrages biologiques, conformément au chapitre *5.3* de la 7e Edition de la Pharmacopée Européenne. Pour plus d'informations, consulter http://www.edqm.eu/combistats.

# CLÉ DES MONOGRAPHIES



*Date de version du texte* — **01/2008:0884**

*Numéro de référence du texte*

*Modification à prendre en compte dès la date de publication de l'ouvrage 7.0* — **corrigé 7.0**

## CARBIMAZOL

### Carbimazolum

$C_7H_{10}N_2O_2S$ $M_r$ 186,2

*Numéro CAS* — [22232-54-8]

DÉFINITION

*Dénomination chimique selon les règles de nomenclature IUPAC* — 3-Méthyl-2-thioxo-2,3-dihydro-1*H*-imidazole-1-carboxylate d'éthyle.

*Teneur* : 98,0 pour cent à 102,0 pour cent (substance desséchée).

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre cristalline, blanche ou blanc-jaune.

*Solubilité* : peu soluble dans l'eau, soluble dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 pour cent.

IDENTIFICATION

*L'application de la première et de la seconde identification est définie sous Prescriptions générales (chapitre 1)*

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A, C.*

A. Point de fusion (*2.2.14*) : 122 °C à 125 °C.

B. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*).

*Préparation* : pastilles.

*Comparaison* : *carbimazol SCR.* — *Etalon de référence disponible auprès de la DEQM (voir www.edqm.eu)*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 10 mg de carbimazol dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg de *carbimazol SCR* dans du chlorure de *méthylène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $GF_{254}$ pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acétone R*, *chlorure de méthylène R* (20:80 *V/V*). — *Réactif décrit au chapitre 4*

*Dépôt* : 10 µL.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air pendant 30 min. — *Informations complémentaires disponibles sur www.edqm.eu (KNOWLEDGE)*

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats* : la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à sa position et ses dimensions à la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Substances apparentées**. Chromatographie liquide (*2.2.29*). — *Référence à un chapitre général*

*Solution à examiner.* Dissolvez 5,0 mg de carbimazol dans 10,0 mL d'un mélange de 20 volumes d'*acétonitrile R* et de 80 volumes d'*eau R*. Utilisez cette solution dans les 5 min qui suivent sa préparation.

*Trait dans la marge indiquant la partie du texte qui a été modifiée (modification technique)*

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 5 mg de *thiamazol R* et 0,10 g de *carbimazol SCR* dans un mélange de 20 volumes d'*acétonitrile R* et de 80 volumes d'*eau R*, et complétez à 100,0 mL avec le même mélange de solvants. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec un mélange de 20 volumes d'*acétonitrile R* et de 80 volumes d'*eau R*.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 5,0 mg de *thiamazol R* dans un mélange de 20 volumes d'*acétonitrile R* et de 80 volumes d'*eau R*, et complétez à 10,0 mL avec le même mélange de solvants. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec un mélange de 20 volumes d'*acétonitrile R* et de 80 volumes d'*eau R*.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,15 m, Ø = 3,9 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : *acétonitrile R*, *eau R* (10:90 *V/V*).

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 254 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Enregistrement* : 1,5 fois le temps de rétention du carbimazol.

*Temps de rétention* : carbimazol = environ 6 min.

*Conformité du système* : solution témoin (a) :

– *résolution* : au minimum 5,0 entre les pics dus à l'impureté A et au carbimazol.

*Limites* :

– *impureté A* : au maximum 0,5 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,5 pour cent),
– *impuretés non spécifiées* : pour chaque impureté, au maximum 0,1 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,10 pour cent).

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 0,5 pour cent, déterminé dans un dessiccateur sur du *pentoxyde de diphosphore R* sous une pression ne dépassant pas 0,7 kPa pendant 24 h sur 1,000 g de carbimazol.

**Cendres sulfuriques** (*2.4.14*) : au maximum 0,1 pour cent, déterminé sur 1,0 g de carbimazol.

DOSAGE

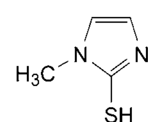
Dissolvez 50,0 mg de carbimazol dans de l'*eau R* et complétez à 500,0 mL avec le même solvant. Prélevez 10,0 mL de solution, ajoutez 10 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) au maximum d'absorption à 291 nm.

Calculez la teneur en $C_7H_{10}N_2O_2S$ en prenant 557 comme valeur de l'absorbance spécifique.

IMPURETÉS

*Impuretés spécifiées : A.*

*Autres impuretés décelables* (si elles sont présentes à une teneur suffisante, les substances suivantes seront détectées par l'un des essais de la monographie. Elles sont limitées par le critère général d'acceptation applicable aux autres impuretés ou impuretés non spécifiées, ou par les dispositions de la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)*. Il n'est donc pas nécessaire de les identifier pour démontrer la conformité de la substance. Voir également chapitre *5.10. Contrôle des impuretés dans les substances pour usage pharmaceutique*) : *B.*




A. 1-méthyl-1*H*-imidazole-2-thiol (thiamazol),

*INFORMATIONS IMPORTANTES*

# MONOGRAPHIES GÉNÉRALES

La Pharmacopée Européenne contient un certain nombre de monographies générales couvrant des classes de produits. Ces monographies générales renferment des exigences qui sont applicables à tous les produits de la classe donnée ou, dans certains cas, à tout produit de la classe donnée pour lequel existe une monographie spécifique dans la Pharmacopée (voir *1. Prescriptions générales*, Monographies générales). Si aucune restriction concernant la portée d'une monographie générale n'est fournie en préambule, elle est applicable à tous les produits de la classe définie, que le produit fasse ou non l'objet d'une monographie spécifique dans la Pharmacopée.

A chaque utilisation d'une monographie, il est essentiel de vérifier s'il existe une monographie générale applicable au produit en question. Les monographies générales présentées ci-après sont publiées dans la section Monographies générales (sauf indication contraire). Cette liste est mise à jour, si nécessaire, et republiée dans chaque supplément.

ADN recombinant (produits obtenus par la méthode dite de l') (0784)

Anticorps monoclonaux pour usage humain (2031)

Drogues végétales (1433)

Drogues végétales pour préparations homéopathiques (2045)
*(publiée dans la section Préparations homéopathiques)*

Extraits (0765)

Formes pharmaceutiques
*(publiées dans la section Formes pharmaceutiques)*

Huiles essentielles (2098)

Huiles grasses végétales (1579)

Immunosérums d'origine animale pour usage humain (0084)

Immunosérums pour usage vétérinaire (0030)

Méthodes de préparation des souches homéopathiques et déconcentration (2371)
*(publiée dans la section Préparations homéopathiques)*

Plantes pour tisanes (1435)

Préparations à base de drogues végétales (1434)

Préparations homéopathiques (1038)
*(publiée dans la section Préparations homéopathiques)*

Préparations radiopharmaceutiques (0125)

Produits allergènes (1063)

Produits comportant un risque de transmission d'agents d'encéphalopathies spongiformes animales (1483)

Produits de fermentation (1468)

Substances pour usage pharmaceutique (2034)

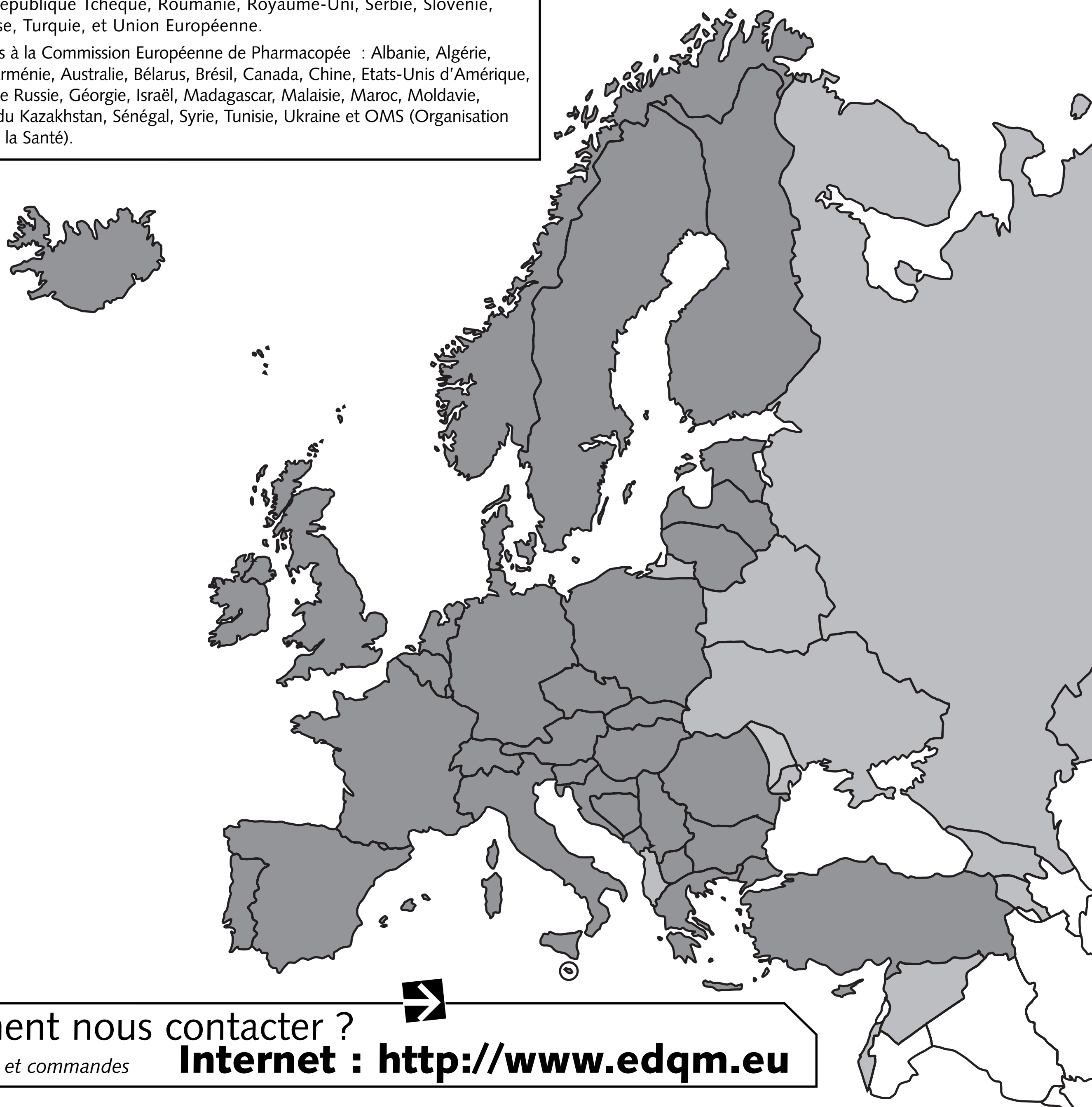
Teintures mères pour préparations homéopathiques (2029)
*(publiée dans la section Préparations homéopathiques)*

Vaccins pour usage humain (0153)

Vaccins pour usage vétérinaire (0062)

Membres de la Commission Européenne de Pharmacopée : Allemagne, Autriche, Belgique, Bosnie-Herzégovine, Bulgarie, Chypre, Croatie, Danemark, Espagne, Estonie, Finlande, France, Grèce, Hongrie, Irlande, Islande, Italie, Lettonie, « l'ex-République yougoslave de Macédoine », Lituanie, Luxembourg, Malte, Monténégro, Norvège, Pays-Bas, Pologne, Portugal, République Slovaque, République Tchèque, Roumanie, Royaume-Uni, Serbie, Slovénie, Suède, Suisse, Turquie, et Union Européenne.

Observateurs à la Commission Européenne de Pharmacopée : Albanie, Algérie, Argentine, Arménie, Australie, Bélarus, Brésil, Canada, Chine, Etats-Unis d'Amérique, Fédération de Russie, Géorgie, Israël, Madagascar, Malaisie, Maroc, Moldavie, République du Kazakhstan, Sénégal, Syrie, Tunisie, Ukraine et OMS (Organisation Mondiale de la Santé).



# Comment nous contacter ?

*Informations et commandes* **Internet : http://www.edqm.eu**

**Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé (DEQM)**
Conseil de l'Europe - 7 allée Kastner
CS 30026, F-67081 STRASBOURG, FRANCE
**Tél:** +33 (0)3 88 41 30 30
**Fax:** +33 (0)3 88 41 27 71

**Correspondance** .......... Via Helpdesk (http://www.edqm.eu/site/FAQ_Helpdesk-521.html)

**Commande**

Publications .......... https://www.edqm.eu/store
Etalons de référence .......... http://www.edqm.eu
Bon de commande en ligne .......... http://www.edqm.eu/site/EDQM_Reference_standards-649.html

Des informations complémentaires, notamment les réponses aux questions les plus fréquemment posées concernant les commandes, sont disponibles via Helpdesk.

**Tout autre sujet** .......... info@edqm.eu

*Tous les étalons de référence nécessaires à l'application des monographies peuvent être obtenus auprès de la DEQM.*
*Un catalogue des étalons de référence disponibles peut être consulté sur le site internet de la DEQM et imprimé directement.*
*La liste des étalons de référence les plus récents (nouveaux étalons de référence et nouveaux lots) est accessible sur le site internet http://crs.edqm.eu, en cliquant sur le lien «new».*

# PHARMACOPÉE EUROPÉENNE

SEPTIÈME ÉDITION

Tome 1

# PHARMACOPÉE EUROPÉENNE

## SEPTIÈME ÉDITION

## Tome 1

*Publiée selon la*
*Convention relative à l'élaboration*
*d'une Pharmacopée Européenne*
*(Série des traités européens, n° 50)*






**Conseil de l'Europe**
Strasbourg

La Pharmacopée Européenne est publiée par la Direction de la Qualité du Médicament & Soins de Santé du Conseil de l'Europe (DEQM).



ISBN 978-92-871-6699-9

# TABLE DES MATIÈRES

## TOME 1



## TOME 2



*Note : la composition de chaque chapitre est indiquée sur la page de séparation.*

# I. PRÉFACE

La Convention relative à l'élaboration d'une Pharmacopée Européenne, signée sous l'égide du Conseil de l'Europe, constitue la base des travaux effectués depuis 1964.

Cette 7e Edition est ainsi publiée peu après le 45e anniversaire de la Pharmacopée Européenne et le 60e anniversaire du Conseil de l'Europe. La publication selon un cycle trisannuel, que complètent chaque année 3 suppléments, s'est révélée être un moyen efficace de diffusion et de mise à jour, quasiment en temps réel, des résultats des travaux de la Commission européenne de Pharmacopée, de ses groupes d'experts et de ses groupes de travail.

Les monographies spécifiques ou générales, et les autres textes de la Pharmacopée auxquels renvoient ces monographies, sont applicables sur le territoire des 37 parties signataires de la Convention, au nombre desquelles compte l'Union Européenne elle-même. La Pharmacopée Européenne, outre son applicabilité dans tous ses Etats membres, occupe donc une place originale dans le contexte réglementaire de l'Union Européenne, où la référence faite à ses textes dans la législation pharmaceutique leur confère un caractère contraignant.

Aux 37 signataires de la Convention de la Pharmacopée Européenne se sont en outre joints de nombreux observateurs (l'Organisation Mondiale de la Santé et 22 pays, dont l'Australie, le Brésil, le Canada, la Chine, la Fédération de Russie et les USA). L'impact des spécifications élaborées par la Pharmacopée Européenne sur la qualité des médicaments et des substances pharmaceutiques s'étend ainsi à une large partie du globe.

La Pharmacopée est publiée en anglais et en français, les 2 langues officielles du Conseil de l'Europe, en version imprimée et en version électronique (la version électronique de la 7e Edition est disponible en ligne et, pour la première fois, sur une clé USB, plus pratique que le support DVD précédemment utilisé). Il est à noter que la traduction de la Pharmacopée dans une autre langue nationale ou régionale, comme l'allemand par exemple, peut être assurée par certains Etats membres.

La 7e Edition entrera en vigueur le 1er janvier 2011, et sera complétée, au cours des 3 années suivantes, par 8 suppléments contenant les textes adoptés lors des sessions de la Commission européenne de Pharmacopée qui se réunit 3 fois par an.

La Commission décide du programme de travail de la Pharmacopée Européenne. Les travaux d'élaboration ou de révision des monographies sont affectés à des groupes d'experts et groupes de travail spécialement constitués dont les membres sont issus d'autorités réglementaires, de laboratoires officiels de contrôle des médicaments, de fabricants pharmaceutiques et chimiques, d'universités ou d'instituts de recherche. Avant adoption et publication dans la Pharmacopée Européenne, toutes les monographies sont vérifiées expérimentalement et soumises à consultation publique par le biais d'une publication dans *Pharmeuropa*, le forum trimestriel de la Direction Européenne de la Qualité du Médicament et Soins de santé (DEQM).

Le nombre croissant des monographies et la nécessité de les maintenir à jour impliquent une augmentation de la charge de travail et un besoin accru en experts ayant accès à des laboratoires d'analyses. Les procédures d'élaboration des monographies sont les suivantes :

– *Procédure 1*, élaboration traditionnelle par un groupe d'experts ou un groupe de travail ;
– *Procédure 2*, adaptation des monographies nationales ;
– *Procédure 3*, s'appliquant à des substances chimiques produites par un seul fabricant et généralement couvertes par un brevet proche de sa date d'expiration ; le fabricant et l'autorité nationale de pharmacopée du pays où est produite la substance se chargent des étapes préliminaires de l'élaboration, et des vérifications expérimentales. Le projet de texte est ensuite examiné par un groupe d'experts ou un groupe de travail et soumis à enquête publique selon la procédure usuelle ;
– *Procédure 4*, version modifiée de la Procédure 3 pour les substances encore couvertes par un brevet, instituée par la Commission en 2002. La Procédure 4 repose sur le travail en collaboration du fabricant de la substance, de la DEQM et d'un groupe de travail composé uniquement de représentants des autorités qui élaborent ensemble un projet de monographie, tandis que les vérifications expérimentales sont effectuées par le laboratoire de la DEQM et/ou par les autorités nationales de pharmacopée ou les laboratoires officiels de contrôle des médicaments, avant la publication pour enquête publique.

Depuis la 6e Edition, l'élaboration des monographies s'effectue de fait selon les Procédures 1 et 4, puisque la Procédure 2 d'adaptation des monographies nationales et la Procédure 3 ont largement porté leurs fruits.

Devant le succès de la Procédure P4 pour les substances chimiques, la Commission a décidé, en 2009, de mettre en œuvre une procédure semblable pour les substances biologiques. Cette procédure, intitulée P4-bio, fait écho à l'augmentation, tant en nombre qu'en importance, des substances actives d'origine biologique et des biosimilaires sur le marché européen.

En 1964, les 8 pays fondateurs de la Convention avaient perçu la nécessité d'harmoniser la fabrication et le contrôle de la qualité des médicaments, à l'échelle européenne, pour protéger la santé publique et faciliter la libre circulation de ces produits. Depuis lors, le monde pharmaceutique est entré dans l'ère de la mondialisation et une évolution logique a conduit à l'harmonisation internationale entre les 3 principales pharmacopées (Pharmacopée Européenne, Pharmacopée Japonaise et Pharmacopée des Etats-Unis d'Amérique). Les activités d'harmonisation entre ces 3 pharmacopées ont débuté en 1989, année de la mise en place du Groupe de Discussion des Pharmacopées (GDP). Les travaux du GDP ont porté sur des monographies d'excipients d'utilisation courante ; le programme de travail en compte actuellement une soixantaine. Peu après le début des travaux du GDP, l'absence de méthodes générales harmonisées s'est avérée constituer un obstacle de taille. Un grand nombre de méthodes générales ont donc été ajoutées au programme de travail, en particulier celles traitées par la Conférence Internationale sur l'Harmonisation (ICH), notamment dans leur guideline ICH Q6A relatif à l'établissement des spécifications. Ces dernières méthodes générales, une fois harmonisées via la procédure du GDP, sont soumises au groupe d'experts Q4B de l'ICH, composé de représentants des autorités réglementaires et de l'industrie des 3 régions de l'ICH (Union Européenne, Japon, Etats-Unis d'Amérique), qui évalue et confirme leur acceptabilité réglementaire. Des informations détaillées sur le programme de travail du GDP sont fournies dans Pharmeuropa et dans le chapitre *5.8*, consacré à l'harmonisation internationale des pharmacopées.

En ce qui concerne la Pharmacopée Européenne, de nombreuses activités ont débuté ces dernières années, comme par exemple un programme spécial de révision des monographies pour mettre à jour l'essai des impuretés dans les monographies anciennes, la création de sections consacrées aux caractéristiques liées à la fonctionnalité pour les excipients, l'élaboration de monographies sur les médicaments traditionnels à base de plantes (notamment les médicaments traditionnels chinois), l'élaboration de monographies et de chapitres relatifs aux médicaments homéopathiques, sur la base

des pharmacopées homéopathiques existant en Europe. Si cette 7e Edition montre l'étendue des progrès accomplis, le travail n'est pas pour autant terminé et doit être poursuivi avec force.

En 2008, l'incident relatif à l'héparine a constitué un défi particulier pour la Commission européenne de Pharmacopée. Les monographies concernées ont dû faire l'objet d'une révision immédiate afin qu'elles puissent contrôler un contaminant introduit de manière illicite en période de pénurie de matière première appropriée. Cet incident a souligné, une fois encore, l'importance et la nécessité du rôle que doit jouer la Pharmacopée dans la lutte contre les falsifications et les contrefaçons. La clé du succès dans cette bataille, qu'aucune des parties concernées ne peut gagner seule, réside dans la participation de tous à une collaboration internationale, multidisciplinaire et multisectorielle.

Au cours des 3 années passées, j'ai eu l'honneur, le plaisir et le privilège de servir la Commission européenne de Pharmacopée en tant que 15e Président élu. Je tiens à remercier tous les membres de la Commission pour leur confiance et leur soutien qui nous ont permis de bien progresser.

Durant cette période, M. Peter Castle, Secrétaire de la Commission, nous a quittés après avoir lutté avec détermination, dignité et un grand courage contre la maladie. Pendant 34 ans, son impact sur le développement et le succès de la Pharmacopée Européenne et sur l'harmonisation internationale aura été significatif. Il nous manque à tous énormément. Ces 3 années ont aussi vu le départ en retraite du Dr Agnès Artiges, première directrice de la DEQM et chef de file de la transformation du Secrétariat technique de la Pharmacopée Européenne en une Direction aux fonctions élargies.

Nous avons aussi pu saluer l'arrivée d'une nouvelle directrice, le Dr Susanne Keitel, ainsi que d'une nouvelle Secrétaire de la Commission, Mme Cathie Vielle.

Je me joins à mes 2 excellents Vice-présidents, le Dr Marianne Ek et le Dr Lee Ged, pour remercier tous les experts impliqués dans le développement de la Pharmacopée Européenne ainsi que le personnel de la DEQM pour son soutien. Leur disponibilité, leurs conseils avisés et leurs contributions de haute qualité ont rendu nos travaux possibles et agréables.

Dr J. Henk J. de Jong

Président de la Commission européenne de Pharmacopée

# II. INTRODUCTION

La Pharmacopée Européenne est élaborée, sous l'égide du Conseil de l'Europe, en application de la Convention relative à l'Elaboration d'une Pharmacopée Européenne (Série des traités européens n° 50) amendée par le Protocole à la Convention (Série des traités européens n° 134) et signée par les Gouvernements d'Autriche, Belgique, Bosnie-Herzégovine, Bulgarie, Croatie, Chypre, République Tchèque, Danemark, Estonie, Finlande, France, Allemagne, Grèce, Hongrie, Islande, Irlande, Italie, Lettonie, Lituanie, Luxembourg, Malte, Monténégro, Pays-Bas, Norvège, Pologne, Portugal, Roumanie, Serbie, République Slovaque, Slovénie, Espagne, Suède, Suisse, « l'ex-République yougoslave de Macédoine », Turquie et Royaume-Uni, ainsi que par l'Union Européenne.

L'élaboration de la Pharmacopée relève de la responsabilité de la Commission Européenne de Pharmacopée (« la Commission »), constituée conformément aux dispositions de l'article 5 de la Convention et composée de délégations nommées par les Parties Contractantes ; chaque délégation comprend au maximum 3 membres choisis pour leur compétence dans les matières relevant des fonctions de la Commission.

Des Observateurs d'états non signataires et d'organisations internationales peuvent assister aux sessions de la Commission, conformément au Règlement Intérieur. Actuellement, des observateurs sont admis de : Albanie, Algérie, Argentine, Arménie, Australie, Bélarus, Brésil, Canada, Chine, Géorgie, Israël, Kazakhstan, Madagascar, Malaisie, Maroc, Moldavie, Fédération Russe, Sénégal, Syrie, Tunisie, Ukraine, Etats-Unis d'Amérique et l'Organisation Mondiale de la Santé.

La Convention est ouverte à la signature par des pays européens et le statut d'observateur peut servir à familiariser avec les méthodes de travail de la Commission les pays européens qui ont l'intention de signer la Convention. La Commission reconnaît que les relations avec les pays en dehors de l'Europe sont essentielles en raison de la mondialisation de la chaîne d'approvisionnement pour les produits pharmaceutiques. Le statut d'observateur pour les pays non européens sert à promouvoir ces relations au niveau réglementaire en facilitant la coopération et l'échange d'informations et de documents de travail.

Les attributions de la Commission sont fixées par les dispositions de l'article 6 de la Convention amendée par le Protocole :

**Article 6**

« Sous réserve des dispositions de l'article 4 de la présente Convention, les attributions de la Commission consisteront :

(a) à déterminer les principes généraux applicables à l'élaboration de la Pharmacopée Européenne,

(b) à décider des méthodes d'analyse y afférentes,

(c) à faire le nécessaire pour la préparation des monographies à inclure dans la Pharmacopée Européenne et à adopter ces monographies,

(d) à recommander la fixation des délais dans lesquels ses décisions d'ordre technique relatives à la Pharmacopée Européenne devront être mises en application sur les territoires des Parties Contractantes. »

Aux termes de la Convention, les Parties Contractantes s'engagent à prendre les mesures nécessaires pour que les monographies de la Pharmacopée Européenne deviennent des normes officielles applicables sur leurs territoires respectifs.

## RÔLE DE LA PHARMACOPÉE EUROPÉENNE

Le rôle de la Pharmacopée Européenne est de participer à la protection de la Santé publique par le biais de l'élaboration de spécifications communes reconnues, destinées à être utilisées par les professionnels de la santé et, de façon générale, par tous ceux que concerne la qualité du médicament. Ces spécifications doivent être appropriées puisqu'elles constituent, pour le patient, l'une des garanties fondamentales en matière de sécurité d'emploi des médicaments. Leur existence :

- facilite la libre circulation des médicaments au sein de l'Europe,
- constitue une garantie de qualité pour les médicaments et leurs constituants importés en ou exportés hors d'Europe.

Les monographies et autres textes de la Pharmacopée Européenne sont élaborés de façon à répondre aux besoins :

- des autorités réglementaires,
- des services chargés du contrôle qualité des médicaments et de leurs constituants,
- des fabricants de matières premières et de médicaments.

La Pharmacopée Européenne est largement utilisée à l'échelle internationale. La Commission souhaite travailler en collaboration étroite avec tous les utilisateurs afin de mieux répondre à leurs besoins et de faciliter leur coopération. A cet effet, elle oeuvre à la mise en place de procédures mieux adaptées, à la fois pour l'organisation de consultations sur les priorités d'élaboration de nouvelles monographies et pour l'amélioration de la qualité de la Pharmacopée Européenne.

## SIÈGE DE LA PHARMACOPEE EUROPÉENNE

Le siège de la Pharmacopée Européenne se trouve à Strasbourg et comporte un Secrétariat scientifique et un Service Publications & Multimédia, ainsi qu'un Laboratoire et une Division des étalons de référence, tous deux notamment chargés, entre autres tâches, de l'établissement, de la production, du suivi de stabilité et de la distribution des étalons de référence nécessaires à l'application des monographies de la Pharmacopée. Ces entités font partie de la Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé (DEQM) du Conseil de l'Europe, laquelle comprend également, entre autres, un Service de la standardisation biologique, du réseau OMCL et des soins de santé, ainsi qu'une Division Certification.

## PRINCIPES GÉNÉRAUX

Les règles générales d'interprétation des textes de la Pharmacopée Européenne sont exposées dans les Prescriptions Générales. Les points suivants méritent également d'être soulignés.

Les principes généraux régissant l'élaboration des monographies de la Pharmacopée Européenne sont définis dans des procédures et des guides techniques, disponibles sur le site internet de la DEQM. Ces principes généraux font l'objet de révisions régulières, sans rétroactivité systématique de sorte que certaines monographies déjà publiées peuvent ne pas être toujours conformes aux recommandations les plus récentes, mais dès qu'un point pouvant avoir un impact sur la santé publique est identifié, les monographies sont révisées.

Il est reconnu que les chapitres généraux sont également utilisés hors du cadre des monographies de la Pharmacopée ; il est dans ce cas recommandé aux utilisateurs de consulter le Guide technique approprié, qui donne des informations détaillées sur l'application de nombreuses méthodes générales.

**Monographies générales et spécifiques**. Les normes de la Pharmacopée Européenne figurent dans des monographies générales et dans des monographies spécifiques. L'élaboration de *monographies générales* s'est développée considérablement depuis quelques années afin de fournir des normes qui atteignent au mieux les buts décrits ci-dessus et servent les besoins des utilisateurs. A partir de la 4e Edition, la portée des monographies générales a été étendue, sauf indication contraire, pour couvrir également les produits pour lesquels une monographie spécifique n'existe pas. En général, il

est maintenant nécessaire de consulter une ou plusieurs monographies générales en même temps qu'une *monographie spécifique*. Lorsqu'une substance est sujette aux dispositions d'une monographie générale et d'une monographie spécifique, les deux sont complémentaires. Une monographie spécifique peut, exceptionnellement, comporter une dérogation à l'une ou l'autre des dispositions de la monographie générale.

Puisqu'en pratique il n'est pas possible d'inclure dans chaque monographie spécifique un renvoi aux monographies générales qui sont applicables ou potentiellement applicables, ces renvois ne sont plus faits sauf s'ils sont nécessaires pour éviter une ambiguïté. Une liste des monographies générales figure dans chaque nouvelle édition et dans chaque supplément afin d'aider les utilisateurs à identifier celles qui doivent être consultées avec une monographie spécifique.

**Expérimentation animale**. Conformément à la *Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques (1986)*, la Commission s'est engagée dans la voie de la réduction de l'emploi d'animaux dans les essais de pharmacopée, chaque fois que possible, et elle encourage tous ceux qui contribuent à ses travaux à chercher des méthodes alternatives ne nécessitant pas l'emploi d'animaux. Un essai sur animaux n'est introduit dans une monographie que lorsqu'il a été démontré qu'il est nécessaire pour un contrôle satisfaisant aux fins de la Pharmacopée.

**Hydrates**. Avec la publication de la 4e Edition, la politique appliquée en matière de titre des monographies de formes hydratées a changé. Dans toutes les monographies publiées pour la première fois dans la 4e Edition et les suivantes, le degré d'hydratation est (le cas échéant) indiqué dans le titre. Dans les éditions précédentes, la politique suivie était de n'indiquer le degré d'hydratation que lorsqu'il existait plusieurs formes hydratées. Si des monographies sont publiées sur la forme anhydre et sur une forme hydratée d'une substance, le mot « anhydre » figurera dans le titre de la monographie de la forme concernée. Pour éviter d'imposer inutilement aux fabricants la lourde charge d'un réétiquetage des produits, il a été décidé de ne pas appliquer rétroactivement cette politique aux monographies déjà publiées, à moins qu'il n'y ait des raisons de penser qu'une telle mesure est justifiée par des considérations de santé publique, notamment vis-à-vis de la sécurité lorsque la substance contient une importante quantité d'eau.

**Substances chirales**. Les monographies de substances chirales décrivant un énantiomère particulier comportent un essai destiné à confirmer la pureté énantiomérique, généralement par mesure du pouvoir rotatoire. Les monographies décrivant des racémates sont, de ce point de vue, hétérogènes en raison des changements de politique successifs qu'a connu la 3e Edition. Les plus anciennes ne comportent pas systématiquement d'essai visant à démontrer le caractère racémique. Au cours de la 3e Edition, des essais de confirmation du caractère racémique par mesure du pouvoir rotatoire ont été introduits dans toutes les monographies nouvelles et révisées de racémates. Lorsqu'il s'est avéré que ces essais, même associés à des limites étroites autour de la rotation nulle, étaient souvent insuffisamment discriminants en raison du faible pouvoir rotatoire spécifique des énantiomères, la Commission a infléchi sa politique. Aujourd'hui, des essais de confirmation du caractère racémique par mesure du pouvoir rotatoire ne sont introduits que lorsque l'on dispose d'informations sur le pouvoir rotatoire spécifique des énantiomères montrant que l'essai sera discriminant en termes de pureté énantiomérique. Si d'autres techniques, telles que le dichroïsme circulaire, permettent d'atteindre l'objectif recherché, elles seront prescrites à la place de la mesure du pouvoir rotatoire.

**Polymorphisme**. Lorsqu'une substance présente le phénomène du polymorphisme, ceci est habituellement indiqué sous Caractères. En règle générale, les monographies ne spécifient pas de forme cristalline particulière. Il peut toutefois arriver, à titre exceptionnel, qu'une monographie porte spécifiquement sur une forme cristalline donnée, et contienne par exemple une identification par spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge où il est spécifié que le spectre doit être enregistré avec la substance à l'état solide, sans recristallisation, la substance chimique de référence (SCR) fournie étant alors de la forme cristalline voulue. Néanmoins, même pour des substances ne relevant pas de ces cas exceptionnels, il est parfois nécessaire, pour leur utilisation dans certaines formes pharmaceutiques, que le fabricant emploie une forme cristalline particulière. L'indication figurant sous Caractères a pour objectif d'alerter les utilisateurs sur la nécessité d'évaluer cet aspect *lors du développement d'une forme pharmaceutique*. Il convient de consulter également à cet égard la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)* et le chapitre général *5.9. Polymorphisme*.

**Spécificité des dosages**. Dans l'élaboration des monographies de substances actives chimiques, l'approche généralement recommandée par la Commission est de permettre un contrôle des impuretés (celles liées au procédé de fabrication et les produits de dégradation) par une section Essai bien conçue, comportant des méthodes indicatives de la stabilité, plutôt que par un dosage spécifique de l'entité active. C'est donc l'ensemble des exigences de la monographie qui permet de vérifier que le produit est de qualité adéquate pendant toute sa période d'utilisation.

**Impuretés**. Suite à une évolution de la politique sur le contrôle des impuretés, un chapitre général *5.10. Contrôle des impuretés dans les substances pour usage pharmaceutique* a été publié dans la 5e Edition. En association avec la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)*, il décrit la politique suivie en matière de contrôle des impuretés dans les monographies spécifiques et fournit des éclaircissements sur la façon d'interpréter les limites spécifiées dans l'essai des substances apparentées.

La politique actuelle de la Commission est d'inclure des essais quantitatifs pour les impuretés dans les monographies. La plupart des monographies plus anciennes, élaborées avant l'adoption de cette politique, ont été révisées pour introduire des méthodes quantitatives. Lorsqu'une monographie n'est pas conforme à la politique générale, la conformité à la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)* implique généralement de compléter la monographie spécifique en conséquence.

Sauf lorsque l'application de la monographie l'exige, auquel cas le nom de l'impureté est suivi de la mention « SCR », les impuretés ne sont pas fournies comme étalons de référence ni ne peuvent être mises à disposition à des fins expérimentales.

**Colonnes chromatographiques**. Dans le but d'aider les utilisateurs, des informations sur les colonnes chromatographiques qui ont été trouvées satisfaisantes pendant l'élaboration des monographies et des méthodes générales sont présentées sur le site internet (voir également « Base de données Knowledge » ci-après). Des informations sur les appareillages et les réactifs sont également indiquées lorsque cela est jugé utile. Ces informations sont données sans garantie et n'impliquent pas que d'autres colonnes, appareillages ou réactifs que ceux indiqués ne conviennent pas.

**Solvants résiduels**. Les exigences relatives aux solvants résiduels figurent dans la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)* ainsi que dans le chapitre général *5.4. Solvants résiduels*. L'ensemble des substances actives et excipients doit donc faire l'objet d'un contrôle approprié des solvants résiduels, même lorsqu'il n'est pas spécifié d'essai dans la monographie spécifique. Les exigences ont été harmonisées avec celles du guideline ICH applicable en la matière.

**Dispositifs médicaux**. La Pharmacopée a toujours contenu, dans toutes ses éditions, des monographies concernant des articles considérés comme dispositifs médicaux. Il existe désormais, pour les Etats membres de l'Union Européenne, une Directive (93/42/CEE) instituant un cadre unifié pour

la normalisation des dispositifs médicaux. Suite à un accord entre les différentes parties concernées, la Commission a décidé que les monographies de dispositifs médicaux seraient supprimées dès que les normes prévues par la Directive auraient été élaborées. Les spécifications de la section relative aux récipients seront modifiées au vu des futures normes élaborées dans le cadre de la Directive. Les monographies relatives aux fils chirurgicaux sont maintenues dans la Pharmacopée mais ont été modifiées pour mise en conformité avec les dispositions de la Directive. Elles sont désormais assimilées à des normes du type prévu par la Directive. Cette adaptation a entraîné la suppression de certaines monographies traitant de types spécifiques de fils chirurgicaux, en faveur d'une approche plus globale.

**Préparations homéopathiques**. Une monographie sur les méthodes de préparation des souches homéopathiques et déconcentration, des monographies générales sur les préparations homéopathiques, les teintures mères pour préparations homéopathiques et les drogues végétales pour préparations homéopathiques, et des monographies spécifiques sur des matières premières et des souches pour préparations homéopathiques sont présentées dans une section séparée de la Pharmacopée Européenne. Il est entendu que lorsque la même substance est utilisée pour des préparations homéopathiques et pour d'autres préparations, la monographie dans le corps principal de la Pharmacopée Européenne s'applique.

**Drogues végétales et préparations à base de drogues végétales (comprenant les médicaments traditionnels chinois)**. Pour la 7e Edition, il a été décidé de regrouper dans une section séparée du tome 1 toutes les monographies relevant de cette catégorie.

**Caractéristiques liées à la fonctionnalité**. Suite à une décision de politique générale de la Commission d'appeler l'attention sur la nécessité de prendre en considération les caractéristiques liées à la fonctionnalité des excipients et d'encourager l'harmonisation des méthodes permettant de les évaluer, une section, à caractère informatif, a été créée dans ces monographies. Le contenu de cette section ne constitue pas des normes obligatoires, mais les caractéristiques peuvent être d'intérêt pour une utilisation spécifique de l'excipient. Les caractéristiques peuvent être présentées de différentes façons :

- en citant uniquement le nom ;
- en citant le nom et une méthode appropriée, de préférence une méthode de la Pharmacopée Européenne ;
- en citant le nom, une méthode appropriée et des valeurs typiques ou des tolérances typiques par rapport à la valeur déclarée ; ces valeurs ou tolérances servent à définir une qualité appropriée d'un excipient destiné à une utilisation spécifique.

Dans tous les cas, la méthode et les critères d'acceptation ne constituent pas des normes obligatoires mais sont donnés à titre d'information. La décision de contrôler une caractéristique liée à la fonctionnalité d'un excipient reste celle du fabricant de médicaments ; elle est prise en tenant compte de la formulation du produit pour lequel l'excipient sera utilisé ; la méthode de vérification, les critères d'acceptation et les tolérances sont déterminés sur une base contractuelle par l'utilisateur et le fournisseur de l'excipient.

Le but de la Commission est de souligner la nécessité de porter une attention aux caractéristiques liées à la fonctionnalité et de promouvoir l'harmonisation des méthodes utilisées pour leur vérification.

**Révision rédactionnelle des monographies**. Depuis la 3e Edition, un nouveau style rédactionnel, amélioré, a été introduit et son utilisation s'est progressivement généralisée à l'élaboration et la révision de toutes les monographies de substances chimiques. Pour la 6e Edition, un grand nombre de monographies de substances chimiques qui étaient encore rédigées dans l'ancien style ont été converties en nouveau style, pour une plus grande uniformité de présentation rédactionnelle. Un nouveau style a également été adopté pour les monographies de vaccins vétérinaires pendant la 5e Edition. Il en va de même, dans la 7e édition, pour les monographies de préparations radiopharmaceutiques et les monographies de récipients et de matériaux utilisés pour leur fabrication. La conversion au nouveau style n'affectant pas le contenu technique des monographies, ces changements rédactionnels ne sont pas signalés par des traits dans la marge.

**Brevets**. La description dans la Pharmacopée Européenne d'un produit sous brevet ne confère en aucun cas à des tiers autres que le titulaire du brevet le droit d'exploiter ce brevet.

**Numéros d'enregistrement du Chemical Abstracts Service (CAS)**. Dans la 6e Edition et dans les cas appropriés, les numéros d'enregistrement CAS ont été indiqués pour information dans les monographies pour faciliter l'accès des utilisateurs à des renseignements utiles. Auparavant ces numéros étaient donnés seulement dans le cas des réactifs, où ils sont utiles pour identifier les fournisseurs. CAS Registry Number® est une marque déposée de l'American Chemical Society.

**Espèces protégées**. Certaines monographies, notamment sur les drogues végétales, peuvent décrire des substances obtenues à partir d'espèces protégées. L'inclusion de ces monographies ne porte pas préjudice aux dispositions visant la protection de ces espèces par le droit national et international.

## MONOGRAPHIES SUR LES PRÉPARATIONS PHARMACEUTIQUES

Selon la politique actuelle de la Commission, des monographies sur les préparations pharmaceutiques ne sont pas élaborées, sauf dans le cas des immunosérums pour usage humain, des immunosérums pour usage vétérinaire, de certaines préparations biologiques telles que les préparations d'insuline, des préparations radiopharmaceutiques, des vaccins pour usage humain et des vaccins pour usage vétérinaire. Cette politique a été décidée puisque :

- les spécifications d'une préparation considérée sont approuvées par l'Autorité compétente à la lumière des données provenant des travaux de développement pharmaceutique et des essais de stabilité ; une spécification unique pour la forme pharmaceutique d'une substance active donnée serait donc inappropriée dans la plupart des cas ;
- les spécifications d'une préparation pharmaceutique dépendent de facteurs liées à la formulation considérée.

L'harmonisation et la standardisation des préparations pharmaceutiques ont été traitées jusqu'ici par l'élaboration de monographies générales sur les formes pharmaceutiques qui décrivent les éléments communs à toutes les préparations répondant à la définition de la monographie et par l'élaboration de méthodes standardisées d'essai applicables aux produits finis. L'inclusion de ces monographies et méthodes générales dans la Pharmacopée Européenne donne une base commune aux autorités compétentes et aux fabricants pour la préparation et l'évaluation des demandes d'autorisation de mise sur le marché.

Les étalons de référence établis pour le dosage des substances actives et des excipients peuvent convenir au dosage des préparations lorsque les conditions indiquées dans le chapitre général *5.12. Etalons de référence* sont remplies.

## PROGRAMME DE TRAVAIL

Le programme de travail (élaboration de nouveaux textes généraux et monographies ou révision des textes existants) est décidé par la Commission lors d'une des trois sessions annuelles. En général, si deux Etats membres expriment le souhait d'élaborer une monographie, la Commission ajoute ce point au programme de travail. Les additions au programme de travail sont publiées sur le site internet de la DEQM et dans *Pharmeuropa*. L'information est également transmise aux associations représentant l'industrie inscrites auprès du Secrétariat et aux contacts de liaison des fabricants. Les parties intéressées sont invitées à contacter le Secrétariat pour les sujets auxquels elles souhaitent participer.

PROCÉDURE DE CERTIFICATION

Une procédure de certification de conformité, visant à établir que la qualité d'une substance provenant d'une source donnée est convenablement contrôlée par la monographie correspondante, a été instituée pour faciliter l'emploi des monographies dans le cadre des demandes d'autorisation de mise sur le marché (voir Résolution AP-CSP (07) 1 du Comité de Santé Publique (Accord partiel) ou toute révision ultérieure, disponible auprès de la DEQM et sur son site internet). Cette procédure s'applique également aux drogues végétales, aux préparations à base de drogues végétales et au risque lié aux encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST). Les certificats de conformité ne sont délivrés par la DEQM que dans le cas des substances produites dans le cadre d'un système de qualité approprié. Cette procédure conduit à la délivrance de certificats sur la base des monographies publiées. Des informations détaillées sur le déroulement de la procédure peuvent être obtenues auprès du Secrétariat ou sur le site internet de la DEQM. Une liste des certificats délivrés mise à jour quotidiennement est consultable sur ce site internet, y compris les certificats annulés ou suspendus.

PUBLICATIONS

La version officielle de la Pharmacopée Européenne est disponible en langue française et en langue anglaise sous la forme d'un ouvrage relié complété par 3 suppléments annuels, ainsi que sous forme électronique (internet et clé USB). Une version électronique en espagnol est disponible pour le confort des utilisateurs hispanophones.

**Archives**. Les archives contiennent les 6 premières éditions de la Pharmacopée Européenne, au format PDF. Elles sont accessibles à tous les abonnés à la Pharmacopée Européenne ayant une souscription à jour (livres, internet et clé USB) et un code EPID enregistré.

**Pharmeuropa**, le forum de la Pharmacopée Européenne, est publié 4 fois par an et constitue un outil pour l'élaboration des monographies et un moyen d'information sur la Pharmacopée et des sujets connexes. *Pharmeuropa Bio & Scientific Notes*, publication indexée par les services bibliographiques, présente des articles scientifiques concernant l'établissement des préparations biologiques de référence, la validation de méthodes biologiques dans le cadre du programme de standardisation biologique de la DEQM, divers aspects de l'analyse pharmaceutique et d'autres sujets d'intérêt pour la Pharmacopée.

**Site internet**. Le site internet de la DEQM fournit des informations sur les activités de la Pharmacopée Européenne et de nombreux autres aspects.

**Base de données Knowledge**. Le site internet de la DEQM donne accès à une base de données contenant différents types d'informations relatives aux monographies et destinées à faciliter leur utilisation :

- colonnes chromatographiques utilisées pendant l'élaboration d'une monographie ;
- fournisseurs de réactifs et d'équipements qui peuvent être difficiles à trouver par certains utilisateurs ;
- statut des monographies (en cours d'élaboration, adoptée, publiée, en cours de révision) ;
- historique des révisions d'une monographie, à partir de la 5e Edition ;
- autres informations utiles.

**HelpDesk**. Les utilisateurs adressent à la DEQM de nombreuses demandes d'informations techniques et autres. Ces demandes sont à soumettre via le HelpDesk du site internet de la DEQM. La DEQM traitera les demandes relatives à l'utilisation des monographies de la Pharmacopée Européenne. Avant de soumettre une demande d'information, les utilisateurs sont invités à consulter la section des questions fréquemment posées (FAQ).

**Mise en application**. La date d'entrée en vigueur des monographies est fixée, sur recommandation de la Commission, par voie de Résolution du Comité européen sur les produits et les soins pharmaceutiques (Accord partiel) du Conseil de l'Europe. Cette date est généralement de 1 an après l'adoption des monographies et d'environ 6 mois après leur publication. Lorsqu'une monographie doit entrer en application avant la prochaine date prévue pour la publication de la Pharmacopée Européenne ou d'un supplément, une Résolution du Comité européen sur les produits et les soins pharmaceutiques reprend dans son intégralité le texte à mettre en application, qui est également publié pour information dans *Pharmeuropa* ainsi que sur le site internet de la DEQM en tant qu'annexe à la Résolution.

**Programme de révision**. Les monographies et autres textes de la Pharmacopée Européenne sont révisés chaque fois que nécessaire sur décision de la Commission. Les propositions de révision sont publiées dans *Pharmeuropa*. Les propositions de révision de monographies peuvent être soumises par une délégation, par le Président de la Commission ou par le président d'un groupe d'experts. Les demandes de révision émanant d'autres parties doivent être soumises via une autorité nationale de pharmacopée d'un Etat membre ou, si ce n'est pas possible, elles doivent être adressées à la DEQM, de préférence via le HelpDesk. Les propositions de révision des monographies doivent être étayées par des données suffisantes justifiant le besoin de révision.

COMBISTATS

Certains essais inclus dans les monographies, notamment des titrages biologiques, nécessitent une analyse statistique des résultats. La DEQM a développé un programme informatique, CombiStats, qui peut servir à l'analyse statistique des résultats des titrages biologiques par dilution. Des informations sur le programme et les conditions d'accès et d'utilisation sont disponibles sur le site internet de la DEQM.

HARMONISATION INTERNATIONALE

La Pharmacopée Européenne s'est engagée, avec la Pharmacopée Japonaise et la Pharmacopée des Etats-Unis, dans un processus d'harmonisation conduit au sein d'une structure informelle, le Groupe de Discussion des Pharmacopées (GDP). Ces activités sont coordonnées avec celles de l'*International Conference on Harmonisation* (ICH). Des informations sur le statut des textes harmonisés figurent dans le chapitre général *5.8. Harmonisation des pharmacopées* et à la page PDG du site internet de la DEQM.

Lorsque les travaux d'harmonisation portent sur un chapitre général, l'objectif est de parvenir à l'interchangeabilité des méthodes et exigences afin que, lorsque la conformité à une exigence est démontrée par la méthode décrite dans l'une des 3 pharmacopées, cela implique que les méthodes des 2 autres pharmacopées auraient donné le même résultat. Lorsque l'ICH s'est prononcée en faveur d'une déclaration officielle d'interchangeabilité, cette indication figure dans le chapitre général *5.8. Harmonisation des pharmacopées*. S'il subsiste des différences résiduelles dans les textes harmonisés, cette information figure également dans ce chapitre général.

Dans le cas de l'harmonisation des monographies, l'objectif est de parvenir à des exigences identiques pour l'ensemble des attributs attachés à un produit. Si certains attributs ne sont pas harmonisés, cette information figure dans le chapitre général *5.8. Harmonisation des pharmacopées*.

# III. COMMISSION EUROPÉENNE DE PHARMACOPÉE

## COMPOSITION DE LA COMMISSION, LISTE DES EXPERTS ET DU SECRÉTARIAT AU 30 NOVEMBRE 2009

### PRÉSIDENT ET VICE-PRÉSIDENTS DE LA COMMISSION

| | | |
|---|---|---|
| Président | Hendrik Jan | DE JONG |
| Vice-Présidents | Marianne | EK |
| | Gerard | LEE |

### MEMBRES DE LA COMMISSION

| | | |
|---|---|---|
| Allemagne | Ulrike | HOLZGRABE |
| | Dietrich | KRÜGER |
| | Detlef | MANNS |
| Autriche | Yvonne | GASPAR |
| | Friedrich | LACKNER |
| | Andreas | MAYRHOFER |
| Belgique | Jos | HOOGMARTENS |
| | Paule | JACQMAIN |
| Bosnie et Herzégovine | Indira | SARKIC |
| Bulgarie | Ljuba | KOSTOVA |
| | Svetla | BOGDANOVA |
| | Svetoslav | BRANCHEV |
| Chypre | Louis | PANAYI |
| Croatie | Ivana | STARESINIC-SERNHORST |
| | Laila | STEFANINI ORESIC |
| Danemark | Steen Honoré | HANSEN |
| | Eva | SANDBERG |
| | Erik | WOLTHERS |
| Espagne | Franco | FERNANDEZ GONZALEZ |
| | Carmen | DE LA MORENA CRIADO |
| | Jordi | RUIZ COMBALIA |
| Estonie | Eveli | KIKAS |
| | Juhan | RUUT |
| « L'ex-République Yougoslave de Macédoine » | Aneta | DIMITROVSKA |
| | Tatjana | PERUSEVSKA |
| Finlande | Eija | PELKONEN |
| | Kaarina | SINIVUO |
| France | An | LE |
| | Patrick | RAMBOURG |
| | Alain | NICOLAS |
| Grèce | Michael A. | KOUPPARIS |
| | Alexandra | TSOKA |
| Hongrie | Hilda | KÖSZEGI-SZALAI |
| | Jozsef J. | LIPTAK |
| Irlande | Michael | MORRIS |
| | Noreen | QUINN |
| | Mirza | CATIBUSIC |
| Islande | G. | BALDURSDOTTIR |
| | Gunnar Thor | GUNNARSSON |
| Italie | Anna Maria | CAPPELLI |
| | Eugenia | COGLIANDRO |
| | Carlo | PINI |
| Lettonie | Ilze | BARENE |
| Lituanie | Roma | MOCKUTE |
| Luxembourg | Jacqueline | GENOUX-HAMES |
| | Jean-Louis | ROBERT |
| Malte | Simon | SERGE |
| | Tonio | CASSAR |
| Monténégro | | |
| Norvège | Gunhild | BRUGAARD |
| Pays-Bas | Dries | DE KASTE |
| | J.W. | DORPEMA |
| | Pieter H. | VREE |
| Pologne | Ewa | LECIEJEWICZ ZIEMECKA |
| | Jan | PACHECKA |
| | Jaroslaw | WALCZAK |
| Portugal | José Manuel | CORREIA NEVES SOUSA LOBO |
| | Domingos | DE CARVALHO FERREIRA |
| | Maria Joao | PORTELA |
| République Slovaque | Marta | BENKOVA |
| | Ruzena | MARTINCOVA |
| | Jozef | SLANY |

| | | |
|---|---|---|
| République Tchèque | Hana | LOMSKA KOUBKOVA |
| | Jiri | PORTYCH |
| | Dana | STARKOVA |
| Roumanie | Daniele | ENACHE |
| Royaume-Uni | Gerard | LEE |
| | V'Iain | FENTON-MAY |
| | A. David | WOOLFSON |
| Serbie | Danica | AGBABA |
| | Marija | MASKOVIC |
| Slovénie | Martina | CVELBAR |
| | Uros | URLEB |
| Suède | Lennart | AKERBLOM |
| | Marianne | EK |
| | Gert | RAGNARSSON |
| Suisse | Lukas | BRUCKNER |
| | Werner | ERNI |
| | Tobias | GOSDSCHAN |
| Turquie | K. Husnu Can | BASER |
| | Ebru | CORA |
| | Mahmut | TOKAC |
| Commission Européenne | | |
| EMA | Riccardo | LUIGETTI |

## MEMBRES SUPPLÉANTS

| | | |
|---|---|---|
| Allemagne | Gerhard | FRANZ |
| | Christel C. | MÜLLER GOYMANN |
| | Rainer | SEITZ |
| Autriche | Johann | KURZ |
| | Christian | NOE |
| | Josef | TRENKER |
| Belgique | Charlotte | AMELOOT |
| | Luc | ANGENOT |
| Bulgarie | Silvia | DIMITONOVA |
| | Beyhan | EROL |
| Danemark | Lone | STENGELSHOEJ OLSEN |
| Estonie | Eveli | KIKAS |
| | Juhan | RUUT |
| Finlande | Hannele | SALOMIES |
| France | Caroline | VILAIN |
| Grèce | Ioanna | CHINOU |
| | Anastasios | MAKRITIS |
| Hongrie | Tamas L. | PAAL |
| | Tamas | NEMETH |
| Irlande | Susann | BRADLEY |
| | Mirza | CATIBUSIC |
| Italie | Claudia | BERNARDINI |
| | Loredana | NICOLETTIVON |
| | Christina | VON HUNOLSTEIN |
| Lituanie | Valdemaras | BRUSOKAS |
| Luxembourg | M. | BACKES-LIES |
| Norvège | Svein Rune | ANDERSEN |
| | Valborg | HOLTEN |
| Pays-Bas | Peter J.M. | JONGEN |
| | Ellen | DE ROOIJ-LAMME |
| | Yolanda | VAN KOOIJ |
| Pologne | Jan | LUDWICKI |
| | Malgorzata | SZNITOWSKA |
| Portugal | Rui | MORGADO |
| République Slovaque | Daniel | GRANCAI |
| | Ladislav | SOVIK |
| République Tchèque | Hana | BIZKOVA |
| | Hana | JUZOVA |
| Royaume-Uni | Alastair | DAVIDSON |
| | Aileen M.T. | LEE |
| | Matilda | VALLENDER |
| Turquie | Halil | AKAR |
| Serbie | Ljiljana | ZIVANOVIC |
| | Stana | MICIC |
| Slovénie | Barbara | RAZINGER-MIHOVEC |
| | Ales | ROTAR |
| Suède | Torbjörn | ARVIDSSON |
| | Eva | LINDBERG |
| Suisse | Karoline | MATHYS BADERTSCHER |
| | Andreas | TRUTE |
| | Uwe | VÖLKER |

## EXPERTS

| | |
|---|---|
| Valter | ACQUATI |
| Vincent | ADAMO |
| Joël | AERTS |
| Neli | AGAPOVA |
| Maqbool | AHMED |
| Jean-Marc | AIACHE |
| Lennart | AKERBLOM |
| Ferhan | AKTAN |
| Concepcion | ALONSO VERDURAS |
| Hans R. | ALTORFER |
| Ahmad | AMINI |

| | |
|---|---|
| Hans Peter | AMSTUTZ |
| Carmen | ANDERS ESCRIVA |
| Svein Rune | ANDERSEN |
| Max | ANDRE |
| Murielle | ANDRÉ |
| Luc | ANGENOT |
| Brigitte | ANLIKER |
| Marie-Christine | ANNEQUIN |
| Gunnar | ANTONI |
| Peter | ANTONOV |
| Sandra | APERS |
| Jean-Charles | ARGOUD |
| Steve | ARKLE |
| Sylvie | ARMEL |
| Rof | ARNDT |
| Beatriz | ARTALAJO |
| Torbjörn | ARVIDSSON |
| Wilfried | ARZ |
| Zsuzanna | AUBEL HAJDU |
| Sylvie | AUDOLY |
| Paolo | AURELI |
| Dieter | BACHMANN |
| Kemal Husnu Can | BASER |
| Rudolf | BAUER |
| Alain | BAYOL |
| Denis | BELLENOT |
| Attilio | BENEDETTO |
| Joep | BERGERS |
| Laure | BERRUEX |
| Agnès | BERTOCCHI |
| Serge | BESSET |
| Bohumir | BIBA |
| Anna | BILIA |
| Anja | BINDER |
| Hanno | BINDER |
| Jean-Pierre | BINDER |
| Mikael | BISRAT |
| Knud Rhyl | BJORNSON |
| Albert | BLARER |
| Elham | BLOUET ABDELHAC |
| Ayse Nur | BOLUKBASI |
| Pierre | BONNET |
| Elena | BOSSU |
| Anna Maria | BRADY |
| James | BRAIN |
| Per O. | BREMER |
| Paul | BREMNER |
| Charlotte | BRENIER MAUREL |
| Adrian Francis | BRISTOW |
| Neville | BROAD |
| Kirsten | BRONNUM-HANSEN |
| Mark | BROUGHTON |
| Lukas | BRUCKNER |
| Peter | BRÜGGER |
| Biancamaria | BRUNO |
| Christian | BUCHHOLZ |
| Graham | BUCKTON |
| Volker | BÜHLER |
| Marian | BUKOVSKY |
| Rosario | BULLIDO |
| Jörg | BUND |
| Roger | BURGENER |
| Kandemir | CANEFE |
| Salvador | CANIGUERAL |
| Patricia | CATALAO |
| Adrian J. | CAWS |
| Richard | CAWTHORNE |
| Rajko | CEBEDZIC |
| Marina | CERQUETTI |
| Sara | CESAR |
| Pierre | CHAMINADE |
| Kelvin | CHAN |
| Xavier | CHENIVESSE |
| Keith | CHIDWICK |
| Maurizio | CIANFRIGLIA |
| Romolo | CICCIARELLI |
| Patrik | CINTHIO |
| Corinne | CIVADE DELAY |
| Joan | CLARAMUNT |
| Harald S. | CONRADT |
| Anne | COOK |
| Stéphane | CORNEN |
| José Manuel | CORREIA NEVES SOUSA LOBO |
| Desmond | CORRIGAN |
| Yves | CORTEZ |
| Martin | CRNUGELJ |
| Catherine | CUMMINS |
| Gérard | DAMIEN |
| Rolf | DANIELS |
| Teresa | DANNERT |
| Alistair G. | DAVIDSON |
| Jacques | DE BEER |
| Josep M. | DE CIURANA I GAY |
| Hendrick Jan | DE JONG |
| Dries | DE KASTE |
| Carmen | DE LA MORENA CRIADO |

| | |
|---|---|
| Ellen | DE ROOIJ-LAMME |
| Berber | DE VRIES |
| Paul | DECLERCK |
| Clemens | DECRISTOFORO |
| Louis H.T. | DEDEREN |
| Joseph | DEMEESTER |
| Jan | DEN HARTIGH |
| S. | DENYER |
| Sven | DEUTSCHMANN |
| Michel | DEVLEESCHOUWER |
| Maria | DO CEU COSTA |
| Johannes | DODT |
| Eric | DOELKER |
| Jean-Michel | DOGNÉ |
| Milada | DOLEZALOVA |
| Thomas | DOLL |
| J.W. | DORPEMA |
| Peter | DÜRR |
| Pierre | DUEZ |
| Erling | EHRIN |
| Marianne | EK |
| Kristina | ERLANDSSON-PERSSON |
| Lina | ERTLE |
| Carmen Andres | ESCRIVA |
| Jean-Pierre | ETCHEGARAY |
| Adrian | EVANS |
| Øystein | EVENSEN |
| Gemma L.M. | FEENSTRA-BIELDERS |
| Rainer | FENDT |
| V'lain | FENTON-MAY |
| Rosella | FERRETTI |
| Celia | FIGUEIREDO |
| Lucy | FINLAY |
| Ton | FÖRCH |
| Lucien | FOSSE |
| Isabelle | FOURASTÉ |
| Peer Lyng | FRANDSEN |
| Bruno | FRANK |
| Gerhard | FRANZ |
| Urban | FREY |
| Gloria | FRUTOS CAVANILLES |
| Pascal | FURRER |
| Rose E. | GAINES DAS |
| Maria Cristina | GALLI |
| Patrizia | GARGANO |
| Olivier | GARINOT |
| Piotr | GARNUSZEK |
| Uwe Michael | GASSER |
| Anne | GAYOT |
| Andrea | GAZZANIGA |
| Christoph | GERBER |
| Philippe | GERVAIS |
| Nicole | GIBELIN |
| Siegfried | GIESS |
| Philippe | GIRARD |
| Tanja | GMEINER STOPAR |
| Chris T. | GODDARD |
| Ulf | GOERANSSON |
| Maria Jesus | GOMEZ MIGUEL |
| Els | GOOSSENS |
| Tobias | GOSDSCHAN |
| Gianluca | GOSTOLI |
| Marcel | GOVERDE |
| Tor | GRABERG |
| Tatjana | GRAFNETTEROVA |
| Norbert | GREIDZIAK |
| Kjell-Olov | GRÖNVIK |
| Emanuel | GUADAGNINO |
| Thorsten | GUMZ |
| Sylvie | GUYOMARD-DEVANLAY |
| Klaus | HABERER |
| Adrian | HAEBERLI |
| Geertrui | HAEST |
| Lilian | HAMILTON |
| Thomas | HÄMMERLE |
| Vagn Neerup | HANDLOS |
| Steen Honoré | HANSEN |
| Kaare | HASLOV |
| Heribert | HÄUSLER |
| Keith | HELLIWELL |
| Bilkis | HENEKA |
| Peter | HENRYS |
| Harm | HERMSEN |
| Rolf | HESSELMANN |
| Tim | HEWINS |
| Sven Erik | HILLVER |
| Dorothee | HIPPE |
| Wolfgang Alexander | HOEPPING |
| Patrick | HOET |
| Oyvind | HOLTE |
| Valborg | HOLTEN |
| Ulrike | HOLZGRABE |
| Ronald | HOOGERBRUGGE |
| Jos | HOOGMARTENS |
| Rodney Lewis | HORDER |
| Jörg | HÖRNSCHEMEYER |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Ernö | HORVATH | Siegfried | KRIMMER |
| Christian G. | HOUGHTON | Thijs | KROON |
| Rolf | HOVIK | Michael | KRÜGER |
| Anthony R. | HUBBARD | Christof | KRUMMEICH |
| Ronny | HUBINETTE | Marina | KUKALJ BANOVIC |
| Peter | HUBRECHTS | Harry V. | KUPPERS |
| Ronny | HÜBINETTE | Francesco | LA TORRE |
| Lars J. | HUSAGER | Friedrich | LACKNER |
| Ales | HUSEK | Reinhard | LAENGER |
| Gérard | HUYGHE | Andreas | LANG |
| Alexandra | INVERNO SAFARA | Reinhard | LANGE |
| Iliana | IONKOVA | Mervi | LANKINEN |
| Miia | JAKAVA-VILJANEN | Maria Grazia | LAVAGGI |
| Hendrik Jan | DE JONG | John | LAVDIOTIS |
| Armand | JANSSEN | An | LE |
| Anna | JELINSKA | Gerard | LEE |
| Thomas | JENSEN | Aileen M.T. | LEE |
| Jorgen Skov | JENSEN | Thomas | LEHMANN |
| Jana | JERABKOVA | Ari | LEHTOLA |
| Christa | JERSCH | Ulla | LENNMARKER |
| Edgar | JOHN | Valérie | LIÈVRE |
| Christopher | JONES | Cornelia | LIPPERHEIDE |
| Peter | JONGEN | Philippe | LOISEAU |
| Mats | JOSEFSON | Silvano | LONARDI |
| Mirjana | JOVANOVIC | Sharon | LONGHURST |
| Imre | KAPUI | Susanna | LOPEZ HERNANDEZ |
| Jan | KARLSEN | Sabina | LORENZ |
| Anders | KARLSSON | Céline | LORTEAU-SOURGEN |
| Petrus | KARSTEN | Patrick | LOUIS |
| Pasi | KAUPPINEN | Janet | LUDERT |
| Hans | KEEGSTRA | Annick | LUDWIG |
| Birgit | KEGEL | Hans-Jürgen | MACHULLA |
| Ernst | KELLER | Bruce | MADSEN |
| Damien | KERLOC'H | Antonio | MAGNI |
| Melanie | KERST | Daniel | MALARME |
| Waltraud | KESSLER | Maciej | MALECKI |
| Renaat | KINGET | Laurent | MALLET |
| Christiane | KIRCHNER | George | MANSVELD |
| Peter | KLEINEBUDDE | Anita | MARIJANIC |
| Bernhard | KLIER | Andreas | MARTI |
| Hector | KNIGHT CASTRO | Barbara | MARTINEZ DE MIGUEL |
| Filiz | KOC | Paula | MARTINHO |
| Armin | KOCH | Alessandro | MARTINI |
| Brigitte | KOPP | Ana Paula | MARTINS |
| Eniko | KOSZEGI | Marija | MASKOVIC |
| Hilda | KÖSZEGI SZALAI | Graça | MATA |
| Jelena | KRAJACIC BUCIC | Jaroslav | MAXA |
| Katjusa | KREFT | Andreas | MAYRHOFER |

| | |
|---|---|
| Marianna | MECHLER BANDER |
| Beat | MEIER |
| Luis Miguel | MEIRINHOS SOARES |
| Matthias Friedrich | MELZIG |
| Monica | MENNET-VON EIFF |
| Jacques | MICHAUD |
| John M. | MIDGLEY |
| Marianne | MIKAELSSON |
| Paola | MINGHETTI |
| Miquel | MIR |
| Monica | MIRANDA |
| Biljana | MIRKOVIC |
| Bojan | MITROVIC |
| My | MOBERG |
| Birthe | MOESGAARD |
| A.C. | MOFFAT |
| Jürgen | MÖLLER-KEMSA |
| Brigitte | MØLLGAARD |
| Manfred | MOOS |
| Marta | MORENO CUARTAS |
| Sylvie | MORGEAUX |
| Michael | MORRIS |
| Carl | MROZ |
| Zenda | MRVOVA |
| Marco Thomas | MÜLLER |
| Christel Charlotte | MÜLLER GOYMANN |
| Michael | MUTZ |
| Pierre | MUTZENHART |
| Gabriel | MUZARD |
| Eva | NADAL ELDUAYEN |
| Paul | NÄTSCHER |
| Peter | NEU |
| Jacqueline | NEVEU |
| Robin A.J. | NICHOLAS |
| Steven C. | NICHOLS |
| Alain | NICOLAS |
| Loredana | NICOLETTI |
| Vittorio | NISTRIO |
| Ute | NORWIG |
| Jochen | NORWIG |
| Micha | NÜBLING |
| Adela | NUNEZ VELAZQUEZ |
| Werner | OBEXER |
| Hok Liang | OEI |
| Rose-Marie | OELANDER |
| Edgar | OHST |
| Bo | OLSSON |
| Didier | ORTELLI |
| Erik | OSTERGAARD |
| Hans Peter | OTTIGER |
| Carsten | OVERBALLE-PETERSEN |
| Inge | OVERBY JENSEN |
| Peter | PALLAS |
| Danuta | PARTYKA |
| Rosemary | PASK-HUGHES |
| Paolo | PASQUALI |
| Stefan | PAUKER |
| Gerhard | PEITHNER |
| Ivan | PENUELAS |
| Isabel | PEREZ GONZALEZ |
| Alain | PETIT |
| Francesco | PETRUCCI |
| Andreas H. | PFENNINGER |
| Roger D. | PICKETT |
| Carlo | PINI |
| Marta | PIPIC KOSANOVIC |
| Bojan | PIRNAT |
| Anja | PISCHTIAK |
| Daniel | PISCITELLO |
| Christelle | PLANTARD |
| Wolfgang | POHLER |
| Bertrand | POIRIER |
| Stephen | POOLE |
| Poly | POPOVA |
| Maria Joao | PORTELA |
| Agustín | PORTELA MOREIRA |
| Juhani | POSTI |
| Martin | PUNZENGRUBER |
| Joaquim | QUEIROGA |
| Joelle | QUETIN-LECLERCQ |
| José Carlos | QUINTELA |
| Gert | RAGNARSSON |
| Alain | RAGON |
| Giuseppe | RAMASCHI |
| Patrick | RAMBOURG |
| Paula | RAMOS MARTINHO FIGUEIREDO |
| Jukka | RANTANEN |
| Klaus | REH |
| Eike | REICH |
| Holger | REIMANN |
| Markus | RICHTER |
| Valérie | RIDOUX |
| Hans Peter | RINIKER |
| Nathalie | RIZZO-PADOIN |
| Jean-Louis | ROBERT |
| Judith | ROS FUENTES |

| | |
|---|---|
| Ute | ROSSKOPF |
| Ales | ROTAR |
| Maria-Sol | RUIZ |
| Torgny | RUNDLÖF |
| Juhan | RUUT |
| Christoph | SAAL |
| Michael | SAENGER |
| Alexandra | SAFARA INVERNO |
| Piero A. | SALVADORI |
| Eva | SANDBERG |
| Monica | SANTIMARIA |
| Olivier | SAPERAS |
| Jeannot | SCHELCHER |
| Roger | SCHIBLI |
| Martin | SCHIESTL |
| Wjatscheslaw F. | SCHILOW |
| Heidemarie | SCHINDL |
| Ernst | SCHLÄFLI |
| Dirk | SCHMALZ |
| Stephan | SCHMIDT |
| Heinz | SCHMITTER |
| Theres | SCHNEIDER |
| Dieter | SCHULZ |
| Harald | SCHULZ |
| Volker | SCHULZE |
| Rüdiger | SCHWETZLER RASCHKE |
| Jean-Marc | SEIGNEURET |
| Rainer | SEITZ |
| Osman | SENER |
| Filiz | SENGUN |
| Dorothea | SESARDIC |
| Ekrem | SEZIK |
| Claudia | SIGNORETTI |
| François | SIMONDET |
| Kaarina | SINIVUO |
| Wenche | SKARE |
| Helena | SKOG |
| Mikael | SKOOG |
| Radek | SLADKOVSKY |
| Jan W.H. | SMEETS |
| Francesco | SOLINAS |
| Stein | SOMMER |
| Robert | SOUSSAIN |
| Margot | SPOHN |
| Ingo | SPREITZER |
| Axel | STAHLBOM |
| Juerg | STALDER |
| Danijela | STANFEL |
| Peter | STJARNKVIST |
| Erich Andreas | STOEGER |
| Borut | STRUKELJ |
| Rainer | SUCHI |
| Lennart | SVENSSON |
| Julianna | SZEMAN |
| Herre | TALSMA |
| Pierre Cyril | TCHORELOFF |
| Robin | THORPE |
| Ingela | THORSON-KAIJA |
| René | THÜRMER |
| Marcos | TIMON JIMENEZ |
| Heinz G. | TÖLLE |
| Carlo | TOMBA |
| Giangiacono | TORRI |
| Daniel | TOUW |
| Piet | TROMMELMANS |
| Catherine | TROUBAT |
| Keith G. | TRUMAN |
| Andrea | TRUTE |
| Michael | TUBBY |
| Michael | TÜRCK |
| Peter | TURECEK |
| Stefan | TYSKI |
| Michel | ULMSCHNEIDER |
| Ana Luisa | URMAL RIBEIRO |
| Miguel Angel | USERA |
| Francesco | VACCARONI |
| Lars | VAELDS FREDERIKSEN |
| Jan M. | VAN DER NAT |
| Willem G. | VAN DER SLUIS |
| Heim | VAN DER VELDE |
| Hans | VAN DOORNE |
| Bernard M. | VAN GENUGTEN |
| A. H. P. | VAN GOMPEL |
| Daniel | VAN GYSEGEM |
| Yolanda | VAN KOOIJ |
| Jos | VAN ROMPAY |
| Paul | VARLEY |
| Markus | VEIT |
| Alfons | VERBRUGGEN |
| Geert | VERDONK |
| Christopher H. | VERMAAT |
| Peep | VESKI |
| Stefan | VIETHS |
| Francesco | VILLA |
| Philippe | VILLATTE |
| Vassilis | VIOLAKIS |

| | |
|---|---|
| Eva | VITKOVA |
| Arnold J. | VLIETINCK |
| George | VOLIKAKIS |
| Marko | VULETIC |
| Imran | VURAL |
| Geneviève | WAETERLOOS |
| Rik | WAGENAAR |
| Mei | WANG |
| Shu-Yuan | WANG-TSCHEN |
| Claude | WASTIEL |
| M. | WEDA |
| Claudia | WEISS |
| Ingrid | WERNER |
| Volker | WESSELY |
| Brian T. | WHITE |
| Maria | WILHELM |
| Maria | WIRZ |
| Bengt | WITTGREN |
| Bernhard | WOLF |
| Erik | WOLTHERS |
| Michel | YERLY |
| Peter | YORK |
| Stephen | YOUNG |
| C.T. | YUEN |
| Pilar | ZAMORANO SANCHEZ |
| Romana | ZELKO |
| Max | ZELLER |
| Jörg | ZESSIN |
| Jürgen | ZIRKEL |
| Gijsbert | ZOMER |

# SECRÉTARIAT DE LA COMMISSION EUROPÉENNE DE PHARMACOPÉE

**Directrice (Direction Européenne de la Qualité du Médicament et Soins de Santé)**

| | |
|---|---|
| Susanne | KEITEL |

**Administrateurs scientifiques (secrétariat technique, laboratoire et standardisation biologique)**

| | |
|---|---|
| Cathie | VIELLE (Secrétaire de la Commission) |
| Andrea | LODI |
| Jean-Marc | SPIESER |
| Stefan | ALMELING |
| Melanie | BALD |
| Anne-Sophie | BOUIN |
| Karl-Heinz | BUCHHEIT |
| Emmanuelle | CHARTON |
| Angèle | COSTANZO |
| Arnold | DAAS |
| Philippe | DURET |
| Anne | GARNIER-POIDEVIN |
| Charlotta | GUSTAFSSON |
| Marie-Laure | HECQUET |
| Sylvina | IOSSIPHOVA |
| Brigitte | JACQUEL |
| Sylvie | JORAJURIA |
| Franck | JUNG |
| Catherine | LANG |
| Isabelle | MERCIER |
| Catherine | MILNE |
| Ellen | PEL |
| Guy | RAUTMANN |
| Ulrich | ROSE |
| Monica | SORINAS JIMENO |
| Laure | TACONET |
| Eriko | TERAO |
| Nataliia | TYKHONENKO |
| Lore | VIGNOLI |
| Matthias | WEBER |
| Michael | WIERER |

**Publication**

| | |
|---|---|
| Claude | COUNE |
| Hans-Joachim | BIGALKE |
| Itziar | DOMEÑO BLAIS |
| Mehrnoosh | ENSAN |
| Fanchon | EZRATI |
| Christopher | JARVIS |
| Catherine | NICOLAS |
| Alice | ROBERTS |
| Sabine | SCHAEFFER |
| Lynne | TOUMASSON |

**Qualité & Environnement**

| | |
|---|---|
| Pierre | LEVEAU |
| Jonna | SUNELL-HUET |

**Traduction**

| | |
|---|---|
| Michelle | BACQUE |
| Benoît | BERNARD |
| Rex | HUISH |

**Relations publiques**

| | |
|---|---|
| Caroline | LARSEN-LE TARNEC |
| Fiona | GILCHRIST |

**Experts consultants**

| | |
|---|---|
| Marie-Thérèse | BALDACINI |
| Armand | BLOMMAERT |
| Raymond | BOUDET-DALBIN |
| Isabelle | FOURASTÉ |

La Commission Européenne de Pharmacopée et la Direction Européenne de la Qualité du Médicament et Soins de Santé remercient également le secrétariat chargé de la réalisation de la publication :

| | |
|---|---|
| Isabelle | BYLINSKI |
| Anne | ESPIN |
| Sandra | FROMWEILER |
| Carole | KNAUP |
| Ioulia | IANKOVA |
| Rahma | OUMILOUD |

# IV. CONTENU DE LA 7e ÉDITION

La 7e Edition comprend l'ensemble des textes publiés dans la 6e Edition, éventuellement révisés ou corrigés, et des nouveaux textes.

Pour l'information des utilisateurs, les listes ci-après ne comprennent que les titres des textes (monographies et chapitres généraux) nouveaux, révisés, corrigés ou supprimés, et des textes dont le titre a été modifié pour la 7e Edition.

Chaque texte (monographie et chapitre général) présente au-dessus de son titre la date de version (par exemple 01/2011 pour un texte nouveau ou révisé pour la 7e Edition), complétée par « corrigé X.X » si une version corrigée de ce texte a été publiée ultérieurement dans le supplément X.X, et le numéro de référence du texte (4 chiffres pour une monographie et 5 chiffres pour un chapitre général). La date de version, éventuellement complétée par « corrigé X.X », permet d'identifier, pour chaque texte, les versions successivement publiées au cours des éditions. A partir de la 7e Edition, si un texte n'a pas été révisé pour une nouvelle édition, il conservera sa date de version publiée dans la précédente édition, pour une meilleure traçabilité. L'ouvrage dans lequel cette version a été publiée pour la 1re fois est indiqué dans la base de données Knowledge, consultable sur le site internet de la DEQM.

Les parties des textes qui ont été révisées ou corrigées sont indiquées par un trait vertical dans la marge et celles qui ont été supprimées sont indiquées par un trait horizontal dans la marge. Ces indications sont toutefois publiées à titre d'information et ne sont pas nécessairement exhaustives ; elles ne constituent pas une partie officielle des textes. Les modifications rédactionnelles ne sont pas signalées.

Les traits dans la marge figurant dans les textes révisés et corrigés de la précédente édition seront systématiquement supprimés à chaque nouvelle édition.

Les corrections indiquées par la mention « corrigé 7.0 » figurant sous la date de version doivent être prises en compte dès la date de publication de cet ouvrage.

Les textes de la Pharmacopée Européenne ont fait l'objet des décisions et modifications systématiques suivantes pour la 7e Edition.

– Les monographies de drogues végétales et les monographies de préparations à base de drogues végétales ont été publiées dans un même chapitre du tome 1.
– Les monographies de drogues végétales concernées seront progressivement révisées pour intégrer la légende des dessins de poudre dans le texte de l'identification B.
– Les informations communes entre les monographies spécifiques d'huiles essentielles et la monographie générale *Huiles essentielles (2098)* ont été supprimées. L'expression des limites de teneurs des composants a été modifiée (« moins de » remplacé par « au maximum »).
– Le nombre de chiffres significatifs pour l'expression des limites a été modifié (notamment dans les essais par spectrométrie d'absorption atomique et par spectrométrie d'émission atomique).
– La référence *2.2.22. Spectrométrie d'émission atomique* sera progressivement remplacée par *2.2.57. Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif*, dans les cas appropriés.
– Les informations figurant dans les tableaux de gradient des chromatographies liquides seront progressivement harmonisées (suppression des informations concernant le retour à la phase initiale dans les conditions usuelles).
– Une référence à la récente méthode H des métaux lourds a été introduite dans les cas appropriés.
– Les formules développées et les nomenclatures des impuretés faisant elles-mêmes l'objet d'une monographie ont été indiquées dans la rubrique de transparence.
– Le symbole « l » de litre a été remplacé par « L ».
– Le radical « sulph » a été remplacé par « sulf » en anglais.
– L'expression « formes pharmaceutiques administrées par voie parentérale » a été remplacée par « préparations parentérales » et l'expression « usage parentéral » a été remplacée par « administration parentérale » dans les cas appropriés.
– La présentation des monographies de matériaux utilisés dans la fabrication des récipients, des monographies de récipients, d'un certain nombre de monographies de préparations radiopharmaceutiques et de quelques autres monographies a été harmonisée par leur conversion dans le nouveau style rédactionnel sans que ceci n'affecte leur contenu technique. La liste des monographies concernées est disponible sur le site internet de la DEQM. Pour les monographies de préparations radiopharmaceutiques, les détails sur la procédure de production, lorsque plusieurs options existent, ont été déplacés de la section Définition dans la base de données Knowledge.

*Aucune copie d'un texte publié dans cette Edition ne sera fournie.*

*Les abonnés à la version en cours de la Pharmacopée Européenne (imprimée ou électronique) ont accès à une version archivée de toutes les éditions précédentes de la Pharmacopée Européenne.*

## NOUVEAUX TEXTES INCLUS DANS LA 7e ÉDITION

*Les textes ci-après paraissent pour la première fois dans la Pharmacopée Européenne et seront mis en application le* ***1er janvier 2011*** *au plus tard.*

### CHAPITRES GÉNÉRAUX

2.2.59. Analyse glycanique des glycoprotéines

2.8.21. Essai des acides aristolochiques dans les drogues végétales

### MONOGRAPHIES

**Préparations radiopharmaceutiques et matières premières pour préparations radiopharmaceutiques**

Fluorure ($^{18}F$) pour radiomarquage, solution de (2390)

**Drogues végétales et préparations à base de drogues végétales**

Astragalus mongholicus (racine d') (2435)

Stéphania (racine de) (2478)

**Monographies**

Amidon hydroxypropylé (2165)

Amidons hydroxyéthylés (1785)

Amylmétacrésol (2405)

Carbone (monoxyde de) (2408)

Cefpodoxime proxétil (2341)

Entacapone (2574)

Lévétiracétam (2535)

Lufénurone anhydre pour usage vétérinaire (2177)

Méropénem trihydraté (2234)

Sucralfate (1796)
Trimébutine (maléate de) (2182)
Valaciclovir (chlorhydrate de) anhydre (1768)
Ziprasidone (chlorhydrate de) monohydraté (2421)

# TEXTES RÉVISÉS POUR LA 7e ÉDITION

*Les textes ci-après ont fait l'objet d'une révision d'ordre technique depuis leur dernière publication. Ils seront mis en application le* ***1er janvier 2011****, sauf mention contraire en note de bas de page.*

**CHAPITRES GÉNÉRAUX**

2.5.24. Dioxyde de carbone dans les gaz
2.5.25. Monoxyde de carbone dans les gaz
2.5.35. Protoxyde d'azote dans les gaz
2.6.16. Essai des agents étrangers dans les vaccins viraux pour usage humain
2.6.27. Contrôle microbiologique des produits cellulaires
2.7.14. Titrage de l'activité du vaccin de l'hépatite A
5.1.2. Indicateurs biologiques de stérilisation
5.1.3. Efficacité de la conservation antimicrobienne
5.1.4. Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles
5.2.3. Substrats cellulaires utilisés pour la production de vaccins pour usage humain
5.8. Harmonisation des pharmacopées

**MONOGRAPHIES**

**Vaccins pour usage humain**

Vaccin rougeoleux, des oreillons, rubéoleux et varicelleux, vivant (2442)
Vaccin varicelleux vivant (0648)

**Préparations radiopharmaceutiques et matières premières pour préparations radiopharmaceutiques**

Tétra-*O*-acétyl-mannose (triflate de) pour préparations radiopharmaceutiques (2294)

**Drogues végétales et préparations à base de drogues végétales**

Aigremoine (1587)
Angélique (racine d') (1857)
Artichaut (feuille d') (1866)
Bouillon blanc (fleur de) (1853)
Coquelicot (pétales de) (1881)
Gingembre (1522)
Ginkgo (feuille de) (1828)
Hamamélis (feuille d') (0909)
Harpagophyton (racine d') (1095)
Houblon (cône de) (1222)
Hydrastis (1831)
Mauve (fleur de) (1541)
Mélisse (feuille de) (1447)
Menthe poivrée (feuille de) (0406)
Origan (1880)
Ortie (feuille d') (1897)
Petit houx (1847)
Piment de Cayenne (1859)
Pissenlit (racine de) (1852)
Quinquina (0174)
Réglisse (extrait fluide éthanolique titré de) (1536)
Souci (1297)

**Préparations homéopathiques**

Préparations homéopathiques (1038)
Méthodes de préparation des souches homéopathiques et déconcentration (2371)

**Monographies**

Acétylsalicylique (acide) (0309)
Aciclovir (0968)
Aluminium (oxyde d') hydraté (0311)
Ambroxol (chlorhydrate d') (1489)
Aminoglutéthimide (1291)
Antithrombine III humaine (concentré d') (0878)
Aprotinine (0580)
Aprotinine (solution concentrée d') (0579)
Ascorbate sodique (1791)
Ascorbique (acide) (0253)
Azithromycine (1649)
Bénazépril (chlorhydrate de) (2388)
Buflomédil (chlorhydrate de) (1398)
Calcium (acétate de) (2128)
Captopril (1079)
Carraghénanes (2138)
Chlorocrésol (0384)
Chymotrypsine (0476)
Cladribine (2174)
Clébopride (malate de) (1303)
Complexe prothrombique humain (0554)
Codéine (phosphate de) hémihydraté (0074)
Danaparoïde sodique (2090)
Facteur VII de coagulation humain (1224)
Facteur IX de coagulation humain (1223)
Facteur XI de coagulation humain (1644)
Facteur Willebrand humain (2298)
Fibrinogène humain (0024)
Flucytosine (0766)
Fluoxétine (chlorhydrate de) (1104)
Fluspirilène (1723)
Fosfomycine calcique (1328)
Fosinopril sodique (1751)
Ganciclovir (1752)
Glycérol (monocaprylocaprate de) (2392)
Gonadotropine chorionique (0498)
Héparine calcique (0332)[(1)]
Héparine sodique (0333)[(1)]
Hydrocortisone (0335)
Immunoglobuline humaine normale (0338)
Insuline humaine (0838)
Ioxaglique (acide) (2009)
Isoprénaline (chlorhydrate d') (1332)
Isotrétinoïne (1019)
Itraconazole (1335)
Lévodropropizine (1535)
Lisinopril dihydraté (1120)
Méclozine (dichlorhydrate de) (0622)
Méthylphénobarbital (0189)

(1) Ce texte a été mis en application le 1er août 2010.

Nicotinique (acide) (0459)
Nimésulide (1548)
Ofloxacine (1455)
Oméprazole sodique (132)
Pancréas (poudre de) (0350)
Phentolamine (mésilate de) (1138)
Phloroglucinol anhydre (2301)
Phloroglucinol dihydraté (2302)
Plasma humain (mélange de) traité pour viro-inactivation (1646)
Poisson (huile de) riche en acides oméga-3 (1912)
Polysorbate 80 (0428)
Propyle (parahydroxybenzoate de) sodique (1263)
Protamine (chlorhydrate de) (0686)
Protamine (sulfate de) (0569)
Rispéridone (1559)
Salbutamol (0529)
Sertraline (chlorhydrate de) (1705)
Silice colloïdale anhydre (0434)
Silice hydrophobe colloïdale (2208)
Silice pour usage dentaire (1562)
Sodium (hyaluronate de) (1472)
Sodium (lactate de), solution de (1151)
Solutions pour dialyse péritonéale (0862)
Solutions pour hémodialyse (0128)
Solutions pour hémofiltration et pour hémodiafiltration (0861)
Somatostatine (0949)
Spironolactone (0688)
Sulfinpyrazone (0790)
Talc (0438)
Timolol (maléate de) (0572)
Titane (dioxyde de) (0150)
α-Tocophéryle (concentrat d'acétate d'), forme pulvérulente (0691)
Tolbutamide (0304)
Trétinoïne (0693)
Triflusal (1377)
Tropicamide (1159)
Trypsine (0694)
Zolpidem (tartrate de) (1280)

# TEXTES CORRIGÉS POUR LA 7^e^ ÉDITION

*Les textes de la 6^e^ Edition ci-après ont été corrigés. Ils comportent l'information « corrigé 7.0 » au dessus de leur titre. Ces corrections sont à prendre en compte dès la date de publication de la 7^e^ Edition (**15 juillet 2010**).*

## CHAPITRES GÉNÉRAUX

1. Prescriptions générales
2.4.15. Nickel dans les polyols
2.6.14. Essai des endotoxines bactériennes
2.7.2. Titrage microbiologique des antibiotiques
2.7.30. Dosage de la protéine C humaine
3.1.1.1. Matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) plastifié pour récipients destinés à contenir le sang humain et les produits du sang
3.1.1.2. Matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) plastifié pour tubulures utilisées dans les nécessaires pour transfusion du sang et des composants sanguins
3.1.3. Polyoléfines
3.1.5. Polyéthylène avec additifs pour récipients destinés aux préparations parentérales et aux préparations ophtalmiques
3.1.6. Polypropylène pour récipients et fermetures destinés aux préparations parentérales et aux préparations ophtalmiques
3.1.10. Matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) non plastifié pour conditionnement des solutions aqueuses non injectables
3.1.11. Matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) non plastifié pour conditionnement de formes pharmaceutiques sèches pour administration par voie orale
3.1.14. Matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) plastifié pour récipients destinés à contenir les solutions aqueuses pour perfusion intraveineuse
3.1.15. Poly(téréphtalate d'éthylène) pour récipients pour préparations à usage non parentéral
3.2.9. Fermetures en caoutchouc pour récipients destinés aux préparations parentérales aqueuses, aux poudres et aux poudres cryodesséchées

## MONOGRAPHIES

**Vaccins pour usage vétérinaire**

Vaccin vivant de la parvovirose canine (0964)
Vaccin vivant sporulé de la fièvre charbonneuse pour usage vétérinaire (0441)

**Préparations radiopharmaceutiques et matières premières pour préparations radiopharmaceutiques**

Ammoniaque ($^{13}N$) (solution injectable d') (1492)
Chrome ($^{51}Cr$) (édétate de), solution injectable d' (0266)
Cyanocobalamine ($^{57}Co$) (capsules de) (0710)
Cyanocobalamine ($^{57}Co$) (solution de) (0269)
Cyanocobalamine ($^{58}Co$) (capsules de) (1505)
Cyanocobalamine ($^{58}Co$) (solution de) (0270)
Eau ($^{15}O$) injectable (1582)
Eau tritiée ($^{3}H$) (solution injectable d') (0112)
Fludésoxyglucose ($^{18}F$) (solution injectable de) (1325)
Gallium ($^{67}Ga$) (citrate de), solution injectable de (0555)
Indium ($^{111}In$) (chlorure d'), solution de (1227)
Indium ($^{111}In$) (pentétate d'), solution injectable de (0670)
Iobenguane ($^{123}I$) (solution injectable d') (1113)
Iobenguane ($^{131}I$) (solution injectable d') à usage diagnostique (1111)
Iobenguane ($^{131}I$) (solution injectable d') à usage thérapeutique (1112)
Iodométhylnorcholestérol ($^{131}I$) (solution injectable d') (0939)
Oxine indiée ($^{111}In$) (solution d') (1109)
Sodium (chromate ($^{51}Cr$) de), solution stérile de (0279)
Sodium (iodohippurate ($^{123}I$) de), solution injectable d' (0564)
Sodium (iodohippurate ($^{131}I$) de), solution injectable d' (0282)
Sodium (pertechnétate ($^{99m}Tc$) de, non obtenu par fission), solution injectable de (0283)
Sodium (pertechnétate ($^{99m}Tc$) de, obtenu par fission), solution injectable de (0124)
Sodium (phosphate ($^{32}P$) de), solution injectable de (0284)
Strontium ($^{89}Sr$) (chlorure de), solution injectable de (1475)

Epinastine (chlorhydrate d') (2411)
Etomidate (1514)
Félypressine (1634)
Fenbendazole pour usage vétérinaire (1208)
Fenbufène (1209)
Filgrastim (solution concentrée de) (2206)
Flubendazole (1721)
Flunarizine (dichlorhydrate de) (1722)
Fluorescéine (2348)
Fluphénazine (décanoate de) (1014)
Fluphénazine (énantate de) (1015)
Formotérol (fumarate de) dihydraté (1724)
Fumarate ferreux (0902)
Galantamine (bromhydrate de) (2366)
Gélatine (0330)
Gemfibrozil (1694)
Glibenclamide (0718)
Gonadoréline (acétate de) (0827)
Guaifénésine (0615)
Hydrocodone (hydrogénotartrate d') 2,5-hydraté (1784)
Ibuprofène (0721)
Imipramine (chlorhydrate d') (0029)
*myo*-Inositol (1805)
Interféron gamma-1b (solution concentrée d') (1440)
Irbésartan (2465)
Lauromacrogol 400 (2046)
Lévamisole pour usage vétérinaire (1728)
Lévodopa (0038)
Lévofolinate calcique pentahydraté (1606)
Liothyronine sodique (0728)
Lithium (carbonate de) (0228)
Lobéline (chlorhydrate de) (1988)
Lopéramide (chlorhydrate de) (0929)
Lopéramide (oxyde de) monohydraté (1729)
Macrogol 40 sorbitol (heptaoléate de) (2396)
Magnésium (acétate de) tétrahydraté (2035)
Magnésium (chlorure de) 4,5-hydraté (1341)
Magnésium (chlorure de) hexahydraté (0402)
Marbofloxacine pour usage vétérinaire (2233)
Mébendazole (0845)
Méfénamique (acide) (1240)
Menthol racémique (0623)
Méthotrexate (0560)
Méthyle (salicylate de) (0230)
Méthylprednisolone (0561)
Méthylthioninium (chlorure de) (1132)
Métronidazole (benzoate de) (0934)
Minocycline (chlorhydrate de) dihydraté (1030)
Naproxène sodique (1702)
Nilutamide (2256)
Noréthistérone (0234)
Orciprénaline (sulfate d') (1033)
Oxaliplatine (2017)
Oxprénolol (chlorhydrate d') (0628)
Oxycodone (chlorhydrate d') (1793)
Papavérine (chlorhydrate de) (0102)
Parnaparine sodique (1252)
Pénicillamine (0566)
Péroxyde de benzoyle hydraté (0704)
Péthidine (chlorhydrate de) (0420)
Phényléphrine (1035)
Phényléphrine (chlorhydrate de) (0632)
Pholcodine (0522)
Phosphate dipotassique (1003)
Phosphate monopotassique (0920)
Pirenzépine (dichlorhydrate de) monohydraté (2001)
Polysorbate 40 (1914)
Polysorbate 20 (0426)
Polysorbate 60 (0427)
Potassium (acétate de) (1139)
Potassium (bicarbonate de) (1141)
Potassium (chlorure de) (0185)
Potassium (citrate de) (0400)
Potassium (métabisulfite de) (2075)
Potassium (nitrate de) (1465)
Povidone (0685)
Praziquantel (0855)
Prazosine (chlorhydrate de) (0856)
Procaïne (chlorhydrate de) (0050)
Propafénone (chlorhydrate de) (2103)
Propyle (gallate de) (1039)
Pyridoxine (chlorhydrate de) (0245)
Ramipril (1368)
Ranitidine (chlorhydrate de) (0946)
Rifamycine sodique (0432)
Rutoside trihydraté (1795)
Salbutamol (sulfate de) (0687)
Sodium (alginate de) (0625)
Sodium (aminosalicylate de) dihydraté (1993)
Sodium (chlorure de) (0193)
Sodium (stéarate de) (2058)
Sodium (sulfite de) anhydre (0775)
Sodium (sulfite de) heptahydraté (0776)
Soja (huile de) hydrogénée (1265)
Solutions concentrées pour hémodialyse (eau pour dilution des) (1167)
Somatropine (0951)
Somatropine (solution concentrée de) (0950)
Somatropine pour préparation injectable (0952)
Spirapril (chlorhydrate de) monohydraté (1766)
Stavudine (2130)
Sulfaguanidine (1476)
Sulfasalazine (0863)
Sulfate ferreux desséché (2340)
Testostérone (1373)
Tétrazépam (1738)
Théophylline-éthylènediamine anhydre (0300)
Théophylline-éthylènediamine hydratée (0301)
Thioridazine (2005)
Thioridazine (chlorhydrate de) (0586)
Tilidine (chlorhydrate de) hémihydraté (1767)
tout-*rac*-α-Tocophérol (0692)
Tolfénamique (acide) (2039)
Trandolapril (2245)
Tribénoside (1740)
Tryptophane (1272)
Vancomycine (chlorhydrate de) (1058)
Vérapamil (chlorhydrate de) (0573)
Vincristine (sulfate de) (0749)
Vinorelbine (tartrate de) (2107)
Xylométazoline (chlorhydrate de) (1162)
Zinc (acétate de) dihydraté (1482)

Zinc (acéxamate de) (1279)
Zinc (gluconate de) (2164)
Zinc (oxyde de) (0252)
Zinc (stéarate de) (0306)

## TEXTES DONT LE TITRE A ÉTÉ MODIFIÉ POUR LA 7e ÉDITION

*Le titre de textes suivants a été modifié à l'occasion de la publication de la 7e Edition.*

**MONOGRAPHIES**

**Préparations radiopharmaceutiques et matières premières pour préparations radiopharmaceutiques**

Iodométhylnorcholestérol ($^{131}$I) (solution injectable de) (0939) *(en remplacement de Norcholestérol iodé ($^{131}$I) (solution injectable de))*

**Monographies**

Calcium (acétate de) anhydre (2128) *(en remplacement de Calcium (acétate de))*

Méclozine (dichlorhydrate de) (0622) *(en remplacement de Méclozine (chlorhydrate de))*

## TEXTES SUPPRIMÉS POUR LA 7e ÉDITION

*Le texte suivant est supprimé à partir du* ***1er janvier 2011****.*

**MONOGRAPHIES**

**Monographies**

Gallamine (triéthiodure de) (0181)

# 1. PRESCRIPTIONS GÉNÉRALES

**07/2010:10000**
**corrigé 7.0**

# 1. PRESCRIPTIONS GÉNÉRALES

## 1.1. GÉNÉRALITÉS

Les Prescriptions générales s'appliquent à toutes les monographies et à tous les autres textes de la Pharmacopée Européenne.

Les textes officiels de la Pharmacopée Européenne sont publiés en anglais et en français. Les traductions vers d'autres langues peuvent être préparées par les Etats signataires de la Convention de la Pharmacopée Européenne. En cas de doute ou de litige, seules font autorité les versions anglaise et française.

Dans les textes de la Pharmacopée Européenne, le terme « Pharmacopée » sans qualificatif désigne la Pharmacopée Européenne. L'abréviation officielle indiquant la Pharmacopée Européenne est « Ph. Eur. ».

L'emploi du titre ou du sous-titre d'une monographie implique que la substance, la préparation ou l'article ainsi désigné satisfait aux exigences de la monographie correspondante. Dans les textes de la Pharmacopée, les références aux monographies sont faites en utilisant le titre suivi du numéro de référence, le tout étant en *italique*.

Les préparations doivent être conformes pendant toute leur période de validité ; une période de validité distincte et/ou des spécifications pour les récipients ouverts ou entamés peuvent être décidées par l'Autorité compétente. Les autres produits faisant l'objet d'une monographie doivent y satisfaire pendant leur durée d'utilisation. La durée de validité qui est attribuée à une préparation donnée et la date à partir de laquelle cette période doit être calculée font l'objet d'une décision de l'Autorité compétente en fonction des résultats expérimentaux d'études sur la stabilité.

Sauf indication contraire dans les Prescriptions générales ou les monographies, les spécifications des monographies constituent des exigences obligatoires. Les chapitres généraux deviennent d'application obligatoire dès lors qu'une monographie y fait référence sauf si la référence est faite d'une manière qui indique que l'intention est de citer le texte à titre d'information.

Les substances actives, les excipients, les préparations pharmaceutiques et les autres produits décrits dans les monographies sont prévus pour un usage en médecine humaine et vétérinaire (à moins d'une restriction explicitement mentionnée pour l'un de ces deux usages) ; ils ne sont de qualité « Pharmacopée » que s'ils sont conformes à toutes les exigences décrites dans les monographies. Ceci n'implique pas qu'il soit obligatoire pour un fabricant d'effectuer l'ensemble des essais de la monographie pour évaluer la conformité à la Pharmacopée avant libération d'un produit. Le fabricant peut également obtenir l'assurance que le produit est de qualité « Pharmacopée » à partir de données obtenues, par exemple, à partir des études de validation du procédé de fabrication et des contrôles en cours de production. La nécessité de satisfaire aux exigences de la Pharmacopée n'exclut donc pas la possibilité de recourir à la libération paramétrique dans certaines situations jugées appropriées par l'Autorité compétente.

Les essais et dosages décrits sont les méthodes officielles à partir desquelles sont établies les normes de la Pharmacopée Européenne. D'autres méthodes d'analyse peuvent être utilisées à des fins de contrôle avec l'accord de l'Autorité compétente, à condition que les méthodes permettent de juger, sans équivoque, que les normes des monographies seraient satisfaites si les méthodes officielles étaient appliquées. En cas de doute ou de litige, seules font autorité les méthodes d'analyse de la Pharmacopée Européenne.

Certaines substances faisant l'objet d'une monographie existent dans des qualités différentes appropriées à des usages divers. Sauf indication contraire dans la monographie, les exigences s'appliquent à toutes les qualités d'une substance. Dans certaines monographies, notamment celles sur les excipients, une liste de caractéristiques liées à la fonctionnalité qui sont d'intérêt pour l'utilisation de la substance peut figurer en annexe à la monographie à titre d'information. Des méthodes pour la détermination d'une ou plusieurs de ces caractéristiques peuvent figurer dans la monographie, également à titre d'information.

**Systèmes de qualité**. Les normes de qualité représentées par les monographies ne sont valables que si les articles en question sont produits dans le cadre d'un système de qualité approprié.

**Monographies générales**. Les substances et préparations qui font l'objet d'une monographie doivent également être conformes aux monographies générales appropriées qui leur sont applicables. En général, les monographies spécifiques ne comportent pas de renvoi aux monographies générales applicables.

Les monographies générales s'appliquent à toutes les substances et préparations visées par le champ d'application indiqué dans la rubrique Définition de ces monographies générales, sauf si un préambule limite ce champ d'application, par exemple aux substances et préparations faisant l'objet d'une monographie de la Pharmacopée.

Les monographies générales de formes pharmaceutiques s'appliquent à toutes les préparations du type défini. Les exigences ne sont pas nécessairement exhaustives dans le cas donné d'une préparation spécifique et des exigences supplémentaires peuvent être imposées par l'Autorité compétente.

Les monographies générales et les monographies spécifiques sont complémentaires. Si les dispositions d'une monographie générale ne s'appliquent pas à un produit donné, la monographie spécifique l'indique expressément.

**Validation des méthodes de la Pharmacopée**. Les méthodes d'essai figurant dans les monographies et les chapitres généraux ont été validées selon la pratique scientifique d'usage et les recommandations usuelles sur la validation analytique. Sauf indication contraire dans la monographie ou le chapitre général, une validation de la méthode d'essai par l'analyste n'est pas nécessaire.

**Termes et usages conventionnels**. L'expression « Autorité compétente » indique un organisme/établissement national, supranational ou international investi du pouvoir de décision pour le point concerné. Il peut s'agir, par exemple, d'une autorité nationale de pharmacopée, d'une autorité d'autorisation de mise sur le marché ou d'un laboratoire officiel de contrôle.

L'expression « sauf exception justifiée et autorisée » signifie que les exigences doivent être satisfaites à moins qu'une Autorité compétente, après justification, n'autorise une modification ou n'accorde une dispense dans un cas particulier.

Les mentions présentées sous le conditionnel du verbe (« devrait ») sont données à titre d'information ou de conseil.

Dans certaines monographies ou autres textes, les termes « approprié » et « convenable » sont employés pour qualifier un réactif, un microorganisme, une méthode d'essai, etc. Si les critères définissant ces qualificatifs ne figurent pas dans la monographie, le caractère approprié ou convenable du réactif, microorganisme, procédé, etc. utilisé est à démontrer à la satisfaction de l'Autorité compétente.

*Médicament*. (a) Toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines et/ou animales ; ou (b) toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme et/ou l'animal, ou pouvant lui être administrée en vue soit de restaurer, corriger ou modifier des fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique, soit d'établir un diagnostic médical.

*Médicament à base de plantes*. Tout médicament dont les substances actives sont exclusivement une ou plusieurs drogues végétales ou préparations à base de drogues végétales ou une association d'une ou de plusieurs drogues végétales et préparations à base de drogues végétales.

*Substance active*. Toute substance destinée à être utilisée pour la fabrication d'un médicament et qui, lorsqu'elle est utilisée dans la production d'un médicament, devient une substance active du médicament. De telles substances sont destinées à fournir une activité pharmacologique ou un autre effet direct pour le diagnostic, la guérison, l'atténuation, le traitement ou la prévention des maladies, ou à produire un effet sur la structure et la fonction du corps.

*Excipient* (substance auxiliaire). Tout composant d'un médicament qui n'est pas une substance active. Les adjuvants, les stabilisants, les conservateurs antimicrobiens, les diluants, les antioxydants, par exemple, sont des excipients.

**Méthodes interchangeables**. Certains chapitres généraux contiennent une mention indiquant que le texte en question a été harmonisé avec le texte correspondant de la Pharmacopée Japonaise et/ou de la Pharmacopée des Etats-Unis et que ces textes sont interchangeables. Ceci implique que, si une substance ou une préparation s'avère satisfaire à une exigence lorsqu'elle est examinée par une méthode interchangeable de l'une de ces pharmacopées, elle satisfait aux exigences de la Pharmacopée Européenne. En cas de doute ou de litige, seul fait autorité le texte de la Pharmacopée Européenne.

**Renvois à des documents réglementaires**. Les monographies et les chapitres généraux peuvent comporter des renvois à des documents émanant des autorités réglementaires du médicament, par exemple les directives et les notes explicatives de l'Union Européenne. Ces renvois sont donnés à titre d'information pour les utilisateurs de la Pharmacopée. L'inclusion d'un tel renvoi ne modifie pas le statut du document auquel il est fait référence, qui peut être obligatoire ou explicatif.

## 1.2. AUTRES DISPOSITIONS S'APPLIQUANT AUX MONOGRAPHIES ET AUX CHAPITRES GÉNÉRAUX

**Prises d'essai**. Dans les essais comportant des limites numériques et dans les dosages, la quantité prescrite des substances à mettre en oeuvre est approximative. La quantité réellement utilisée, exactement mesurée ou pesée, ne s'écarte pas de plus de 10 pour cent de la masse ou du volume prescrit et le résultat est calculé à partir de cette quantité exacte. Dans les essais où la limite n'est pas numérique, mais dépend habituellement de la comparaison avec une substance de référence dans les mêmes conditions, la quantité prescrite est respectée pour l'essai. Les quantités de réactif sont utilisées avec la précision indiquée.

Les quantités sont pesées ou mesurées avec l'exactitude correspondant au degré de précision indiqué. Dans le cas de pesées, la précision correspond à plus ou moins 5 unités après le dernier chiffre indiqué (par exemple, 0,25 g doit être interprété comme étant de 0,245 g à 0,255 g). Pour la mesure des volumes, si la partie décimale est un zéro ou se termine par un zéro (par exemple 10,0 mL ou 0,50 mL), le volume est mesuré en utilisant une pipette, un ballon jaugé ou une burette selon le cas ; sinon, une éprouvette ou une pipette graduées peuvent être utilisées. Les volumes exprimés en microlitres sont mesurés à l'aide d'une micropipette ou d'une microseringue.

Il est toutefois admis que, dans certains cas, la précision avec laquelle les quantités sont indiquées ne correspond pas au nombre de chiffres significatifs figurant dans la limite numérique spécifiée. Les pesées et mesures sont alors portées à un degré d'exactitude suffisant.

**Appareils et méthodes**. La verrerie volumétrique satisfait aux exigences « classe A » des Normes Internationales appropriées établies par l'Organisation Internationale de Normalisation.

Sauf indication contraire, les procédés analytiques sont effectués à une température comprise entre 15 °C et 25 °C.

Sauf indication contraire, les essais comparatifs sont effectués dans des tubes identiques en verre neutre, à fond plat, incolores, transparents ; les volumes de liquides prescrits correspondent à des tubes dont le diamètre intérieur est de 16 mm, mais des tubes d'un diamètre intérieur supérieur peuvent être utilisés en ajustant le volume de liquide examiné (*2.1.5*). Des volumes égaux des liquides à comparer sont examinés dans l'axe vertical des tubes sur un fond blanc ou, si nécessaire, sur un fond noir. L'examen est réalisé en lumière diffuse.

Tout solvant utilisé dans un essai ou un dosage dans lequel un indicateur est employé, est préalablement neutralisé vis-à-vis de l'indicateur, sauf si un essai à blanc est prescrit.

**Bain-marie**. Le terme « bain-marie » signifie un bain d'eau à ébullition, sauf indication différente de température. D'autres moyens de chauffage peuvent être utilisés, à condition que la température soit proche de, mais non supérieure à 100 °C ou à la température prescrite.

**Dessiccation et calcination à masse constante**. L'expression « desséché à masse constante » ou « calciné à masse constante » signifie que 2 pesées consécutives ne diffèrent pas de plus de 0,5 mg, la 2$^{de}$ pesée étant effectuée après une nouvelle période de dessiccation ou de calcination adaptée à la nature et à la quantité du résidu.

Lorsqu'une dessiccation est prescrite en se référant à une des expressions « dans un dessiccateur » ou « sous vide », elle est effectuée dans les conditions prescrites dans le chapitre *2.2.32. Perte à la dessiccation*.

**Réactifs**. La réalisation correcte des procédés analytiques, ainsi que la fiabilité des résultats obtenus, dépendent en partie de la qualité des réactifs utilisés. Les réactifs sont décrits dans un chapitre séparé (chapitre général *4*). Il est présumé que les réactifs utilisés sont de qualité analytique. Pour certains d'entre eux, les spécifications données comprennent des essais permettant de vérifier leur aptitude à l'emploi.

**Solvants**. Lorsque le solvant n'est pas mentionné, le terme « solution » implique une solution dans l'eau.

Lorsque l'eau est prescrite ou sous-entendue dans les procédés analytiques et pour la préparation des réactifs, elle est conforme à la monographie *Eau purifiée (0008)*, mais pour la plupart des utilisations, les spécifications pour les endotoxines bactériennes (*Eau purifiée en vrac*) et la contamination microbienne (*Eau purifiée en récipients*) ne sont pas nécessaires. L'expression « eau distillée » désigne l'eau purifiée préparée par distillation.

Le terme « éthanol », sans autre précision, désigne l'éthanol anhydre ; le terme « alcool », sans autre précision, désigne l'éthanol à 96 pour cent. D'autres dilutions d'éthanol sont indiquées par le terme « éthanol » ou « alcool » suivi de l'indication du titre en éthanol ($C_2H_6O$) exprimé en pourcentage *V/V*.

**Expression des teneurs**. Pour définir les teneurs, l'expression « pour cent » est employée, selon les circonstances, avec 2 significations :

- pour cent *m/m* (pourcentage masse pour masse) exprime le nombre de grammes de substance dans 100 grammes de produit final,
- pour cent *V/V* (pourcentage volume dans volume) exprime le nombre de millilitres de substance dans 100 mL de produit final.

L'expression « parties par million » (ppm), sans autre précision, est exprimée masse pour masse.

**Température**. Quand, dans un procédé analytique, un texte mentionne une température sans indication chiffrée, les termes généraux utilisés ont la signification suivante :

- congelé ou au congélateur : température inférieure à – 15 °C,
- réfrigéré ou au réfrigérateur : 2 °C à 8 °C,
- frais : 8 °C à 15 °C,
- température ambiante : 15 °C à 25 °C.

## 1.3. CHAPITRES GÉNÉRAUX

**Récipients**. Les matériaux utilisés dans la fabrication des récipients sont décrits dans le chapitre *3.1.* Les dénominations générales employées couramment pour désigner les matériaux, et tout particulièrement les matières plastiques, couvrent chacune une gamme de produits qui varient non seulement dans les propriétés du composant principal mais également dans les additifs utilisés. Les méthodes d'analyse et les limites à appliquer aux matériaux sont fonction de la formulation et ne sont donc applicables que dans le cas de matériaux dont les formulations répondent à celles inscrites au préambule de la spécification. L'emploi de matériaux ayant d'autres formulations, et les méthodes d'analyse et limites qui leur sont appliquées, sont sujets à l'accord de l'Autorité compétente.

Les spécifications pour les récipients inscrites dans le chapitre *3.2* ont été élaborées en vue d'une application générale aux récipients de la catégorie indiquée mais, en raison de la grande variété des récipients disponibles et des nouveaux développements possibles, la publication d'une spécification n'exclut pas, dans des cas justifiés, l'emploi de récipients qui satisfont à d'autres spécifications, sous réserve de l'accord de l'Autorité compétente.

Il peut être fait référence, dans les monographies de la Pharmacopée, aux définitions et spécifications figurant dans le chapitre *3.2. Récipients*. L'utilisation de certains types de récipients est parfois exigée dans les monographies générales de formes pharmaceutiques, sous les rubriques Définition/Production. Certaines autres monographies indiquent, sous Etiquetage, le type de récipient dont l'utilisation est recommandée.

## 1.4. MONOGRAPHIES

*TITRES*

Les titres des monographies de la Pharmacopée sont rédigés en français et anglais dans les versions respectives avec un sous-titre en latin.

*MASSES ATOMIQUES ET MOLÉCULAIRES RELATIVES*

La masse atomique relative ($A_r$) ou la masse moléculaire relative ($M_r$) figure en tête de chaque monographie, s'il y a lieu. Les masses atomiques et moléculaires relatives, ainsi que les formules brutes et développées, ne constituent pas des normes analytiques de la substance décrite.

*NUMÉROS D'ENREGISTREMENT DU CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE (CAS)*

Dans les cas appropriés, les numéros d'enregistrement CAS sont indiqués pour information dans les monographies pour faciliter l'accès des utilisateurs à des renseignements utiles. CAS Registry Number® est une marque déposée de l'*American Chemical Society*.

*DÉFINITION*

Les dispositions de la rubrique Définition constituent une définition officielle de la substance, de la préparation ou de tout autre article faisant l'objet de la monographie.

**Limites de teneur**. Lorsque des limites de teneur sont prescrites dans une monographie, ce sont celles déterminées par la méthode décrite sous Dosage.

**Drogues végétales**. Dans les monographies des drogues végétales, la définition indique si la monographie décrit, par exemple, la drogue végétale en l'état ou sous forme de poudre ; au cas où la monographie décrit la drogue sous plusieurs formes, par exemple, à la fois en l'état et sous forme de poudre, la définition le précise clairement.

*PRODUCTION*

Les dispositions de la section Production attirent l'attention sur les aspects particuliers de la méthode de fabrication mais ne sont pas nécessairement exhaustives. Sauf indication contraire, elles constituent des normes obligatoires pour les fabricants. Elles peuvent avoir trait, par exemple, aux matières premières, au procédé de fabrication lui-même ainsi qu'à sa validation et son contrôle, aux essais en cours de fabrication ou aux essais à effectuer par le fabricant sur le produit fini, soit sur des lots sélectionnés, soit sur chaque lot avant de le libérer. Ces dispositions peuvent ne pas être toujours vérifiables par un expert extérieur à l'établissement de production, sur un échantillon du produit fini. Il revient à l'Autorité compétente de s'assurer que les instructions ont été respectées, par exemple en examinant les données soumises par le fabricant, en inspectant la fabrication ou en procédant à la vérification d'échantillons appropriés.

L'absence d'une section Production ne signifie pas qu'il soit inutile de prêter attention aux points auxquels il est fait référence ci-dessus.

**Choix de la souche vaccinale, Choix de la composition du vaccin**. La section Production d'une monographie peut définir les caractéristiques d'une souche vaccinale ou de la composition du vaccin. Sauf indication contraire, les méthodes d'essai décrites pour confirmer ces caractéristiques sont données à titre d'exemple de méthodes appropriées. Sous réserve de l'accord de l'Autorité compétente, d'autres méthodes peuvent être utilisées sans validation par rapport à la méthode présentée dans la monographie.

*CARACTÈRES*

Les indications figurant sous la rubrique Caractères ne sont pas à interpréter de manière stricte et ne constituent pas des exigences.

**Solubilité**. Les indications de solubilité figurant sous la rubrique Caractères sont exprimées en termes ayant la signification suivante pour une température de 15 °C à 25 °C.

| Termes descriptifs | Volumes approximatifs de solvants en millilitres par gramme de substance | | | |
|---|---|---|---|---|
| Très soluble | inférieur à | 1 | | |
| Facilement soluble | de | 1 | à | 10 |
| Soluble | de | 10 | à | 30 |
| Assez soluble | de | 30 | à | 100 |
| Peu soluble | de | 100 | à | 1000 |
| Très peu soluble | de | 1000 | à | 10 000 |
| Pratiquement insoluble | plus de | | | 10 000 |

Le terme « partiellement soluble » est utilisé dans le cas d'un mélange dont seuls certains constituants se dissolvent. Le terme « miscible » est utilisé dans le cas d'un liquide miscible en toutes proportions avec le solvant indiqué.

*IDENTIFICATION*

**Portée**. Les procédés analytiques prescrits dans la rubrique Identification n'ont pas pour objet de permettre la confirmation absolue de la structure ou de la composition chimique du produit. Ils doivent permettre de vérifier, avec un niveau d'assurance acceptable, que le produit est conforme à la description figurant sur l'étiquette.

**Première et seconde identifications**. Certaines monographies comportent 2 sous-rubriques intitulées « Première identification » et « Seconde identification ». Le ou les essais de la « Première identification » peuvent être utilisés en toutes circonstances. Le ou les essais de la « Seconde identification » peuvent être utilisés dans les pharmacies à condition qu'il puisse être démontré que la substance ou la préparation provient bien d'un lot attesté conforme à toutes les autres exigences de la monographie.

Certaines monographies comportent deux ou plusieurs ensembles d'essais pour les besoins de la première identification qui sont équivalents et peuvent être utilisés de façon indépendante. Un ou plusieurs de ces ensembles contiennent habituellement un renvoi à un essai de la rubrique Essai de la monographie. Il peut être utilisé pour simplifier le travail quand

l'analyste effectue à la fois l'identification et les essais prescrits. Par exemple, l'un des ensembles renvoie à un essai de pureté énantiomèrique, alors que l'autre ensemble prescrit un essai du pouvoir rotatoire spécifique : le but des deux essais est le même, c'est-à-dire une vérification de la présence de l'énantiomère voulu.

**Poudres de drogues végétales**. Les monographies sur les drogues végétales peuvent comporter des dessins schématiques de la drogue pulvérisée. Ces dessins complètent la description de la poudre indiquée dans l'essai d'identification concerné.

*ESSAI ET DOSAGE*

**Portée**. Les normes ne sont pas conçues pour garantir contre toutes les impuretés possibles. Il ne faut pas présumer, par exemple, qu'une impureté qui n'est pas détectable par les essais prescrits, sera tolérée lorsque la raison et la bonne pratique pharmaceutique exigent qu'elle soit absente. Voir également sous Impuretés.

**Calcul**. Lorsque le résultat d'un essai ou d'un dosage doit être calculé par rapport à la substance desséchée, par rapport à la substance anhydre ou sur une autre base spécifiée, la détermination de la perte à la dessiccation, la teneur en eau ou autre propriété désignée est effectuée par la méthode prescrite dans l'essai concerné de la monographie. Le résultat est suivi par la mention « substance desséchée », « substance anhydre », etc. entre parenthèses.

**Limites**. Les limites prescrites sont fondées sur les données obtenues dans la pratique analytique normale ; elles tiennent compte des erreurs analytiques normales, des variations acceptables inhérentes à la fabrication et à la préparation ainsi que d'un certain degré d'altération jugé acceptable. Aucune autre tolérance ne doit être appliquée aux limites prescrites pour déterminer si l'article examiné satisfait aux exigences de la monographie.

Pour déterminer la conformité à une limite numérique, la valeur calculée du résultat d'un essai ou d'un dosage est tout d'abord arrondie au nombre de chiffres significatifs indiqué, sauf indication contraire. Les limites, qu'elles soient exprimées en pourcentage ou en valeur absolue, sont considérées comme significatives jusqu'au dernier chiffre de la valeur indiquée (par exemple, 140 comporte 3 chiffres significatifs). Le dernier chiffre du résultat est augmenté de 1 lorsque la partie rejetée est égale à ou dépasse une demi-unité ; si la partie rejetée est inférieure à une demi-unité, le nombre n'est pas modifié.

**Indication de la teneur admise en impuretés**. Dans le cas d'un essai comparatif, la teneur approximative de l'impureté tolérée, ou de la somme des impuretés, peut être donnée à titre purement indicatif. L'acceptation ou le rejet est fonction de la conformité ou de la non-conformité à l'essai prescrit. Si l'emploi d'une substance de référence de l'impureté nommée n'est pas prescrit, cette teneur est exprimée comme la concentration nominale de la substance utilisée pour préparer la solution témoin spécifiée dans la monographie, sauf indication contraire.

**Drogues végétales**. Pour les drogues végétales, les cendres sulfuriques, les cendres totales, les matières extractibles à l'eau ou à l'alcool, la teneur en eau, la teneur en huile essentielle et la teneur en substance active sont calculées par rapport à la drogue qui n'a pas été spécialement desséchée, sauf indication contraire dans la monographie.

**Equivalents**. Lorsqu'un équivalent est donné, aux fins de la Pharmacopée, seuls les chiffres indiqués sont à utiliser dans l'application des prescriptions de la monographie.

**Milieux de culture**. Les milieux de culture décrits dans les monographies et chapitres généraux ont été trouvés satisfaisants pour l'utilisation prévue. Néanmoins, les composants des milieux, notamment ceux d'origine biologique, ont une qualité variable et, pour obtenir une performance optimale, il peut être nécessaire de moduler la concentration de certains ingrédients, notamment :

– les peptones et les extraits de viande ou de levures, en fonction de leurs propriétés nutritives,
– les substances ayant un effet tampon,
– les sels biliaires, l'extrait de bile, le désoxycholate, les matières colorantes, en fonction de leurs propriétés sélectives,
– les antibiotiques, en fonction de leur activité.

*CONSERVATION*

L'information et les recommandations données sous la rubrique Conservation ne constituent pas une exigence de la Pharmacopée, mais les autorités compétentes peuvent préciser des conditions particulières de conservation à imposer.

Les produits décrits à la Pharmacopée sont conservés dans des conditions permettant d'éviter toute souillure et, dans la mesure du possible, toute altération. Lorsque des conditions spéciales de conservation sont recommandées, y compris le type de récipient (voir la section 1.3. Chapitres généraux) et des limites de température, elles sont indiquées dans la monographie.

Les expressions suivantes utilisées dans les monographies, à la rubrique Conservation ont la signification suivante.

*En récipient étanche*. Cette indication signifie qu'un produit est conservé dans un récipient étanche (*3.2*). Des précautions sont à prendre lorsque le récipient est ouvert dans une atmosphère de forte humidité. Une atmosphère de faible humidité peut être maintenue, le cas échéant, dans le récipient à l'aide d'un desséchant, à condition d'éviter tout contact de ce dernier avec le produit en question.

*A l'abri de la lumière*. Cette indication signifie soit que le produit est conservé dans un récipient en matière qui absorbe suffisamment de lumière actinique pour protéger le contenu de toute altération induite par celle-ci, soit que le récipient est placé dans une enveloppe extérieure assurant une telle protection ou est conservé dans un endroit d'où toute lumière de ce type est exclue.

*ÉTIQUETAGE*

D'une manière générale, l'étiquetage des médicaments est régi par des accords internationaux et des règlements supranationaux ou nationaux. Les indications données sous Etiquetage ne constituent donc pas une liste exhaustive et, par ailleurs, seules sont obligatoires, aux fins de la Pharmacopée, les indications d'étiquetage nécessaires pour démontrer la conformité ou non conformité à la monographie. Toute autre information est donnée à titre de recommandation. Lorsque le terme « étiquette » est employé dans la Pharmacopée, les indications peuvent figurer sur le récipient, l'emballage, une notice qui accompagne l'emballage ou un certificat d'analyse qui accompagne le produit, selon la décision de l'Autorité compétente.

*AVERTISSEMENTS*

Certaines des substances décrites dans les monographies et certains des réactifs dont l'emploi est prescrit pour les essais et dosages de la Pharmacopée peuvent être dangereux pour la santé s'ils ne sont pas manipulés avec les précautions adéquates. Il est indispensable d'observer à tout moment les principes de bonnes pratiques de laboratoire de contrôle de la qualité et les réglementations en vigueur. Dans certaines monographies, un avertissement attire l'attention du lecteur sur des dangers particuliers. L'absence d'un tel avertissement ne signifie pas, toutefois, qu'il n'existe pas de danger.

*IMPURETÉS*

Une liste de toutes les impuretés connues et potentielles dont il a été démontré qu'elles sont détectées par les essais peut être indiquée. Voir également le chapitre *5.10. Contrôle des impuretés dans les substances pour usage pharmaceutique*. Les impuretés sont désignées par une ou plusieurs lettres de l'alphabet. Lorsqu'une lettre semble manquer dans la liste, l'impureté désignée par cette lettre a été supprimée pendant l'élaboration de la monographie avant sa publication ou pendant sa révision.

*CARACTÉRISTIQUES LIÉES À LA FONCTIONNALITÉ DES EXCIPIENTS*

Une section sur les caractéristiques liées à la fonctionnalité figure dans certaines monographies sur les excipients. Ces caractéristiques ainsi que les méthodes et les tolérances éventuellement indiquées pour leur contrôle ne sont pas des normes obligatoires ; elles peuvent néanmoins être d'intérêt pour l'emploi de l'excipient et sont données à titre d'information (voir également la section 1.1. Généralités).

*ÉTALONS DE RÉFÉRENCE*

Certaines monographies indiquent l'emploi d'étalons de référence (substances chimiques de référence, préparations biologiques de référence, spectres de référence). Voir également le chapitre *5.12. Etalons de référence*. La Commission Européenne de Pharmacopée établit les étalons de référence officiels qui seuls font autorité en cas d'arbitrage. Ces étalons de référence sont disponibles auprès de la Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé (DEQM). Des informations sur les étalons de référence disponibles et une déclaration de la validité d'un lot peuvent être obtenues sur le site internet de la DEQM.

## 1.5. ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

| | |
|---|---|
| $A$ | Absorbance |
| $A_{1\,\mathrm{cm}}^{1\,\mathrm{pour\,cent}}$ | Absorbance spécifique |
| $A_r$ | Masse atomique relative |
| $[\alpha]_D^{20}$ | Pouvoir rotatoire spécifique |
| $d_{20}^{20}$ | Densité |
| $\lambda$ | Longueur d'onde |
| Eb | Point d'ébullition |
| ERV | Désigne les étalons de référence végétaux |
| F | Point de fusion |
| M | Molarité |
| $M_r$ | Masse moléculaire relative |
| $n_D^{20}$ | Indice de réfraction |
| PBR | Désigne les préparations biologiques de référence |
| ppm | Parties par million (milligrammes par kilogramme) |
| R | Désigne les substances ou solutions figurant au chapitre *4. Réactifs* |
| $R_F$ | Facteur de retardement (voir chapitre *2.2.46*) |
| $R_{st}$ | En chromatographie, désigne le rapport entre la distance parcourue par une substance et la distance parcourue par une substance de référence |
| RV | Désigne les substances étalons pour volumétrie (*4.2.1*) |
| SCR | Désigne les substances chimiques de référence |
| UI | Unité Internationale |
| U. Ph. Eur. | Unité Pharmacopée Européenne |

**Abréviations utilisées dans les monographies sur les immunoglobulines, les immunosérums et les vaccins**

| | |
|---|---|
| $DL_{50}$ | La quantité statistiquement établie d'une substance, dont on peut s'attendre à ce qu'elle provoque la mort de 50 pour cent des animaux d'expérience dans un temps donné, après administration par la voie indiquée |
| DLM | Dose létale minimale |
| dose L+/10 | La plus petite quantité de toxine qui, dans des conditions déterminées, mélangée à 0,1 UI d'antitoxine, puis administrée par la voie indiquée, provoque la mort de l'animal d'expérience dans un temps donné |
| dose L+ | La plus petite quantité de toxine qui, dans des conditions déterminées, mélangée à 1 UI d'antitoxine, puis administrée par la voie indiquée, provoque la mort de l'animal d'expérience dans un temps donné |
| dose lr/100 | La plus petite quantité de toxine qui, dans des conditions déterminées, mélangée à 0,01 UI d'antitoxine, puis injectée par voie intradermique, provoque chez l'animal d'expérience une réaction caractéristique au point d'injection dans un temps donné |
| dose Lp/10 | La plus petite quantité de toxine qui, dans des conditions déterminées, mélangées à 0,1 UI d'antitoxine, puis administrée par la voie indiquée, provoque la paralysie de l'animal d'expérience dans un temps donné |
| dose Lo/10 | La plus grande quantité de toxine qui, dans des conditions déterminées, mélangée à 0,1 UI d'antitoxine, puis administrée par la voie indiquée, ne provoque pas de manifestations de toxicité chez l'animal d'expérience dans un temps donné |
| dose Lf | La quantité de toxine ou d'anatoxine qui permet la floculation le plus rapidement en présence de 1 UI d'antitoxine |
| $DICC_{50}$ | La quantité de virus, établie statistiquement, dont on peut s'attendre à ce qu'elle infecte 50 pour cent des cultures cellulaires utilisées dans l'expérience |
| $DIO_{50}$ | La quantité de virus, établie statistiquement, dont on peut s'attendre à ce qu'elle infecte 50 pour cent des oeufs embryonnés utilisés dans l'expérience |
| $DI_{50}$ | La quantité de virus, établie statistiquement, dont on peut s'attendre à ce qu'elle infecte 50 pour cent des animaux utilisés dans l'expérience |

| | |
|---|---|
| $DP_{50}$ | La dose statistiquement établie d'un vaccin dont on peut s'attendre à ce qu'elle protège, dans des conditions déterminées, 50 pour cent des animaux contre la dose d'épreuve de microorganismes ou toxines contre lesquels le vaccin est actif |
| $DE_{50}$ | La dose statistiquement établie d'un vaccin dont on peut s'attendre à ce qu'elle induise chez 50 pour cent des animaux, dans des conditions déterminées, la formation d'anticorps spécifiques contre les antigènes du vaccin considérés |
| EOPS | Exempt d'organismes pathogènes spécifiés |
| UFP | Unité formant pustule ou unité formant plage ou plaque |

**Collections de microorganismes**

| | |
|---|---|
| ATCC | American Type Culture Collection<br>10801 University Boulevard<br>Manassas, Virginia 20110-2209, USA |
| C.I.P. | Collection de Bactéries de l'Institut Pasteur<br>B.P. 52, 25 rue du Docteur Roux<br>75724 Paris Cedex 15, France |
| IMI | International Mycological Institute<br>Bakeham Lane<br>Surrey TW20 9TY, Grande-Bretagne |
| I.P. | Collection Nationale de Culture de Microorganismes (C.N.C.M.)<br>Institut Pasteur<br>25, rue du Docteur Roux<br>75724 Paris Cedex 15, France |
| NCIMB | National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd<br>23 St Machar Drive<br>Aberdeen AB2 1RY, Grande-Bretagne |
| NCPF | National Collection of Pathogenic Fungi<br>London School of Hygiene and Tropical Medicine<br>Keppel Street<br>London WC1E 7HT, Grande-Bretagne |
| NCTC | National Collection of Type Cultures<br>Central Public Health Laboratory<br>Colindale Avenue<br>London NW9 5HT, Grande-Bretagne |
| NCYC | National Collection of Yeast Cultures<br>AFRC Food Research Institute<br>Colney Lane<br>Norwich NR4 7UA, Grande-Bretagne |
| NITE | Biological Resource Center<br>Department of Biotechnology<br>National Institute of Technology and Evaluation<br>2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, 292-0818<br>Japon |
| S.S.I. | Statens Serum Institut<br>80 Amager Boulevard, Copenhague, Danemark |

## 1.6. UNITÉS DU SYSTÈME INTERNATIONAL (SI) UTILISÉES DANS LA PHARMACOPÉE ET CORRESPONDANCE AVEC D'AUTRES UNITÉS

*SYSTÈME INTERNATIONAL D'UNITÉS (SI)*

Le Système International d'unités comprend 3 classes d'unités, à savoir les unités de base, les unités dérivées et les unités supplémentaires[(1)]. Les unités de base et leurs définitions sont rassemblées dans le tableau 1.6.-1.

Les unités dérivées peuvent être formées en combinant les unités de base d'après des relations algébriques choisies qui lient les grandeurs correspondantes. Pour certaines de ces unités dérivées, il existe des noms et symboles spéciaux. Les unités SI utilisées dans la Pharmacopée sont données dans le tableau 1.6.-2.

Certaines unités importantes n'appartenant pas au Système International, mais largement utilisées, sont rassemblées dans le tableau 1.6.-3.

Les préfixes donnés dans le tableau 1.6.-4 sont utilisés pour former les noms et les symboles des multiples et sous-multiples décimaux des unités SI.

*REMARQUES*

1. La Pharmacopée utilise la température Celsius (symbole *t*), définie par l'équation suivante :

$$t = T - T_0$$

   où $T_0$ = 273,15 K par définition. La température Celsius ou centigrade s'exprime en degrés Celsius (symbole °C). L'unité « degré Celsius » est égale à l'unité « kelvin ».
2. Les expressions usuelles des concentrations utilisées dans la Pharmacopée sont définies dans les Prescriptions générales.
3. Le radian est l'angle compris entre deux rayons qui, sur la circonférence d'un cercle, interceptent un arc de longueur égale à celle d'un rayon.
4. Dans la Pharmacopée, les conditions de centrifugation sont définies par référence à l'accélération due à la pesanteur (*g*) :

$$g = 9,806\ 65\ m \cdot s^{-2}$$

5. La Pharmacopée utilise également des grandeurs sans dimensions comme la densité (*2.2.5*), l'absorbance (*2.2.25*), l'absorbance spécifique (*2.2.25*) ou l'indice de réfraction (*2.2.6*).
6. L'unité microkatal est définie comme l'activité enzymatique qui provoque dans des conditions définies la transformation, par exemple l'hydrolyse, d'une micromole de substrat par seconde.

(1) Les définitions des unités dans le Système International se trouvent dans la brochure « Le Système International d'Unités (SI) », éditée par le Bureau International des Poids et Mesures, Pavillon de Breteuil, F-92310 Sèvres.

Tableau 1.6.-1. – *Unités SI de base*

| Grandeur | | Unité | | Définition |
|---|---|---|---|---|
| **Nom** | **Symbole** | **Nom** | **Symbole** | |
| Longueur | *l* | mètre | m | Le mètre est la longueur du trajet parcouru dans le vide par la lumière pendant une durée de 1/299 792 458 de seconde. |
| Masse | *m* | kilogramme | kg | Le kilogramme est égal à la masse du prototype international du kilogramme. |
| Temps | *t* | seconde | s | La seconde est la durée de 9 192 631 770 périodes de la radiation correspondant à la transition entre les deux niveaux hyperfins de l'état fondamental de l'atome de césium-133. |
| Intensité de courant électrique | *I* | ampère | A | L'ampère est l'intensité d'un courant constant qui, maintenu dans deux conducteurs parallèles, rectilignes, de longueur infinie, de section circulaire négligeable et placés à une distance de 1 mètre l'un de l'autre dans le vide, produirait entre ces conducteurs une force égale à $2 \times 10^{-7}$ newtons par mètre de longueur. |
| Température thermodynamique | *T* | kelvin | K | Le kelvin est la fraction 1/273,16 de la température thermodynamique du point triple de l'eau. |
| Quantité de matière | *n* | mole | mol | La mole est la quantité de matière d'un système contenant autant d'entités élémentaires qu'il y a d'atomes dans 0,012 kilogramme de carbone-12*. |
| Intensité lumineuse | $I_v$ | candela | cd | La candela est l'intensité lumineuse, dans une direction donnée, d'une source qui émet un rayonnement monochromatique de fréquence $540 \times 10^{12}$ hertz et dont l'intensité énergétique dans cette direction est 1/683 watt par stéradian. |

* Lorsqu'on emploie la mole, les entités élémentaires doivent être spécifiées et peuvent être des atomes, des molécules, des ions, des électrons, d'autres particules ou des groupements spécifiés de telles particules.

Tableau 1.6.-2. – *Unités SI utilisées dans la Pharmacopée Européenne et correspondance avec d'autres unités*

| Grandeur | | Unité | | | | Conversion d'autres unités en unités SI |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nom** | **Symbole** | **Nom** | **Symbole** | **Expression en unités SI de base** | **Expression en d'autres unités SI** | |
| Nombre d'ondes | $\nu$ | un par mètre | 1/m | $m^{-1}$ | | |
| Longueur d'onde | $\lambda$ | micromètre<br>nanomètre | µm<br>nm | $10^{-6}$m<br>$10^{-9}$m | | |
| Aire, superficie | *A, S* | mètre carré | $m^2$ | $m^2$ | | |
| Volume | *V* | mètre cube | $m^3$ | $m^3$ | | 1 mL = 1 $cm^3$ = $10^{-6}$ $m^3$ |
| Fréquence | $\nu$ | hertz | Hz | $s^{-1}$ | | |
| Masse volumique | $\rho$ | kilogramme par mètre cube | $kg/m^3$ | $kg{\cdot}m^{-3}$ | | 1 g/mL = 1 g/$cm^3$ = $10^3$ $kg{\cdot}m^{-3}$ |
| Vitesse | *v* | mètre par seconde | m/s | $m{\cdot}s^{-1}$ | | |
| Force | *F* | newton | N | $m{\cdot}kg{\cdot}s^{-2}$ | | 1 dyne = 1 $g{\cdot}cm{\cdot}s^{-2}$ = $10^{-5}$ N<br>1 kp = 9,806 65 N |
| Pression, contrainte | *p* | pascal | Pa | $m^{-1}{\cdot}kg{\cdot}s^{-2}$ | $N{\cdot}m^{-2}$ | 1 dyne/$cm^2$ = $10^{-1}$ Pa = $10^{-1}$ $N{\cdot}m^{-2}$<br>1 atm = 101 325 Pa = 101,325 kPa<br>1 bar = $10^5$ Pa = 0,1 MPa<br>1 mm Hg = 133,322 387 Pa<br>1 Torr = 133,322 368 Pa<br>1 psi = 6,894 757 kPa |
| Viscosité dynamique | $\eta$ | pascal-seconde | Pa·s | $m^{-1}{\cdot}kg{\cdot}s^{-1}$ | $N{\cdot}s{\cdot}m^{-2}$ | 1 P = $10^{-1}$ Pa·s = $10^{-1}$ $N{\cdot}s{\cdot}m^{-2}$<br>1 cP = 1 mPa·s |
| Viscosité cinématique | $\nu$ | mètre carré par seconde | $m^2/s$ | $m^2{\cdot}s^{-1}$ | $Pa{\cdot}s{\cdot}m^3{\cdot}kg^{-1}$<br>$N{\cdot}m{\cdot}s{\cdot}kg^{-1}$ | 1 St = 1 $cm^2{\cdot}s^{-1}$ = $10^{-4}$ $m^2{\cdot}s^{-1}$ |
| Energie | *W* | joule | J | $m^2{\cdot}kg{\cdot}s^{-2}$ | N·m | 1 erg = 1 $cm^2{\cdot}g{\cdot}s^{-2}$ = 1 dyne·cm = $10^{-7}$ J<br>1 cal = 4,1868 J |
| Puissance, flux d'énergie | *P* | watt | W | $m^2{\cdot}kg{\cdot}s^{-3}$ | $N{\cdot}m{\cdot}s^{-1}$<br>$J{\cdot}s^{-1}$ | 1 erg/s = 1 $dyne{\cdot}cm{\cdot}s^{-1}$ =<br>$10^{-7}$ W = $10^{-7}$ $N{\cdot}m{\cdot}s^{-1}$ =<br>$10^{-7}$ $J{\cdot}s^{-1}$ |
| Dose d'énergie radiante absorbée | *D* | gray | Gy | $m^2{\cdot}s^{-2}$ | $J{\cdot}kg^{-1}$ | 1 rad = $10^{-2}$Gy |

| Grandeur | | Unité | | | | Conversion d'autres unités en unités SI |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Nom | Symbole | Nom | Symbole | Expression en unités SI de base | Expression en d'autres unités SI | |
| Potentiel électrique, force électromotrice | $U$ | volt | V | $m^2 \cdot kg \cdot s^{-3} \cdot A^{-1}$ | $W \cdot A^{-1}$ | |
| Résistance électrique | $R$ | ohm | Ω | $m^2 \cdot kg \cdot s^{-3} \cdot A^{-2}$ | $V \cdot A^{-1}$ | |
| Quantité d'électricité | $Q$ | coulomb | C | $A \cdot s$ | | |
| Activité d'une source radionucléide | $A$ | becquerel | Bq | $s^{-1}$ | | 1 Ci = $37 \cdot 10^9$ Bq = $37 \cdot 10^9$ $s^{-1}$ |
| Concentration molaire volumique, molarité, concentration de quantité de matière | $c$ | mole par mètre cube | $mol/m^3$ | $mol \cdot m^{-3}$ | | 1 mol/L = 1 M = 1 $mol/dm^3$ = $10^3$ $mol \cdot m^{-3}$ |
| Concentration en masse | $\rho$ | kilogramme par mètre cube | $kg/m^3$ | $kg \cdot m^{-3}$ | | 1 g/L = 1 $g/dm^3$ = 1 $kg \cdot m^{-3}$ |

Tableau 1.6.-3. – *Unités en usage avec le Système International*

| Grandeur | Unité | | Valeur en unité SI |
|---|---|---|---|
| | Nom | Symbole | |
| Temps | minute | min | 1 min = 60 s |
| | heure | h | 1 h = 60 min = 3600 s |
| | jour | d | 1 d = 24 h = 86 400 s |
| Angle plan | degré | ° | 1° = (π/180) rad |
| Volume | litre | L | 1 L = 1 $dm^3$ = $10^{-3}$ $m^3$ |
| Masse | tonne | t | 1 t = $10^3$ kg |
| Fréquence de rotation | tour par minute | tr/min | 1 tr/min = (1/60) $s^{-1}$ |

Tableau 1.6.-4. – *Multiples et sous-multiples décimaux des unités*

| Facteur | Préfixe | Symbole | Facteur | Préfixe | Symbole |
|---|---|---|---|---|---|
| $10^{18}$ | exa | E | $10^{-1}$ | déci | d |
| $10^{15}$ | peta | P | $10^{-2}$ | centi | c |
| $10^{12}$ | téra | T | $10^{-3}$ | milli | m |
| $10^9$ | giga | G | $10^{-6}$ | micro | µ |
| $10^6$ | méga | M | $10^{-9}$ | nano | n |
| $10^3$ | kilo | k | $10^{-12}$ | pico | p |
| $10^2$ | hecto | h | $10^{-15}$ | femto | f |
| $10^1$ | déca | da | $10^{-18}$ | atto | a |

# 2. MÉTHODES ANALYTIQUES

# 2.1. APPAREILS

# 2.1. APPAREILS

01/2008:20101

## 2.1.1. COMPTE-GOUTTES

Le terme « gouttes » désigne des gouttes dites normales débitées par un compte-gouttes normal défini ci-après.

Le compte-gouttes normal (figure 2.1.1.-1) est en verre pratiquement incolore. Son extrémité inférieure présente un orifice circulaire d'écoulement à bord plan, perpendiculaire à l'axe du compte-gouttes.

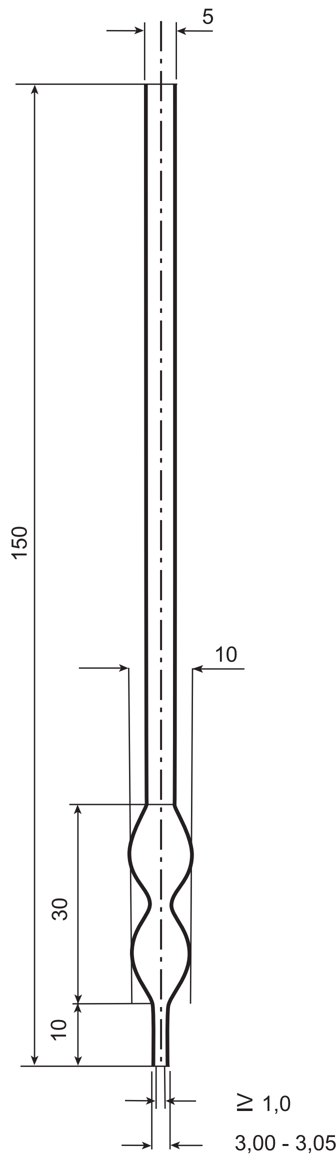



Figure 2.1.1.-1. – *Compte-gouttes normal*

*Dimensions en millimètres*

D'autres compte-gouttes peuvent être utilisés à condition qu'ils satisfassent à l'essai suivant :

20 gouttes d'*eau R* à 20 ± 1 °C qui s'écoulent en chute libre d'un compte-gouttes normal tenu en position verticale à un débit constant d'une goutte par seconde, pèsent 1000 ± 50 mg, le compte-gouttes ayant été nettoyé soigneusement avant l'emploi. Avec un compte-gouttes donné, exécutez au moins 3 déterminations ; aucun résultat ne s'écarte de plus de 5 pour cent de la moyenne des 3 déterminations.

01/2008:20102

## 2.1.2. TABLEAU DE COMPARAISON DES FILTRES DE VERRE FRITTÉ(1)

Tableau 2.1.2.-1

| Numéro de porosité (Ph. Eur.)(2) | Diamètre maximal des pores en micromètres | Allemagne | France | Royaume-Uni |
|---|---|---|---|---|
| 1,6 | inférieur à 1,6 | 5f | – | – |
| – | 1 - 2,5 | 5 | – | 5 |
| 4 | 1,6 - 4 | – | – | – |
| – | 4 - 6 | – | 5 | – |
| 10 | 4 - 10 | 4f | – | 4 |
| 16 | 10 - 16 | 4 | 4 | – |
| 40 | 16 - 40 | 3 | 3 | 3 |
| – | 40 - 50 | – | – | 2 |
| 100 | 40 - 100 | 2 | 2 | – |
| – | 100 - 120 | – | – | 1 |
| 160 | 100 - 160 | 1 | 1 | – |
| – | 150 - 200 | 0 | 0 | – |
| 250 | 160 - 250 | – | – | – |
| – | 200 - 500 | – | 00 | – |

*Usages spéciaux*

| *Diamètre en micromètres* | |
|---|---|
| < 2,5 | filtration bactériologique |
| 4 à 10 | filtration ultrafine, séparation de microorganismes de fort diamètre |
| 10 - 40 | filtration analytique, filtration très fine de mercure, dispersion très fine de gaz |
| 40 - 100 | filtration fine, filtration de mercure, dispersion fine de gaz |
| 100 - 160 | filtration de matériaux grossiers, dispersion et lavage de gaz, support pour autres matériaux de filtration |
| 160 - 500 | filtration de matériaux très grossiers, dispersion et lavage de gaz |

01/2008:20103

## 2.1.3. LAMPES À RAYONNEMENT ULTRAVIOLET POUR ANALYSES

Utilisez, comme source de rayonnement ultraviolet, une lampe de quartz à vapeur de mercure. Un filtre approprié permet d'éliminer les radiations visibles du spectre émises par cette lampe.

Lorsqu'il est précisé dans la Pharmacopée que l'examen est fait en lumière ultraviolette à 254 nm ou à 365 nm, utilisez un dispositif composé d'une lampe à vapeur de mercure et d'un filtre dont le spectre de rayonnement présente une bande d'intensité maximale au voisinage de 254 nm ou de 365 nm. La lampe doit pouvoir révéler avec certitude une tache témoin de salicylate de sodium de 5 mm environ de diamètre placée normalement à la source sur un support de *gel de silice G R*.

Préparez à cet effet une solution de *salicylate de sodium R* dans l' *alcool R*(3) à 0,4 g/L pour l'examen à 254 nm et à 2 g/L pour l'examen à 365 nm. Déposez sur la plaque 5 µL de chaque solution. La distance entre la lampe et la plaque à examiner dans un essai prescrit dans la Pharmacopée ne doit pas être supérieure à la distance observée dans le contrôle prescrit ci-dessus.

(1) Les limites indiquées ne sont qu'approximatives.
(2) La Pharmacopée Européenne a repris le système proposé par l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO).
(3) Vérifiez que l'*alcool R* utilisé n'est pas fluorescent.

**01/2008:20104**

## 2.1.4. TAMIS

Les tamis sont fabriqués avec des matières appropriées et comportent des mailles carrées. Pour les opérations qui ne sont pas destinées à l'analyse, des tamis à mailles circulaires dont le diamètre intérieur est égal à 1,25 fois l'ouverture des mailles carrées du tamis correspondant peuvent être utilisés. Il ne devrait se produire aucune réaction entre les produits à tamiser et le matériel pour tamisage. Le degré de division prescrit dans la monographie est désigné par le numéro du tamis qui indique la largeur des mailles en micromètres et figure entre parenthèses à la suite du nom de la substance (tableau 2.1.4.-1).

Tolérance maximale[(4)] sur une ouverture + $X$ : aucune dimension d'ouverture ne doit dépasser la dimension nominale de plus de $X$ avec :

$$X = \frac{2\left(w^{0,75}\right)}{3} + 4\left(w^{0,25}\right)$$

$w$ = ouverture de maille.

Tolérance sur la moyenne des ouvertures ± $Y$ : l'ouverture moyenne ne doit pas s'écarter de l'ouverture nominale de plus de ± $Y$ avec :

$$Y = \frac{w^{0,98}}{27} + 1,6$$

Tolérance intermédiaire + $Z$ : pas plus de 6 pour cent du total des ouvertures du tamis ne doit avoir des dimensions comprises entre les limites de « nominal + $X$ » et « nominal + $Z$ » avec :

$$Z = \frac{X + Y}{2}$$

Diamètre du fil $d$ : les diamètres de fils donnés dans le tableau 2.1.4.-1 s'appliquent à la toile métallique montée dans un cadre. Les dimensions nominales recommandées des diamètres de fil peuvent s'écarter de ces valeurs dans les limites $d_{max}$ et $d_{min}$. Ces limites correspondent à un intervalle de ± 15 pour cent par rapport aux dimensions nominales recommandées. Dans un tamis de contrôle, les fils de trame et de chaîne doivent avoir le même diamètre nominal.

Tableau 2.1.4.-1 (*valeurs en micromètres*)

| Numéro des tamis (Dimensions nominales des ouvertures) | Tolérance sur les ouvertures | | | Diamètre du fil | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tolérance maximale sur une ouverture | Tolérance sur la moyenne des ouvertures | Tolérance intermédiaire | Dimensions nominales recommandées | Dimensions limites admissibles | |
| | **+ $X$** | **± $Y$** | **+ $Z$** | **$d$** | **$d_{max}$** | **$d_{min}$** |
| 11 200 | 770 | 350 | 560 | 2500 | 2900 | 2100 |
| 8000 | 600 | 250 | 430 | 2000 | 2300 | 1700 |
| 5600 | 470 | 180 | 320 | 1600 | 1900 | 1300 |
| 4000 | 370 | 130 | 250 | 1400 | 1700 | 1200 |
| 2800 | 290 | 90 | 190 | 1120 | 1300 | 950 |
| 2000 | 230 | 70 | 150 | 900 | 1040 | 770 |
| 1400 | 180 | 50 | 110 | 710 | 820 | 600 |
| 1000 | 140 | 30 | 90 | 560 | 640 | 480 |
| 710 | 112 | 25 | 69 | 450 | 520 | 380 |
| 500 | 89 | 18 | 54 | 315 | 360 | 270 |
| 355 | 72 | 13 | 43 | 224 | 260 | 190 |
| 250 | 58 | 9.9 | 34 | 160 | 190 | 130 |
| 180 | 47 | 7.6 | 27 | 125 | 150 | 106 |
| 125 | 38 | 5.8 | 22 | 90 | 104 | 77 |
| 90 | 32 | 4.6 | 18 | 63 | 72 | 54 |
| 63 | 26 | 3.7 | 15 | 45 | 52 | 38 |
| 45 | 22 | 3.1 | 13 | 32 | 37 | 27 |
| 38 | – | – | – | 30 | 35 | 24 |

(4) Voir Norme Internationale ISO 3310/1 (1975).

**01/2008:20105**

## 2.1.5. TUBES POUR ESSAIS COMPARATIFS

Les tubes pour essais comparatifs sont des tubes calibrés de verre incolore, de diamètre intérieur uniforme et dont le fond est transparent et plat.

Examinez la colonne de liquide dans l'axe vertical du tube, sur fond blanc, ou si nécessaire, sur fond noir. Appréciez les nuances en lumière diffuse.

Il est supposé que des tubes d'un diamètre intérieur de 16 mm seront utilisés. Des tubes d'un diamètre intérieur supérieur à 16 mm peuvent également être utilisés et, dans ce cas, le volume de liquide examiné doit être augmenté pour que l'épaisseur de la couche dans les tubes ne soit pas inférieure à celle obtenue lorsque le volume prescrit de liquide et des tubes d'un diamètre intérieur de 16 mm sont employés.

**01/2008:20106**

## 2.1.6. TUBES DÉTECTEURS DE GAZ

Les tubes détecteurs de gaz sont des tubes cylindriques scellés, constitués d'un matériau inerte transparent et construits de façon à permettre le passage d'un gaz. Ils contiennent des réactifs adsorbés sur des supports inertes appropriés à la révélation de la substance à détecter et, si nécessaire, des couches préliminaires et/ou des filtres adsorbants destinés à l'élimination de substances interférant avec la substance à détecter. La couche indicatrice contient soit un réactif unique pour la détection d'une impureté donnée soit plusieurs réactifs pour la détection de plusieurs substances (tube détecteur monocouche et multicouche).

Effectuez l'essai en faisant passer le volume requis du gaz à examiner dans le tube indicateur. La longueur de la couche colorée ou l'intensité d'un changement de la coloration sur une échelle graduée fournissent des indications relatives aux impuretés présentes dans le gaz.

La vérification de l'étalonnage des tubes détecteurs est effectuée selon les instructions du fabricant.

*Mode opératoire.* Opérez suivant les instructions du fabricant ou procédez comme suit :

Le récipient du gaz à examiner est raccordé à un régulateur de pression approprié et une vanne à pointeau. Raccordez le tube souple muni d'une pièce en « Y » à la vanne et ajustez le débit du gaz à examiner afin de purger le tube pour obtenir un débit approprié (voir figure 2.1.6.-1). Préparez le tube indicateur et raccordez-le à la pompe de dosage conformément aux instructions du fabricant. Raccordez l'ouverture du tube indicateur au segment court du tube et actionnez la pompe pour faire passer dans le tube un volume approprié de gaz à examiner. Lisez la valeur correspondant à la longueur de la couche colorée ou à l'intensité de la coloration sur l'échelle graduée. En cas de résultat négatif, vérifiez les tubes indicateurs avec un gaz d'étalonnage contenant l'impureté appropriée.

En raison de la grande diversité des huiles pour compresseurs, il est nécessaire de vérifier la réactivité des tubes détecteurs d'huile vis-à-vis de l'huile utilisée. La notice fournie avec chaque tube donne des informations sur sa réactivité vis-à-vis de différentes huiles. Si l'huile utilisée n'y est pas citée, le fabricant du tube doit vérifier la réactivité du tube et, si nécessaire, fournir un tube spécifique pour cette huile.

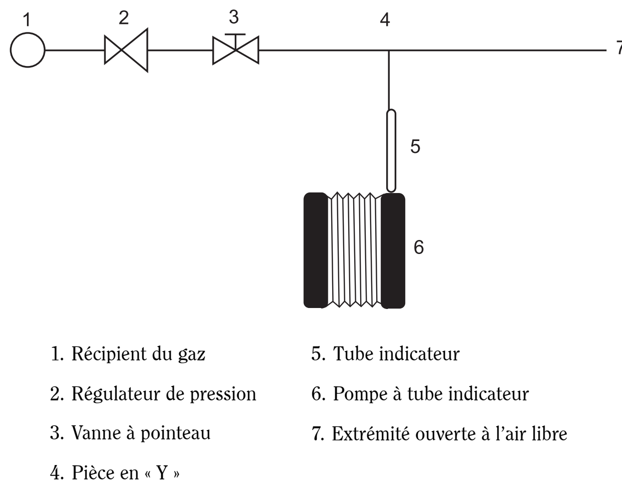



Figure 2.1.6.-1. – *Appareillage pour les tubes détecteurs de gaz*

**Tube détecteur de dioxyde de carbone**. Tube de verre scellé contenant des filtres adsorbants et des supports appropriés pour les indicateurs hydrazine et violet cristallisé. La valeur minimale indiquée est de 100 ppm avec un écart type relatif de ± 15 pour cent au maximum.

**Tube détecteur de dioxyde de soufre**. Tube de verre scellé contenant des filtres adsorbants et supports appropriés pour l'indicateur iode-amidon. La valeur minimale indiquée est de 0,5 ppm avec un écart type relatif de ± 15 pour cent au maximum.

**Tube détecteur d'huile**. Tube de verre scellé contenant des filtres adsorbants et des supports appropriés pour l'indicateur acide sulfurique. La valeur minimale indiquée est de 0,1 $mg/m^3$ avec un écart type relatif de ± 30 pour cent au maximum.

**Tube détecteur de monoxyde d'azote et de dioxyde d'azote**. Tube de verre scellé contenant des filtres adsorbants et des supports appropriés pour une couche oxydante (sel de Cr(VI)) et pour l'indicateur diphénylbenzidine. La valeur minimale indiquée est de 0,5 ppm avec un écart type relatif de ± 15 pour cent au maximum.

**Tube détecteur de monoxyde de carbone**. Tube de verre scellé contenant des filtres adsorbants et des supports appropriés pour les indicateurs pentoxyde de diiode, dioxyde de sélénium et acide sulfurique fumant. La valeur minimale indiquée est de 5 ppm ou moins, avec un écart type relatif de ± 15 pour cent au maximum.

**Tube détecteur de sulfure d'hydrogène**. Tube de verre scellé contenant des filtres adsorbants et des supports appropriés pour l'indicateur sel de plomb approprié. La valeur minimale indiquée est de 1 ppm ou moins, avec un écart type relatif de ± 10 pour cent au maximum.

**Tube détecteur de vapeur d'eau**. Tube de verre scellé contenant des filtres adsorbants et des supports appropriés pour l'indicateur perchlorate de magnésium. La valeur minimale indiquée est de 67 ppm ou moins, avec un écart type relatif de ± 20 pour cent au maximum.

# 2.2. MÉTHODES PHYSIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES

# 2.2. MÉTHODES PHYSIQUES ET PHYSICOCHIMIQUES

**01/2008:20201**

## 2.2.1. LIMPIDITÉ ET DEGRÉ D'OPALESCENCE DES LIQUIDES

MÉTHODE VISUELLE

Dans des tubes à essai identiques, de verre neutre, incolore et transparent, d'un diamètre intérieur de 15-25 mm et à fond plat, comparez le liquide à examiner et la suspension témoin extemporanée décrite ci-après, l'épaisseur de la couche étant de 40 mm. 5 min après la préparation de la suspension témoin, examinez les liquides dans l'axe du tube sur fond noir en opérant à la lumière diffuse du jour. La diffusion de la lumière doit être telle qu'elle permette de différencier facilement la suspension témoin I de l'*eau R* et la suspension témoin II de la suspension témoin I.

Un liquide est considéré comme *limpide* si sa limpidité correspond à celle de l'*eau R* ou du solvant utilisé dans les conditions opératoires indiquées ci-dessus, ou si son opalescence n'est pas plus prononcée que celle de la suspension témoin I.

**Solution de sulfate d'hydrazine**. Dissolvez 1,0 g de *sulfate d'hydrazine R* dans de l'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Laissez reposer pendant 4-6 h.

**Solution d'hexaméthylènetétramine**. Dans une fiole de 100 mL à bouchon rodé, dissolvez 2,5 g d'*hexaméthylènetétramine R* dans 25,0 mL d'*eau R*.

**Suspension-mère d'opalescence** (suspension de formazine). Prélevez 25,0 mL de solution de sulfate d'hydrazine. Introduisez-les dans la fiole contenant la solution d'hexaméthylènetétramine. Mélangez. Laissez reposer pendant 24 h. Cette suspension peut être conservée pendant 2 mois dans un récipient de verre exempt de défauts de surface. La suspension ne doit pas adhérer aux parois du récipient et doit être soigneusement mélangée avant emploi.

**Etalon d'opalescence**. Prélevez 15,0 mL de suspension-mère d'opalescence et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*. Cette suspension est préparée au moment de l'emploi et peut être conservée pendant au plus 24 h.

**Suspensions témoins**. Préparez les suspensions témoins comme indiqué dans le tableau 2.2.1.-1. Mélangez et agitez avant l'emploi.

Tableau 2.2.1.-1

| | I | II | III | IV |
|---|---|---|---|---|
| Étalon d'opalescence | 5,0 mL | 10,0 mL | 30,0 mL | 50,0 mL |
| *Eau R* | 95,0 mL | 90,0 mL | 70,0 mL | 50,0 mL |

**Etalon de turbidité**. La suspension de formazine préparée par mélange à volumes égaux de la solution de sulfate d'hydrazine et de la solution d'hexaméthylènetétramine est définie comme étalon primaire à 4000 UTN (unités de turbidité néphélométrique). Les valeurs des suspensions témoins I, II, III et IV sont respectivement de 3 UTN, 6 UTN, 18 UTN et 30 UTN. Il existe dans le commerce des suspensions de formazine stabilisées pouvant être utilisées pour préparer des étalons de turbidité dilués stables, après comparaison avec les étalons préparés comme décrit.

La formazine est un excellent étalon de turbidité à plusieurs titres. Elle peut être préparée de façon reproductible à partir de matières premières dosées. Ses caractéristiques physiques en font un étalon bien adapté aux mesures de diffusion de la lumière. Sous forme de polymère, elle se compose de chaînes de différentes longueurs repliées selon des configurations aléatoires. Il en résulte une grande diversité des formes et tailles de particules, qui permet l'analyse des divers types de particules susceptibles d'être présents dans les échantillons réels. La reproductibilité de la préparation de la formazine, ses propriétés de diffusion et sa traçabilité en font l'étalon généralement utilisé pour établir les algorithmes d'étalonnage des instruments et les critères de performance.

MÉTHODES INSTRUMENTALES

*INTRODUCTION*

Le degré d'opalescence peut également être déterminé par des méthodes instrumentales, qui reposent sur la mesure de l'effet d'absorption ou de diffusion de la lumière résultant de l'existence d'inhomogénéités de densité optique, à l'échelle submicroscopique, dans les solutions et suspensions opalescentes. La néphélométrie et la turbidimétrie sont 2 des techniques utilisées à cette fin. Pour les mesures turbidimétriques portant sur des échantillons colorés, la turbidimétrie à ratio et la néphélométrie en mode ratio sont utilisées.

L'effet de diffusion de la lumière par les particules en suspension peut être mesuré par observation de la lumière transmise (turbidimétrie) ou de la lumière diffusée (néphélométrie). La turbidimétrie à ratio combine les principes de la néphélométrie et de la turbidimétrie. La turbidimétrie et la néphélométrie sont utiles pour les mesures portant sur des suspensions faiblement opalescentes. Elles nécessitent l'emploi de suspensions témoins préparées dans des conditions bien définies. Pour les mesures quantitatives, il est indispensable d'établir une courbe d'étalonnage, car la relation entre les propriétés optiques de la suspension et la concentration de la phase dispersée est au mieux semi-empirique.

La mesure du degré d'opalescence des liquides colorés s'effectue à l'aide de turbidimètres à ratio ou de néphélomètres possédant un mode ratio. La coloration, en atténuant à la fois la lumière incidente et la lumière diffusée, introduit en effet une interférence négative et abaisse la turbidité mesurée. L'ampleur de cet effet, même dans des échantillons modérément colorés, interdit l'utilisation de néphélomètres conventionnels.

Pour l'évaluation de la limpidité et de l'opalescence, l'approche instrumentale constitue une méthode d'essai plus discriminante que l'examen visuel et non tributaire de l'acuité visuelle de l'analyste. L'obtention de résultats numériques est surtout utile pour le suivi de la qualité et la maîtrise des processus, en particulier lors des études de stabilité. On peut par exemple projeter des données numériques précédemment acquises sur la stabilité pour déterminer si un lot donné d'une formulation ou d'une substance active risque de se trouver hors spécifications avant sa date de péremption.

*NÉPHÉLOMÉTRIE*

Lorsqu'une suspension est examinée sous les angles perpendiculaires à la direction de la lumière incidente, le système apparaît opalescent en raison de la réflexion de la lumière sur les particules présentes dans la suspension (effet Tyndall). Le faisceau incident qui pénètre dans un liquide trouble est en partie transmis, en partie absorbé et en partie diffusé par les particules en suspension. Si la mesure est effectuée sous un angle de 90° par rapport au faisceau incident, la lumière diffusée par ces particules permet de déterminer leur concentration, à condition que le nombre et la taille des particules influant sur la diffusion restent constants. Les suspensions témoins doivent présenter un niveau constant de turbidité et être préparées dans les mêmes conditions que les échantillons à examiner. L'effet Tyndall dépend à la fois du nombre et de la taille des particules. Les mesures néphélométrique sont plus fiables dans le domaine des faibles turbidités, où il existe une relation linéaire entre la turbidité exprimée en unité de turbidité néphélométrique (UTN) et le signal relatif délivré par le détecteur. Lorsque le niveau de turbidité augmente, il se pose en revanche un double problème : certaines des particules ne sont pas exposées au faisceau incident et le rayonnement diffusé par les autres particules est empêché de parvenir au détecteur. Les valeurs

néphélométriques maximales pouvant être mesurées de façon fiable sont de l'ordre de 1750-2000 UTN. Il convient d'établir la linéarité en construisant une courbe d'étalonnage à partir d'au moins 4 concentrations.

*TURBIDIMÉTRIE*

La turbidité exprime la propriété optique qui fait que, en raison de l'interaction entre la lumière et les particules en suspension dans un liquide, la lumière est diffusée et absorbée plutôt que transmise en ligne droite à travers l'échantillon. Elle permet de déterminer la quantité de matière solide en suspension par mesure de l'intensité de la lumière transmise. Une relation linéaire entre turbidité et concentration est obtenue lorsque la taille des particules en suspension est uniforme et homogène. Cette condition n'est réalisée que dans les suspensions très diluées contenant des particules de petite taille. Il convient d'établir la linéarité de la relation turbidité-concentration en construisant une courbe d'étalonnage à partir d'au moins 4 concentrations.

*TURBIDIMÉTRIE À RATIO*

En turbidimétrie à ratio, on détermine le rapport entre la mesure de la lumière transmise et la mesure de la lumière diffusée à 90°. Cette approche permet de compenser l'affaiblissement du signal qui résulte de la coloration de l'échantillon. On peut également éliminer l'influence de la coloration en utilisant comme source lumineuse une diode électroluminescente émettant dans l'infrarouge (LED-IR) à 860 nm. Les détecteurs à photodiode de l'instrument reçoivent et mesurent d'une part la lumière émergente diffusée à un angle de 90°, d'autre part la lumière diffusée vers l'avant de l'échantillon (lumière réfléchie) et la lumière transmise directement à travers l'échantillon. Les résultats de mesure, exprimés en UTN(ratio), sont obtenus par calcul du rapport entre les valeurs mesurées pour la lumière diffusée à 90° et pour la somme des composantes de diffusion vers l'avant et de transmission. En turbidimétrie à ratio, l'influence de la lumière parasite devient négligeable.
Les néphélomètres sont utilisés pour mesurer le degré d'opalescence des liquides incolores.
Les mesures effectuées sur les suspensions témoins I-IV avec un turbidimètre à ratio montrent l'existence d'une relation linéaire entre les concentrations et les valeurs UTN obtenues (voir tableau 2.2.1.-2). Les suspensions témoins I-IV de la Ph. Eur. peuvent être utilisées pour l'étalonnage des instruments.

Tableau 2.2.1.-2

| Suspensions de formazine | Valeurs d'opalescence (UTN) |
|---|---|
| Suspension témoin I | 3 |
| Suspension témoin II | 6 |
| Suspension témoin III | 18 |
| Suspension témoin IV | 30 |
| Etalon d'opalescence | 60 |
| Suspension-mère d'opalescence | 4000 |

*DÉTERMINATION INSTRUMENTALE DE L'OPALESCENCE*

Les exigences des monographies sont exprimées par référence à la méthode visuelle et par comparaison aux suspensions témoins définies. Toutefois, les méthodes instrumentales peuvent également être utilisées pour vérifier la conformité aux exigences des monographies, dès lors que l'adéquation de l'instrument (voir ci-après) a été établie et qu'il a été étalonné avec les suspensions témoins I-IV et avec de l'*eau R* ou le solvant utilisé.
*Appareillage*. Les turbidimètres à ratio ou les néphélomètres possédant un mode ratio utilisent comme source lumineuse soit une lampe à filament de tungstène ayant une sensibilité spectrale d'environ 550 nm et opérant à une température de couleur de 2700 K, soit une LED-IR ayant une émission maximale à 860 nm et une largeur de bande spectrale de 60 nm. D'autres sources lumineuses appropriées peuvent également être utilisées. Les photodiodes au silicium et les photomultiplicateurs sont couramment employés comme détecteurs et enregistrent les variations de l'intensité lumineuse diffusée ou transmise par l'échantillon. La lumière diffusée à 90 ± 2,5° est détectée par le détecteur primaire, tandis que d'autres détecteurs servent à mesurer le rayonnement rétrodiffusé ou diffusé vers l'avant, ainsi que la lumière transmise. Les instruments utilisés sont étalonnés au moyen de préparations de turbidité connue et permettent des mesures automatiques de la turbidité. Les résultats exprimés en UTN sont directement fournis par l'instrument et comparés aux spécifications de la monographie considérée.

Les instruments répondant aux spécifications suivantes sont appropriés.

– *Unités de mesure* : UTN ; l'UTN est définie à partir de la turbidité d'un étalon primaire de formazine. Les unités UTF (unité turbidimétrique formazine) et UNF (unité néphélométrique formazine) sont également utilisées et sont équivalentes à l'UTN dans les basses régions (jusqu'à 40 UTN). Ces unités sont utilisées pour les 3 méthodes instrumentales (néphélométrie, turbidimétrie et turbidimétrie à ratio).
– *Intervalle de mesure* : 0,01-1100 UTN.
– *Résolution* : 0,01 UTN sur l' intervalle 1-10 UTN, 0,1 UTN sur l'intervalle 10-100 UTN et 1 UTN au-delà de 100 UTN ; l'instrument est étalonné et réglé à l'aide d'étalons de formazine.
– *Exactitude* : 0-10 UTN : ± (2 pour cent de la valeur lue + 0,01) UTN. 10-1000 UTN : ± 5 pour cent.
– *Répétabilité* : 0-10 UTN : ± 0,01 UTN, 10-1000 UTN : ± 2 pour cent de la valeur mesurée.
– *Étalonnage* : avec 4 suspensions témoins de formazine comprises dans l'intervalle de mesure ; les suspensions témoins décrites dans le présent chapitre ou des étalons appropriés établis par rapport aux suspensions de référence primaires peuvent être utilisés.
– *Lumière parasite* : source d'erreur significative aux faibles niveaux de turbidité ; la lumière parasite atteint le détecteur du système optique sans provenir de l'échantillon ; < 0,15 UTN sur l'intervalle 0-10 UTN, < 0,5 UTN sur l'intervalle 10-1000 UTN.

L'emploi d'instruments répondant à ces critères et vérifiés au moyen des suspensions témoins décrites sous Méthode visuelle peut remplacer l'examen visuel pour l'évaluation de la conformité aux exigences des monographies.

Des instruments présentant des caractéristiques (intervalle de mesure, résolution, exactitude, répétabilité) autres que celles mentionnées ci-dessus peuvent également être utilisés sous réserve d'avoir fait l'objet d'une validation suffisante et d'être adaptés à l'usage considéré. La méthodologie utilisée pour la substance ou le produit spécifique à analyser doit également faire l'objet d'une validation portant sur ses performances analytiques. L'instrument et la méthodologie doivent être adaptés aux propriétés du produit à examiner.

**01/2008:20202**

## 2.2.2. DEGRÉ DE COLORATION DES LIQUIDES

Pour apprécier le degré de coloration des liquides dans les teintes brun-jaune-rouge, utilisez l'un des 2 procédés ci-après, précisé dans la monographie.

Une solution est dite *incolore* si elle a l'aspect de l'*eau R* ou du solvant, ou si elle n'est pas plus colorée que la solution témoin $B_9$.

PROCÉDÉ I

Dans des tubes à essai identiques, de verre neutre, incolore et transparent, d'un diamètre extérieur de 12 mm, comparez 2,0 mL du liquide à examiner à 2,0 mL d'*eau R*, de solvant ou

de la solution témoin (voir tableaux des solutions témoins) prescrite dans la monographie. Appréciez les nuances à la lumière diffuse du jour par examen horizontal sur fond blanc.

PROCÉDÉ II

Dans des tubes à essai identiques, de verre neutre, incolore et transparent, d'un diamètre intérieur de 15 mm à 25 mm et à fond plat, comparez le liquide à examiner à l'*eau R*, au solvant ou à la solution témoin (voir tableaux des solutions témoins) prescrite dans la monographie, l'épaisseur de la couche étant de 40 mm. Appréciez les nuances à la lumière diffuse du jour par examen dans l'axe du tube sur fond blanc.

RÉACTIFS

**Solutions primaires**

*Solution jaune*. Dissolvez 46 g de *chlorure ferrique R* dans 900 mL environ d'un mélange de 25 mL d'*acide chlorhydrique R* et de 975 mL d'*eau R*, puis complétez à 1000,0 mL avec le même mélange. Titrez et ajustez la solution à 45,0 mg de $FeCl_3,6H_2O$ par millilitre, par addition du même mélange acide. Conservez à l'abri de la lumière.

*Titrage*. Dans une fiole conique de 250 mL à bouchon rodé, introduisez 10,0 mL de la solution, 15 mL d'*eau R*, 5 mL d'*acide chlorhydrique R* et 4 g d'*iodure de potassium R*. Fermez la fiole, laissez reposer à l'obscurité pendant 15 min, puis ajoutez 100 mL d'*eau R*. Titrez l'iode libéré par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* en présence de 0,5 mL de *solution d'amidon R* ajouté en fin de titrage.

1 mL de *thiosulfate de sodium 0,1 M* correspond à 27,03 mg de $FeCl_3,6H_2O$.

*Solution rouge*. Dissolvez 60 g de *chlorure de cobalt R* dans 900 mL environ d'un mélange de 25 mL d'*acide chlorhydrique R* et de 975 mL d'*eau R*, puis complétez à 1000,0 mL avec le même mélange. Titrez et ajustez la solution à 59,5 mg de $CoCl_2,6H_2O$ par millilitre, par addition du même mélange acide.

*Titrage*. Dans une fiole conique de 250 mL à bouchon rodé, introduisez 5,0 mL de la solution, 5 mL de *solution diluée de peroxyde d'hydrogène R* et 10 mL de solution d'*hydroxyde de sodium R* à 300 g/L. Faites bouillir doucement pendant 10 min, laissez refroidir, puis ajoutez 60 mL d'*acide sulfurique dilué R* et 2 g d'*iodure de potassium R*. Fermez la fiole et dissolvez le précipité en agitant doucement. Titrez l'iode libéré par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* jusqu'à coloration rose, en présence de 0,5 mL de *solution d'amidon R* ajouté en fin de titrage.

1 mL de *thiosulfate de sodium 0,1 M* correspond à 23,79 mg de $CoCl_2,6H_2O$.

*Solution bleue*. Dissolvez 63 g de *sulfate de cuivre R* dans 900 mL environ d'un mélange de 25 mL d'*acide chlorhydrique R* et de 975 mL d'*eau R*, puis complétez à 1000,0 mL avec le même mélange. Titrez et ajustez la solution à 62,4 mg de $CuSO_4,5H_2O$ par millilitre, par addition du même mélange acide.

*Titrage*. Dans une fiole conique de 250 mL à bouchon rodé, introduisez 10,0 mL de la solution, 50 mL d'*eau R*, 12 mL d'*acide acétique dilué R* et 3 g d'*iodure de potassium R*. Titrez l'iode libéré par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* jusqu'à faible coloration brun clair en présence de 0,5 mL de *solution d'amidon R* ajouté en fin de titrage.

1 mL de *thiosulfate de sodium 0,1 M* correspond à 24,97 mg de $CuSO_4,5H_2O$.

**Solutions étalons**

A partir des 3 solutions primaires, préparez 5 solutions étalons comme suit (tableau 2.2.2.-1) :

Tableau 2.2.2.-1

| Solution étalon | Volumes en millilitres | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Solution jaune | Solution rouge | Solution bleue | Acide chlorhydrique à 10 g/L de HCl |
| B (brun) | 3,0 | 3,0 | 2,4 | 1,6 |
| JB (jaune-brun) | 2,4 | 1,0 | 0,4 | 6,2 |
| J (jaune) | 2,4 | 0,6 | 0,0 | 7,0 |
| JV (jaune-vert) | 9,6 | 0,2 | 0,2 | 0,0 |
| R (rouge) | 1,0 | 2,0 | 0,0 | 7,0 |

**Solutions témoins utilisées dans les Procédés I et II**

A partir de ces 5 solutions étalons, préparez les solutions témoins suivantes (tableaux 2.2.2.-2 à 2.2.2.-6) :

Tableau 2.2.2.-2. - *Solutions témoins B*

| Solution témoin | Volumes en millilitres | |
|---|---|---|
| | Solution étalon B | Acide chlorhydrique à 10 g/L de HCl |
| $B_1$ | 75,0 | 25,0 |
| $B_2$ | 50,0 | 50,0 |
| $B_3$ | 37,5 | 62,5 |
| $B_4$ | 25,0 | 75,0 |
| $B_5$ | 12,5 | 87,5 |
| $B_6$ | 5,0 | 95,0 |
| $B_7$ | 2,5 | 97,5 |
| $B_8$ | 1,5 | 98,5 |
| $B_9$ | 1,0 | 99,0 |

Tableau 2.2.2.-3. - *Solutions témoins JB*

| Solution témoin | Volumes en millilitres | |
|---|---|---|
| | Solution étalon JB | Acide chlorhydrique à 10 g/L de HCl |
| $JB_1$ | 100,0 | 0,0 |
| $JB_2$ | 75,0 | 25,0 |
| $JB_3$ | 50,0 | 50,0 |
| $JB_4$ | 25,0 | 75,0 |
| $JB_5$ | 12,5 | 87,5 |
| $JB_6$ | 5,0 | 95,0 |
| $JB_7$ | 2,5 | 97,5 |

Tableau 2.2.2.-4. - *Solutions témoins J*

| Solution témoin | Volumes en millilitres | |
|---|---|---|
| | Solution étalon J | Acide chlorhydrique à 10 g/L de HCl |
| $J_1$ | 100,0 | 0,0 |
| $J_2$ | 75,0 | 25,0 |
| $J_3$ | 50,0 | 50,0 |
| $J_4$ | 25,0 | 75,0 |
| $J_5$ | 12,5 | 87,5 |
| $J_6$ | 5,0 | 95,0 |
| $J_7$ | 2,5 | 97,5 |

2. Méthodes analytiques

Tableau 2.2.2.-5. - *Solutions témoins JV*

| Solution témoin | Volumes en millilitres | |
|---|---|---|
| | Solution étalon JV | Acide chlorhydrique à 10 g/L de HCl |
| $JV_1$ | 25,0 | 75,0 |
| $JV_2$ | 15,0 | 85,0 |
| $JV_3$ | 8,5 | 91,5 |
| $JV_4$ | 5,0 | 95,0 |
| $JV_5$ | 3,0 | 97,0 |
| $JV_6$ | 1,5 | 98,5 |
| $JV_7$ | 0,75 | 99,25 |

Tableau 2.2.2.-6. - *Solutions témoins R*

| Solution témoin | Volumes en millilitres | |
|---|---|---|
| | Solution étalon R | Acide chlorhydrique à 10 g/L de HCl |
| $R_1$ | 100,0 | 0,0 |
| $R_2$ | 75,0 | 25,0 |
| $R_3$ | 50,0 | 50,0 |
| $R_4$ | 37,5 | 62,5 |
| $R_5$ | 25,0 | 75,0 |
| $R_6$ | 12,5 | 87,5 |
| $R_7$ | 5,0 | 95,0 |

**Conservation**

Pour le Procédé I, les solutions témoins peuvent être conservées dans des tubes à essai scellés, de verre neutre, incolore et transparent, d'un diamètre extérieur de 12 mm, à l'abri de la lumière.

Pour le Procédé II, préparez les solutions témoins immédiatement avant l'emploi, à partir des solutions étalons.

**01/2008:20203**

## 2.2.3. DÉTERMINATION POTENTIOMÉTRIQUE DU pH

Le pH est un nombre qui représente conventionnellement la concentration en ions hydrogène d'une solution aqueuse. Pour des raisons pratiques, sa définition est expérimentale. Le pH d'une solution à examiner s'exprime alors par rapport à celui d'une solution de référence ($pH_s$) suivant l'équation :

$$\mathrm{pH} = \mathrm{pH_s} - \frac{E - E_s}{k}$$

dans laquelle $E$ est la tension, exprimée en volts, de la cellule renfermant la solution à examiner, $E_s$ la tension, exprimée en volts, de la cellule renfermant la solution de pH connu ($pH_s$) et $k$ la variation de tension par variation d'une unité pH, exprimée en volts et calculée par l'équation de Nernst.

Tableau 2.2.3.-1. − *Valeurs de k à différentes températures*

| Température (°C) | *k* (V) |
|---|---|
| 15 | 0,0572 |
| 20 | 0,0582 |
| 25 | 0,0592 |
| 30 | 0,0601 |
| 35 | 0,0611 |

La détermination potentiométrique du pH est effectuée par mesure de la différence de potentiel entre 2 électrodes judicieusement choisies plongeant dans la solution à examiner ; l'une de celles-ci est une électrode sensible aux ions hydrogène (le plus souvent, une électrode de verre) et l'autre une électrode de référence (par exemple, une électrode au calomel saturée).

*Appareil.* L'appareil de mesure est un voltmètre habituellement gradué en unités pH. Sa résistance d'entrée doit être au moins 100 fois supérieure à celle des électrodes utilisées et sa sensibilité doit être au minimum de 0,05 unité pH, soit au minimum 0,003 V.

*Mode opératoire.* Sauf avis contraire dans la monographie, effectuez toutes les mesures à la même température (20-25 °C). Le tableau 2.2.3.-2 indique les valeurs de pH de quelques solutions tampons de référence préconisées pour l'étalonnage, en fonction de la température. Pour une éventuelle correction de température, il est recommandé de se conformer aux instructions du constructeur. Etalonnez l'appareil avec la solution tampon de phtalate acide de potassium (étalon primaire) et une autre solution tampon de pH différent (de préférence une de celles figurant dans le tableau 2.2.3.-2). Le pH d'une troisième solution tampon de pH intermédiaire lu sur l'échelle ne doit pas différer de plus de 0,05 unité pH de la valeur correspondant à cette solution. Plongez les électrodes dans la solution à examiner et effectuez la lecture dans les mêmes conditions que pour les solutions tampons.

En cas d'utilisation fréquente de l'appareil, effectuez le contrôle régulièrement. Dans le cas contraire, il est indispensable de l'effectuer avant chaque mesure.

Tableau 2.2.3.-2. − *Variation du pH des solutions tampons en fonction de la température*

| Température (°C) | Tétraoxalate de potassium 0,05 M | Tartrate acide de potassium saturé à 25 °C | Citrate monopotassique 0,05 M | Phtalate acide de potassium 0,05 M | Phosphate monopotassique 0,025 M + phosphate disodique 0,025 M | Phosphate monopotassique 0,0087 M + phosphate disodique 0,0303 M | Tétraborate de disodium 0,01 M | Carbonate de sodium 0,025 M + bicarbonate de sodium 0.025 M | Hydroxyde de calcium saturé à 25°C |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $C_4H_3KO_8,2H_2O$ | $C_4H_5KO_6$ | $C_6H_7KO_7$ | $C_8H_5KO_4$ | $KH_2PO_4$+ $Na_2HPO_4$ | $KH_2PO_4$+ $Na_2HPO_4$ | $Na_2B_4O_7$, $10H_2O$ | $Na_2CO_3$+ $NaHCO_3$ | $Ca(OH)_2$ |
| 15 | 1,67 | | 3,80 | 4,00 | 6,90 | 7,45 | 9,28 | 10,12 | 12,81 |
| 20 | 1,68 | | 3,79 | 4,00 | 6,88 | 7,43 | 9,23 | 10,06 | 12,63 |
| 25 | 1,68 | 3,56 | 3,78 | 4,01 | 6,87 | 7,41 | 9,18 | 10,01 | 12,45 |
| 30 | 1,68 | 3,55 | 3,77 | 4,02 | 6,85 | 7,40 | 9,14 | 9,97 | 12,29 |
| 35 | 1,69 | 3,55 | 3,76 | 4,02 | 6,84 | 7,39 | 9,10 | 9,93 | 12,13 |
| $\frac{\Delta pH^{(1)}}{\Delta t}$ | + 0,001 | − 0,0014 | − 0,0022 | + 0,0012 | − 0,0028 | − 0,0028 | − 0,0082 | − 0,0096 | − 0,034 |

(1) Variation de pH pour une variation de 1 °C.

Toutes les solutions à examiner et les solutions tampons de référence doivent être préparées au moyen d'*eau exempte de dioxyde de carbone R*.

PRÉPARATION DES SOLUTIONS TAMPONS DE RÉFÉRENCE

**Tétraoxalate de potassium 0,05 M**. Dissolvez 12,61 g de $C_4H_3KO_8,2H_2O$ dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R*, puis complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

**Tartrate acide de potassium saturé à 25 °C**. Agitez vigoureusement un excès de $C_4H_5KO_6$ avec de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R* à 25 °C. Filtrez ou décantez. Préparation extemporanée.

**Citrate monopotassique 0,05 M**. Dissolvez 11,41 g de $C_6H_7KO_7$ dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R*, puis complétez à 1000,0 mL avec le même solvant. Préparation extemporanée.

**Phtalate acide de potassium 0,05 M**. Dissolvez dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R*, 10,13 g de $C_8H_5KO_4$ desséché au préalable à 110 ± 2 °C pendant 1 h, puis complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

**Phosphate monopotassique 0,025 M + phosphate disodique 0,025 M**. Dissolvez dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R*, 3,39 g de $KH_2PO_4$ et 3,53 g de $Na_2HPO_4$ desséchés au préalable à 120 ± 2 °C pendant 2 h, puis complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

**Phosphate monopotassique 0,0087 M + phosphate disodique 0,0303 M**. Dissolvez dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R*, 1,18 g de $KH_2PO_4$ et 4,30 g de $Na_2HPO_4$ desséchés au préalable à 120 ± 2 °C pendant 2 h, puis complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

**Tétraborate de disodium 0,01 M**. Dissolvez 3,80 g de $Na_2B_4O_7,10H_2O$ dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R*, puis complétez à 1000,0 mL avec le même solvant. Conservez à l'abri du dioxyde de carbone de l'air.

**Carbonate de sodium 0,025 M + bicarbonate de sodium 0,025 M**. Dissolvez 2,64 g de $Na_2CO_3$ et 2,09 g de $NaHCO_3$ dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R*, puis complétez à 1000,0 mL avec le même solvant. Conservez à l'abri du dioxyde de carbone atmosphérique.

**Hydroxyde de calcium, saturé à 25 °C**. Agitez un excès d'*hydroxyde de calcium R* avec de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R*. Laissez décanter à 25 °C et séparez le surnageant. Conservez à l'abri du dioxyde de carbone atmosphérique.

CONSERVATION

Conservez les solutions dans des récipients étanches et chimiquement inertes appropriés, par exemple des bouteilles de verre de type I ou des récipients en matière plastique appropriés pour les solutions aqueuses.

**01/2008:20204**

## 2.2.4. CORRESPONDANCE ENTRE LA RÉACTION DU MILIEU, LE pH APPROXIMATIF ET LA COLORATION DE QUELQUES INDICATEURS

A 10 mL de la solution à examiner, ajouter 0,1 mL d'indicateur, sauf indication contraire dans le tableau 2.2.4.-1.

Tableau 2.2.4.-1

| Réaction | pH | Indicateur | Couleur |
|---|---|---|---|
| **Alcaline** | > 8 | *Papier tournesol rouge R* | Bleu |
| Faiblement alcaline | 8,0 – 10,0 | *Solution de bleu de thymol R* (0,05 mL) | Gris ou bleu violacé |
| | | *Solution de phénolphtaléine R* (0,05 mL) | Incolore ou rose |
| Fortement alcaline | > 10 | *Solution de bleu de thymol R* (0,05 mL) | Gris |
| | | *Papier de phénolphtaléine R* | Rouge |
| | | *Solution de bleu de thymol R* (0,05 mL) | Bleu violacé |
| **Neutre** | 6,0 – 8,0 | *Solution de rouge de méthyle R* | Jaune |
| | | *Solution de rouge de phénol R* (0,05 mL) | |
| Neutre au rouge de méthyle | 4,5 – 6,0 | *Solution de rouge de méthyle R* | Rouge orangé |
| Neutre à la phénolphtaléine | < 8,0 | *Solution de phénolphtaléine R* (0,05 mL) | Incolore ; rose ou rouge après addition de 0,05 mL de base 0,1 M |
| **Acide** | < 6 | *Solution de rouge de méthyle R* | Orangé ou rouge |
| | | *Solution de bleu de bromothymol R1* | Jaune |
| Faiblement acide | 4,0 – 6,0 | *Solution de rouge de méthyle R* | Orangé |
| | | *Solution de vert de bromocrésol R* | Vert ou bleu |
| Fortement acide | < 4 | *Papier au rouge Congo R* | Vert ou bleu |

**01/2008:20205**

## 2.2.5. DENSITÉ

La densité $d_{t_2}^{t_1}$ d'une substance est le rapport entre la masse d'un volume donné de cette substance à une température $t_1$ et la masse d'un volume égal d'eau à une température $t_2$.

Sauf indication contraire, la densité $d_{20}^{20}$ est utilisée. La densité est aussi couramment exprimée en $d_4^{20}$. La masse volumique $\rho_{20}$, définie comme la masse d'une unité de volume de la substance à 20 °C, peut également être utilisée. Elle s'exprime en kilogrammes par mètre cube ou en grammes par centimètre cube ($1\ kg{\cdot}m^{-3} = 10^{-3}\ g{\cdot}cm^{-3}$). Ces quantités sont liées par les équations suivantes, dans lesquelles la masse volumique est exprimée en grammes par centimètre cube :

$$\rho_{20} = 0,998203 \times d_{20}^{20} \text{ ou } d_{20}^{20} = 1,00180 \times \rho_{20}$$

$$\rho_{20} = 0,999972 \times d_4^{20} \text{ ou } d_4^{20} = 1,00003 \times \rho_{20}$$

$$d_4^{20} = 0,998230 \times d_{20}^{20}$$

Mesurez la densité ou la masse volumique avec le nombre de décimales prescrit dans la monographie, à l'aide d'un pycnomètre (solides ou liquides), d'une balance hydrostatique (solides), d'un aréomètre (liquides) ou d'un densimètre digital muni d'un capteur à tube oscillant (liquides et gaz). Si la détermination est faite par pesée, ne tenez pas compte de la flottabilité de l'air qui peut être une source d'erreur de 1 unité à la 3e décimale. Si vous utilisez un densimètre, la flottabilité de l'air n'a aucune influence.

*Densimètre muni d'un capteur à tube oscillant.* L'appareil est constitué des éléments suivants :

– un tube en U, généralement en verre borosilicaté, qui contient le liquide à examiner ;

– un système d'excitation électromagnétique ou piézoélectrique qui fait vibrer le tube comme un oscillateur en porte-à-faux, à une fréquence caractéristique qui dépend de la masse volumique du liquide à examiner ;
– un moyen de mesure de la période de l'oscillation (*T*) qui peut être convertie par l'appareil pour fournir une lecture directe de la masse volumique ou qui peut servir à calculer la masse volumique à l'aide des constantes *A* et *B* décrites ci-après.

La fréquence de résonance (*f*) est une fonction de la constante du ressort (*c*) et de la masse du système (*m*) :

$$f^2 = \frac{1}{T^2} = \frac{c}{m} \times \frac{1}{4\pi^2}$$

Soit :

$$T^2 = \left(\frac{M}{c} + \frac{\rho \times V}{c}\right) \times 4\pi^2$$

*M* = masse du tube,

*V* = volume intérieur du tube.

L'introduction des 2 constantes $A = c/\left(4\pi^2 \times V\right)$ et $B = M/V$, permet d'obtenir l'équation classique relative au capteur à tube oscillant :

$$\rho = A \times T^2 - B$$

Déterminez les constantes *A* et *B* en remplissant le tube en U de l'appareil avec 2 échantillons différents de masse volumique connue, comme par exemple l'*eau R* dégazée et l'air. Effectuez des mesures de contrôle quotidiennes en utilisant de l'*eau R* dégazée. Les résultats affichés pour la mesure de contrôle avec de l'*eau R* dégazée ne doivent pas s'écarter de plus de l'erreur spécifiée pour la valeur de référence ($\rho_{20}$ = 0,998203 g·cm$^{-3}$, $d_{20}^{20}$ = 1,000000). Par exemple, un appareil dont l'erreur est spécifiée à ± 0,0001 g·cm$^{-3}$ doit afficher 0,9982 ± 0,0001 g·cm$^{-3}$ pour être approprié aux mesures ultérieures. Dans le cas contraire, un réajustement est nécessaire. Pratiquez régulièrement un étalonnage avec des matières de référence certifiées. Effectuez les mesures en utilisant le même procédé que pour l'étalonnage. Equilibrez le liquide à examiner dans un thermostat à 20 °C avant de l'introduire dans le tube, si nécessaire, pour éviter la formation de bulles et réduire le temps nécessaire à la mesure.

Les facteurs affectant l'exactitude de la mesure sont :

– l'uniformité de la température à travers le tube,
– la non-linéarité sur un intervalle de masse volumique,
– les effets parasites de la résonance,
– la viscosité, par laquelle des solutions ayant une viscosité supérieure à celle de l'étalon affichent une masse volumique supérieure à la valeur réelle.

Les effets de la non linéarité et de la viscosité peuvent être évités en utilisant des étalons ayant une masse volumique et une viscosité proches de celles du liquide à examiner (± 5 pour cent pour la masse volumique, ± 50 pour cent pour la viscosité). Certains densimètres disposent de fonctions permettant la correction automatique de la viscosité et la correction des erreurs liées aux variations de température et à la non-linéarité.

La fidélité est fonction de la répétabilité et de la stabilité de la fréquence de l'oscillateur, qui dépendent de la stabilité du volume, de la masse et de la constante du ressort de la cellule.

Les densimètres permettent des mesures avec une erreur de l'ordre de 1 × 10$^{-3}$ g·cm$^{-3}$ à 1 × 10$^{-5}$ g·cm$^{-3}$ et une répétabilité de 1 × 10$^{-4}$ g·cm$^{-3}$ à 1 × 10$^{-6}$ g·cm$^{-3}$.

**01/2008:20206**

## 2.2.6. INDICE DE RÉFRACTION

L'indice de réfraction d'un milieu rapporté à l'air est égal au rapport du sinus de l'angle d'incidence d'un rayon lumineux dans l'air au sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré.

Sauf indication contraire, l'indice de réfraction est déterminé à 20 ± 0,5 °C et rapporté à la raie D du sodium (λ = 589,3 nm) ; le symbole est alors $n_{\mathrm{D}}^{20}$.

Les réfractomètres courants déterminent l'angle limite. Dans ces appareils, la partie essentielle est un prisme d'indice de réfraction connu, en contact avec le liquide à examiner.

Etalonnez l'appareil à l'aide de matériaux de référence certifiés.

S'il est fait usage de la lumière blanche, le réfractomètre est muni d'un système de compensation. L'appareil donne des lectures exactes au minimum à la troisième décimale près et possède un dispositif permettant d'opérer à la température prescrite ; le thermomètre permet la lecture à 0,5 °C près, au moins.

**01/2008:20207**

## 2.2.7. POUVOIR ROTATOIRE

Le pouvoir rotatoire est la propriété que présentent les substances chirales de dévier le plan de polarisation de la lumière polarisée.

Le pouvoir rotatoire est considéré comme positif (+) dans le cas de substances dextrogyres (c'est-à-dire, celles qui dévient le plan de polarisation dans le sens des aiguilles d'une montre) et négatif (–) dans le cas de substances lévogyres.

Le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha_m]_\lambda^t$ est la rotation, exprimée en radians (rad), mesurée à la température *t* et à la longueur d'onde λ, donnée par une couche de 1 m d'épaisseur d'un liquide ou d'une solution contenant la substance optiquement active à raison de 1 kg/m$^3$ de solution. Pour des raisons pratiques, le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha_m]_\lambda^t$ est exprimé couramment en milliradians-mètres carrés par kilogramme (mrad·m$^2$·kg$^{-1}$).

La Pharmacopée adopte les définitions conventionnelles suivantes :

L'*angle de rotation optique* d'un liquide non dilué est l'angle de rotation α, exprimé en degrés (°), du plan de polarisation à la longueur d'onde de la raie D du sodium (λ = 589,3 nm) mesuré à 20 °C sous une épaisseur de 1 dm. Dans le cas d'une solution, la méthode de préparation est prescrite dans la monographie.

Le *pouvoir rotatoire spécifique* $[\alpha]_{\mathrm{D}}^{20}$ d'un liquide est défini par l'angle de rotation α exprimé en degrés (°), du plan de polarisation à la longueur d'onde de la raie D du sodium (λ = 589,3 nm) mesuré à 20 °C dans la substance liquide à examiner, rapporté à une épaisseur de couche de 1 dm et divisé par la masse volumique exprimée en grammes par centimètre cube.

Le *pouvoir rotatoire spécifique* $[\alpha]_{\mathrm{D}}^{20}$ d'une substance en solution est défini par l'angle de rotation α exprimé en degrés (°), du plan de polarisation à la longueur d'onde de la raie D du sodium (λ = 589,3 nm) mesuré à 20 °C dans une solution de la substance à examiner, rapporté à une épaisseur de couche de 1 dm et à une concentration en substance de 1 g/mL. Le pouvoir rotatoire spécifique d'une substance en solution est toujours défini par rapport à un solvant déterminé et à une concentration donnée.

Dans le système conventionnel adopté par la Pharmacopée, le pouvoir rotatoire spécifique est exprimé sous forme de valeur sans unité ; l'unité effective, le degré-millilitre par décimètre et par gramme [(°)·ml·dm$^{-1}$·g$^{-1}$], est sous-entendue.

Le facteur de conversion du Système International à celui de la Pharmacopée est le suivant :

$$[\alpha_m]_\lambda^t = [\alpha]_\lambda^t \times 0,1745$$

Dans certains cas précisés dans la monographie, l'angle de rotation peut être mesuré à d'autres températures que 20 °C et à d'autres longueurs d'onde.

Le polarimètre doit permettre des lectures à 0,01° près. Le contrôle de l'échelle de l'appareil est généralement effectué au moyen de lames de quartz certifiées. La linéarité de l'échelle peut être vérifiée à l'aide de solutions de saccharose.

*Mode opératoire*. Déterminez le zéro du polarimètre et l'angle de rotation de la lumière polarisée à la longueur d'onde de la raie D du sodium (λ = 589,3 nm) à 20 ± 0,5 °C, sauf indication contraire. N'effectuez les mesures à une autre température que lorsque la monographie indique la correction de température à apporter au pouvoir rotatoire mesuré. Déterminez le zéro de l'appareil avec le tube fermé, vide dans le cas des substances liquides, et rempli du solvant prescrit dans le cas des substances solides.

Calculez le pouvoir rotatoire spécifique à l'aide des formules suivantes.

Pour les substances liquides non diluées :

$$[\alpha]_{\mathrm{D}}^{20} = \frac{\alpha}{l \cdot \rho_{20}}$$

Pour les substances en solution :

$$[\alpha]_{\mathrm{D}}^{20} = \frac{1000\alpha}{l \cdot c}$$

où *c* est la concentration en grammes par litre du solide en solution.

Calculez d'après les formules suivantes la teneur *c* en grammes par litre ou la teneur *c′* en pour cent *m/m* d'une substance dissoute :

$$c = \frac{1000\alpha}{l \cdot [\alpha]_{\mathrm{D}}^{20}} \qquad c' = \frac{100\alpha}{l \cdot [\alpha]_{\mathrm{D}}^{20} \cdot \rho_{20}}$$

$\alpha$ = angle de rotation en degrés lu à 20 ± 0,5 °C,

$l$ = longueur en décimètres du tube polarimétrique,

$\rho_{20}$ = masse volumique à 20 °C en grammes par centimètre cube. Pour les besoins de la Pharmacopée, la masse volumique est remplacée par la densité (*2.2.5*).

**01/2008:20208**

## 2.2.8. VISCOSITÉ

La viscosité *dynamique* ou le *coefficient de viscosité* $\eta$ est l'expression de la force tangentielle par unité de surface appelée *tension de cisaillement* $\tau$ et exprimée en pascals, nécessaire pour déplacer parallèlement au plan de glissement une couche de liquide de 1 mètre carré à une vitesse ($v$) de 1 mètre par seconde par rapport à une couche parallèle située à une distance de 1 mètre ($x$).

Le rapport d$v$/d$x$ constitue un gradient de vitesse représentant la *vitesse de cisaillement D* exprimée en s$^{-1}$. Il en résulte que $\eta = \tau/D$.

L'unité de viscosité dynamique est le pascal-seconde (Pa·s), le sous-multiple le plus couramment utilisé étant le millipascal-seconde (mPa·s).

La *viscosité cinématique v*, exprimée en mètres carrés par seconde, s'obtient en divisant la viscosité dynamique $\eta$ par la masse volumique $\rho$, exprimée en kilogrammes par mètre cube, du liquide, mesurée à la même température, $v = \eta/\rho$. La viscosité cinématique est le plus souvent exprimée en millimètres carrés par seconde.

Le viscosimètre à capillaire permet la détermination de la viscosité des liquides newtoniens. Le viscosimètre rotatif permet la détermination de la viscosité des liquides newtoniens et non-newtoniens. D'autres viscosimètres peuvent être utilisés dans la mesure où la précision n'est pas inférieure à celle qui est obtenue au moyen des appareils décrits ci-après.

**01/2008:20209**

## 2.2.9. VISCOSITÉ - MÉTHODE AU TUBE CAPILLAIRE

La détermination de la viscosité à l'aide de viscosimètres à capillaire appropriés est effectuée à une température de 20 ± 0,1 °C, sauf indication contraire. Au moyen d'un chronomètre, le temps nécessaire pour que le niveau du liquide passe d'une marque à l'autre est mesuré au 1/5 de seconde près.

Le résultat n'est valable que si 2 lectures consécutives ne diffèrent pas de plus de 1 pour cent. La moyenne d'au moins 3 lectures donne le temps d'écoulement du liquide à examiner.

Calculez la viscosité dynamique $\eta$ (*2.2.8*) en millipascals-secondes à l'aide de la formule suivante :

$$\eta = k\rho t$$

Dans laquelle :

$k$ = constante de l'appareil, exprimée en millimètres carrés par seconde au carré,

$\rho$ = masse volumique du liquide à examiner exprimée en milligrammes par millimètre cube obtenue en multipliant sa densité $d_{20}^{20}$ par 0,9982,

$t$ = temps d'écoulement, en secondes, du liquide à examiner.

La constante *k* est déterminée au moyen d'un liquide approprié pour l'étalonnage des viscosimètres.

Le calcul de la viscosité cinématique (mm$^2$·s$^{-1}$) est obtenu à l'aide de la formule $v = kt$.

La détermination peut être effectuée au moyen de l'appareillage (voir figure 2.2.9.-1) présentant les spécifications du tableau 2.2.9.-1[(1)].

Le temps minimal d'écoulement doit être de 350 s pour la grandeur n° 1 et de 200 s pour les autres grandeurs.

(1) La Pharmacopée Européenne décrit le système proposé par l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO).

Tableau 2.2.9.-1

| Grandeur n° | Constante nominale du viscosimètre | Plage de viscosité cinématique | Diamètre intérieur du tube ***R*** | Volume du réservoir ***C*** | Diamètre intérieur du tube ***N*** |
|---|---|---|---|---|---|
| | $mm^2 \cdot s^{-2}$ | $mm^2 \cdot s^{-1}$ | mm (± 2 %) | mL (± 5 %) | mm |
| 1 | 0,01 | 3,5 à 10 | 0,64 | 5,6 | 2,8 à 3,2 |
| 1A | 0,03 | 6 à 30 | 0,84 | 5,6 | 2,8 à 3,2 |
| 2 | 0,1 | 20 à 100 | 1,15 | 5,6 | 2,8 à 3,2 |
| 2A | 0,3 | 60 à 300 | 1,51 | 5,6 | 2,8 à 3,2 |
| 3 | 1,0 | 200 à 1000 | 2,06 | 5,6 | 3,7 à 4,3 |
| 3A | 3,0 | 600 à 3000 | 2,74 | 5,6 | 4,6 à 5,4 |
| 4 | 10 | 2000 à 10 000 | 3,70 | 5,6 | 4,6 à 5,4 |
| 4A | 30 | 6000 à 30 000 | 4,07 | 5,6 | 5,6 à 6,4 |
| 5 | 100 | 20 000 à 100 000 | 6,76 | 5,6 | 6,8 à 7,5 |

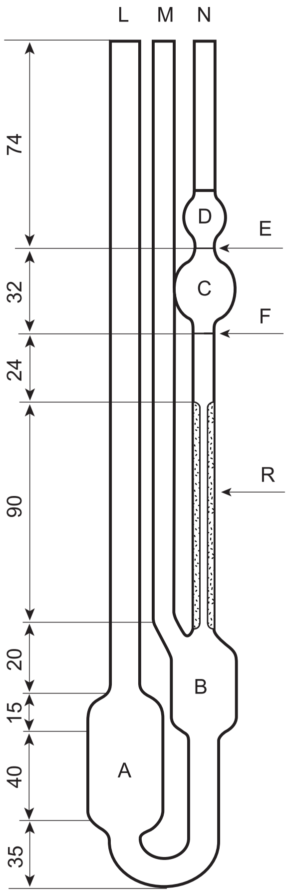



Figure 2.2.9.-1. – *Viscosimètre à niveau suspendu*

*Dimensions en millimètres*

*Mode opératoire.* Remplissez le viscosimètre par le tube (*L*) avec une quantité suffisante de liquide à examiner, préalablement amené à 20 °C, sauf indication contraire, pour remplir le ballon (*A*) mais en s'assurant que le niveau des liquides dans le ballon (*B*) est au-dessous de l'orifice de ventilation du tube (*M*). Plongez le viscosimètre dans le bain d'eau à 20 ± 0,1 °C, sauf indication contraire. Maintenez-le en position verticale et laissez-le reposer pendant 30 min au moins pour établir l'équilibre thermique. Fermez le tube (*M*) et élevez le niveau du liquide par le tube (*N*) jusqu'à un niveau situé à 8 mm environ au-dessus du trait (*E*). Maintenez le liquide à ce niveau en fermant le tube (*N*) et ouvrez le tube (*M*). En ouvrant le tube (*N*), mesurez au 1/5 de seconde au moyen d'un chronomètre le temps nécessaire pour que le niveau du liquide tombe du trait (*E*) au trait (*F*).

**01/2008:20210**

# 2.2.10. VISCOSITÉ - MÉTHODE DU VISCOSIMÈTRE ROTATIF

## PRINCIPE

La méthode consiste à mesurer la force (couple) qui s'exerce sur un mobile lorsqu'il est mis en rotation dans un liquide à une vitesse angulaire (vitesse de rotation) constante. Les viscosimètres rotatifs (ou « à mobile tournant ») permettent de mesurer la viscosité de liquides dits newtoniens (dont la viscosité est indépendante du cisaillement) ou non newtoniens (dont la viscosité est dépendante du cisaillement ; on parle alors de viscosité apparente). Ils peuvent être divisés en 2 groupes : les viscosimètres de type absolu et ceux de type relatif. Dans les viscosimètres absolus, l'écoulement dans la géométrie de mesure adoptée est bien défini ; les résultats de mesure sont des valeurs absolues de la viscosité, pouvant être comparées à d'autres valeurs absolues. Dans les viscosimètres relatifs, l'écoulement dans la géométrie de mesure adoptée est non défini ; les résultats de mesure sont des valeurs relatives de la viscosité, qu'il n'est possible de comparer ni à des valeurs absolues, ni à d'autres valeurs relatives n'ayant pas été déterminées par la même méthode viscosimétrique.

Il existe différents systèmes de mesure pouvant opérer sur des plages de viscosité données, ainsi qu'à plusieurs vitesses de rotation.

## APPAREILLAGE

Les types d'instruments suivants sont les plus couramment utilisés.

### *VISCOSIMÈTRES À CYLINDRES CONCENTRIQUES (VISCOSIMÈTRE DE TYPE ABSOLU)*

Dans les viscosimètres à cylindres concentriques (ou coaxiaux), le liquide dont on veut déterminer la viscosité est introduit dans l'espace séparant le cylindre intérieur du cylindre extérieur. Pour mesurer la viscosité, on peut mettre en rotation soit le cylindre intérieur (viscosimètres type Searle, voir figure 2.2.10.-1), soit le cylindre extérieur (viscosimètres type Couette, voir figure 2.2.10.-2). En régime d'écoulement laminaire, la viscosité (ou la viscosité apparente) η, exprimée en pascals-secondes, est donnée par la formule suivante :

$$\eta = \frac{1}{\omega}\left(\frac{M}{4\pi h}\right)\left(\frac{1}{R_i^2} - \frac{1}{R_o^2}\right) = k\frac{M}{\omega}$$

| | | |
|---|---|---|
| $M$ | = | couple s'exerçant sur la surface du cylindre, en newtons-mètres, |
| ω | = | vitesse angulaire, en radians par seconde, |
| $h$ | = | hauteur d'immersion du cylindre intérieur dans le milieu liquide, en mètres, |
| $R_i$ | = | rayon du cylindre intérieur, en mètres, |
| $R_o$ | = | rayon du cylindre extérieur, en mètres, |
| $k$ | = | constante de l'appareil, en radians par mètre cube. |

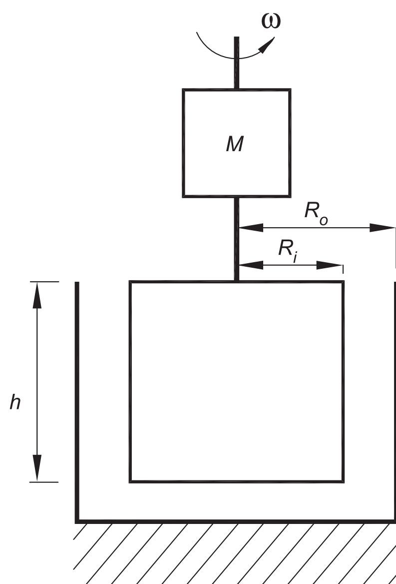



Figure 2.2.10.-1

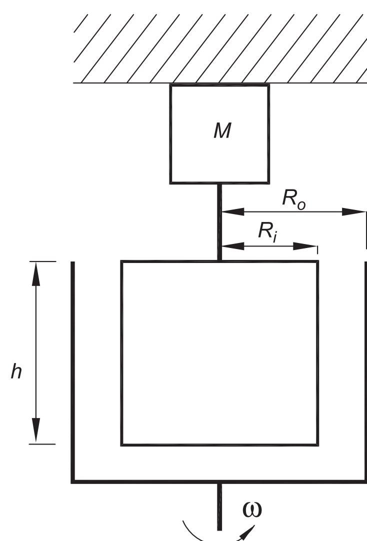



Figure 2.2.10.-2

Dans le cas de liquides non newtoniens, il est essentiel de préciser pour quelle contrainte de cisaillement τ ou quelle vitesse de cisaillement γ la viscosité est mesurée. Lorsque l'on travaille dans des conditions d'entrefer étroit (conditions satisfaites dans les viscosimètres absolus), il existe des relations de proportionnalité, d'une part entre $M$ et τ ; d'autre part entre ω et γ :

$$\tau = AM \qquad \gamma = B\omega$$

où $A$ et $B$ sont 2 constantes d'appareil dont les expressions sont données par les relations suivantes :

– *pour les cylindres concentriques* :

$$A = \frac{1}{4\pi h}\frac{R_i^2 + R_0^2}{R_i^2 R_0^2} \qquad B = \frac{R_i^2 + R_0^2}{R_0^2 - R_i^2}$$

– *pour les cônes-plateaux* :

$$A = \frac{3}{2\pi R^3} \qquad B = \frac{1}{\alpha}$$

$M$ = couple s'exerçant sur la surface du cylindre du plateau ou du cône, en newtons-mètres,
$\omega$ = vitesse angulaire, en radians par seconde,
$R_i$ = rayon du cylindre intérieur, en mètres,
$R_0$ = rayon du cylindre extérieur, en mètres,
$R$ = rayon du cône, en mètres,
$h$ = hauteur d'immersion du cylindre intérieur dans le milieu liquide, en mètres,
α = angle formé par le plateau et le cône, en radians,
τ = contrainte de cisaillement, en Pascal (Pa),
γ = vitesse de cisaillement en secondes réciproques ($s^{-1}$).

*VISCOSIMÈTRES CÔNE-PLATEAU (VISCOSIMÈTRE DE TYPE ABSOLU)*

Dans les viscosimètres cône-plateau, le liquide est introduit dans l'espace séparant un disque plan (plateau) et un cône, qui forment entre eux un angle défini. Pour mesurer la viscosité, on peut mettre en rotation soit le cône soit le disque (voir figures 2.2.10.-3 et 2.2.10.-4 respectivement). En régime d'écoulement laminaire, la viscosité (ou la viscosité apparente) η, exprimée en pascals-secondes, est donnée par la formule suivante :

$$\eta = \left(\frac{M}{\omega}\right)\left(\frac{3\alpha}{2\pi R^3}\right) = k\frac{M}{\omega}$$

$M$ = couple s'exerçant sur la surface du plateau ou du cône, en newtons-mètres,
ω = vitesse angulaire, en radians par seconde,
α = angle formé par le plateau et le cône, en radians,
$R$ = rayon du cône, en mètres,
$k$ = constante de l'appareil, en radians par mètre cube.

$A$ et $B$ sont les constantes de l'appareil (voir sous Viscosimètres à cylindres concentriques).

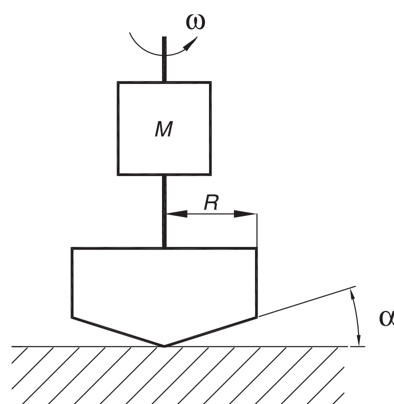



Figure 2.2.10.-3

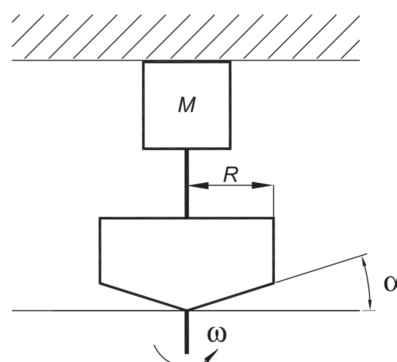



Figure 2.2.10.-4

2. Méthodes analytiques

*VISCOSIMÈTRES À BROCHE (VISCOSIMÈTRE DE TYPE RELATIF)*

Dans les viscosimètres à broche, on met en rotation dans le liquide dont on veut déterminer la viscosité un mobile (broche) en forme, par exemple, de cylindre ou de disque (voir figures 2.2.10.-5 et 2.2.10.-6 respectivement). Les valeurs relatives de la viscosité (ou de la viscosité apparente) peuvent être calculées directement, à l'aide de facteurs de conversion, à partir de la valeur lue sur l'échelle pour une vitesse de rotation donnée.

De façon générale, la constante *k* de l'appareil peut être déterminée à diverses vitesses de rotation à l'aide d'un liquide certifié pour étalonnage des viscosimètres. La viscosité η obéit alors à la relation suivante :

$$\eta = k\frac{M}{\omega}$$

MODE OPÉRATOIRE

Mesurez la viscosité (ou la viscosité apparente) en opérant comme indiqué dans le mode d'emploi du viscosimètre rotatif. La température à laquelle doit être mesurée la viscosité est spécifiée dans la monographie. Pour les systèmes non newtoniens, la monographie précise le type de viscosimètre à utiliser et, dans le cas des viscosimètres absolus, la vitesse angulaire ou la vitesse de cisaillement à appliquer. S'il est impossible d'obtenir exactement la vitesse de cisaillement indiquée, opérez à une valeur légèrement supérieure et à une valeur légèrement inférieure, puis interpolez.

Dans le cas de viscosimètres relatifs, la vitesse de cisaillement dans l'échantillon n'est pas homogène, il est donc impossible de la définir. Dans ces conditions, si le liquide est non newtonien, la viscosité, déterminée par l'application de la relation précédente, possède un caractère relatif, qui dépend de la nature du mobile de mesure, de la vitesse angulaire, mais aussi des dimensions du récipient (Ø = au minimum 80 mm) qui contient l'échantillon et de la profondeur d'immersion du mobile. Les valeurs obtenues ne sont comparables qu'à condition de travailler rigoureusement dans les mêmes conditions expérimentales.

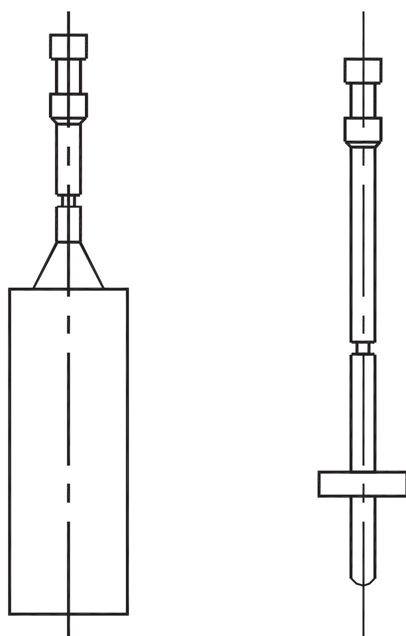


Figure 2.2.10.-5

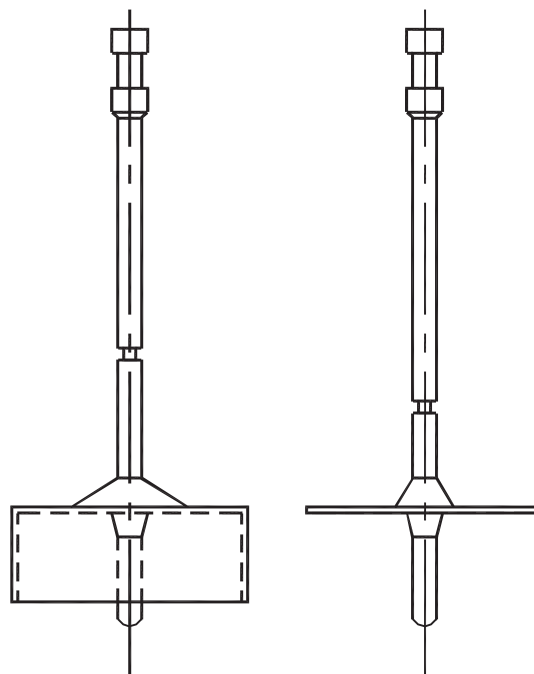


Figure 2.2.10.-6

**01/2008:20211**

## 2.2.11. INTERVALLE DE DISTILLATION

L'intervalle de distillation est l'intervalle de température, corrigé pour 101,3 kPa (760 Torr) dans lequel un liquide ou une fraction déterminée d'un liquide distille dans les conditions décrites ci-après.

*Appareil.* L'appareil (voir figure 2.2.11.-1) est constitué par un ballon à distiller (*A*), un réfrigérant à manchon droit (*B*) qui s'adapte au tube latéral du ballon et une allonge coudée (*C*) fixée à l'extrémité du tube du réfrigérant. L'extrémité inférieure du tube du réfrigérant peut aussi être allongée et courbée pour remplacer l'allonge. Un thermomètre plonge dans le col du ballon de façon que l'extrémité supérieure du réservoir à mercure se trouve 5 mm plus bas que le point de jonction de la paroi inférieure du tube latéral. Le thermomètre est gradué en 0,2 °C et son échelle doit recouvrir un intervalle de 50 °C environ. Pendant la détermination, un écran approprié permet de protéger des courants d'air le ballon, y compris son col.

*Mode opératoire.* Introduisez dans le ballon (*A*) 50,0 mL du liquide à examiner et quelques fragments de matière poreuse. Recueillez le distillat dans une éprouvette de 50 mL graduée en 1 mL. Le refroidissement par circulation d'eau est indispensable pour les liquides distillant au-dessous de 150 °C. Portez rapidement à ébullition et notez la température à laquelle la première goutte de distillat tombe dans l'éprouvette. Réglez le chauffage de façon que le liquide distille à la vitesse constante de 2-3 mL/min. Notez la température au moment où la totalité ou la fraction prescrite du liquide, mesurée à 20 °C, a distillé.

Corrigez les lectures en fonction de la pression barométrique en utilisant la formule suivante :

$$t_1 = t_2 + k\,(101{,}3 - b)$$

$t_1$ = température corrigée,

$t_2$ = température lue à la pression barométrique *b*,

*k* = facteur de correction (voir tableau 2.2.11.-1 à moins que ce facteur ne soit donné),

*b* = pression barométrique, exprimée en kilopascals, lors de la distillation.

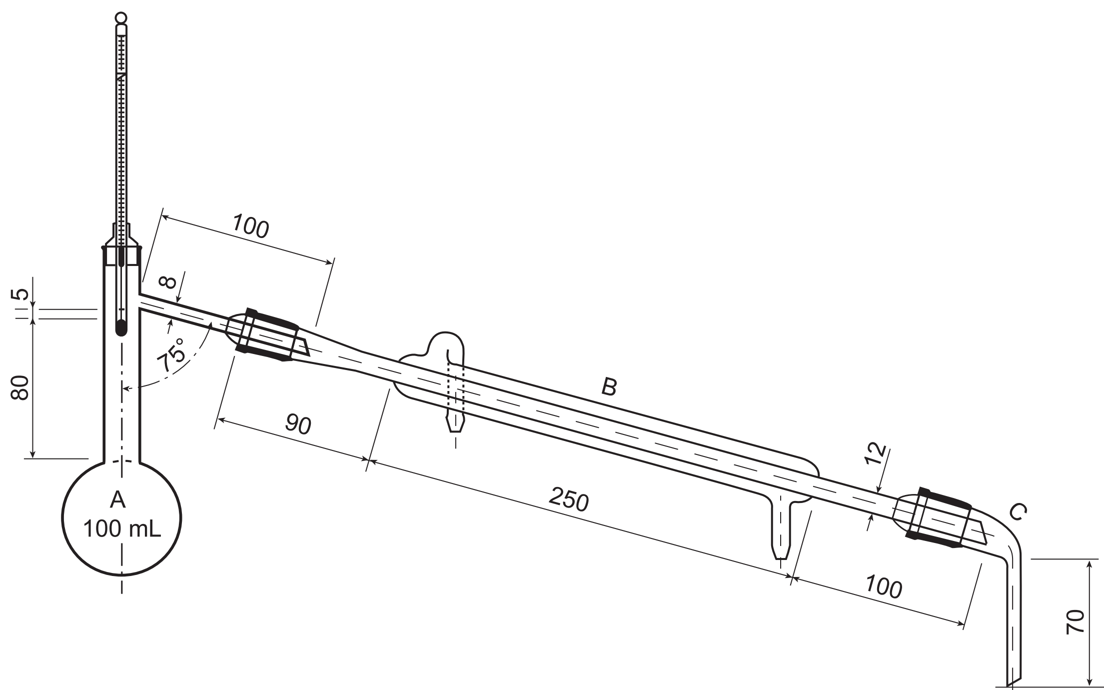



Figure 2.2.11.-1. – *Appareil pour la détermination de l'intervalle de distillation*
*Dimensions en millimètres*

Tableau 2.2.11.-1. – *Correction de la température en fonction de la pression*

| Température de distillation | Facteur de correction *k* |
|---|---|
| jusqu'à 100 °C | 0,30 |
| au-dessus de 100 °C et jusqu'à 140 °C | 0,34 |
| au-dessus de 140 °C et jusqu'à 190 °C | 0,38 |
| au-dessus de 190 °C et jusqu'à 240 °C | 0,41 |
| au-dessus de 240 °C | 0,45 |

Corrigez les lectures en fonction de la pression barométrique en utilisant la formule suivante :

$$t_1 = t_2 + k\,(101,3 - b)$$

$t_1$ = température corrigée,

$t_2$ = température lue à la pression barométrique *b*,

$k$ = facteur de correction (voir tableau 2.2.11.-1),

$b$ = pression barométrique, exprimée en kilopascals, lors de la distillation.

**01/2008:20212**

## 2.2.12. POINT D'ÉBULLITION

Le point d'ébullition est la température corrigée à laquelle la pression de vapeur d'un liquide est égale à 101,3 kPa.

*Appareil.* L'appareil à utiliser est celui de l'intervalle de distillation (*2.2.11*) sauf que le thermomètre est placé de façon que la partie inférieure du réservoir de mercure soit au niveau du bord inférieur du col du ballon à distiller, lequel est posé sur une plaque de matière isolante percée d'un trou de 35 mm de diamètre.

*Mode opératoire.* Dans le ballon (*A*), introduisez 20 mL du liquide à examiner et quelques morceaux de matière poreuse. Faites chauffer de façon à atteindre rapidement le point d'ébullition et notez la température à laquelle le liquide commence à s'écouler du tube latéral du ballon dans le réfrigérant.

**01/2008:20213**

## 2.2.13. DÉTERMINATION DE L'EAU PAR ENTRAÎNEMENT

*Appareil.* L'appareil (voir figure 2.2.13.-1) est constitué par un ballon de verre (*A*) relié par un tube de raccordement (*D*) à un tube cylindrique de condensation (*B*) avec tube collecteur gradué (*E*). Le réfrigérant (*C*) est placé sur le tube cylindrique (*B*). Le tube collecteur (*E*) est gradué en 0,1 mL. La source de chaleur à utiliser de préférence est un chauffage électrique avec un contrôle à rhéostat ou un bain d'huile. La partie supérieure du ballon et le tube de raccordement peuvent être isolés.

*Mode opératoire.* Nettoyez le tube collecteur et le réfrigérant de l'appareil, rincez-les soigneusement à l'eau, puis séchez.

Dans un ballon séché, introduisez 200 mL de *toluène R* et 2 mL d'*eau R* environ ; distillez pendant 2 h, laissez refroidir pendant 30 min environ et lisez le volume d'eau à 0,05 mL près. Introduisez ensuite dans le ballon une prise d'essai de la substance à examiner, pesée à 1 pour cent près, susceptible de donner 2 mL à 3 mL d'eau environ. Si la substance est pâteuse, pesez-la dans une nacelle constituée par une feuille de métal. Chauffez doucement le ballon pendant 15 min en présence d'une substance assurant une ébullition régulière. Lorsque le toluène commence à bouillir, distillez à la vitesse de 2 gouttes environ par seconde jusqu'à ce que la plus grande partie de l'eau soit entraînée, puis augmentez la vitesse de distillation jusqu'à 4 gouttes par seconde. Lorsque toute l'eau a été entraînée, rincez l'intérieur du tube réfrigérant au *toluène R*.

Continuez la distillation pendant 5 min, arrêtez le chauffage et laissez refroidir le tube collecteur à température ambiante. Faites tomber les gouttelettes d'eau adhérant encore à la paroi du tube. Lorsque l'eau et le toluène se sont séparés, lisez le volume d'eau et calculez la teneur en eau de la substance à examiner, en millilitres par kilogramme à l'aide de la relation :

$$\frac{1000\,(n_2 - n_1)}{m}$$

$m$ = masse en grammes de la prise d'essai de la substance à examiner,

$n_1$ = nombre de millilitres d'eau obtenus dans la première distillation,

$n_2$ = nombre total de millilitres d'eau obtenus dans les 2 distillations.

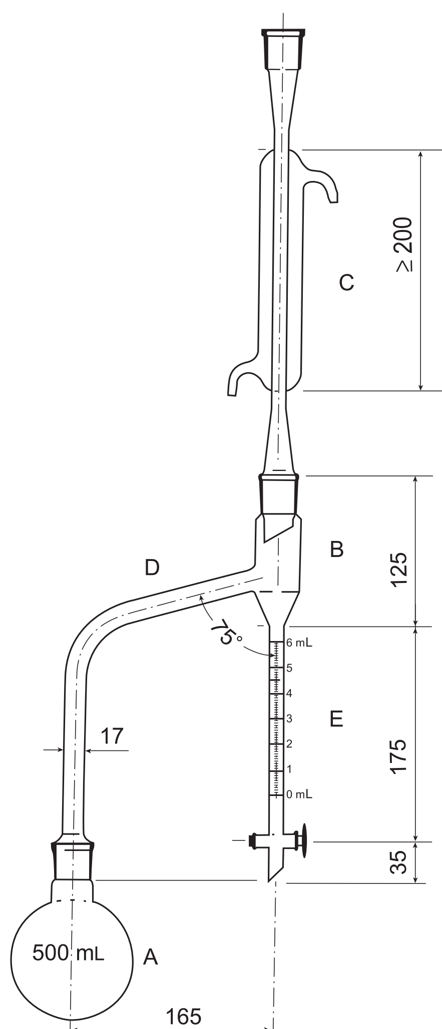



Figure 2.2.13.-1. – *Appareil pour la détermination de l'eau par entraînement*

*Dimensions en millimètres*

**01/2008:20214**

## 2.2.14. POINT DE FUSION - MÉTHODE AU TUBE CAPILLAIRE

Le point de fusion déterminé par la méthode au tube capillaire correspond à la température à laquelle la dernière particule solide de substance introduite dans un tube en colonne compacte passe à l'état liquide.

Si la monographie le prescrit, le même appareil et la même méthode seront utilisés dans la détermination d'autres facteurs tels que la formation du ménisque ou l'intervalle de fusion, qui caractérisent le comportement de fusion d'une substance.

L'*appareillage* est constitué par :

- un vase en verre approprié renfermant le liquide du bain (par exemple : eau, paraffine liquide ou huile de silicone) et un dispositif de chauffage approprié,
- un dispositif d'agitation mécanique convenable assurant une uniformité de la température du bain,
- un thermomètre adéquat gradué à intervalles ne dépassant pas 0,5 °C muni d'une marque d'immersion. La gamme de températures visible du thermomètre n'est pas supérieure à 100 °C,
- des tubes capillaires en verre à haute résistance thermique et exempt d'alcali, d'un diamètre intérieur de 0,9 mm à 1,1 mm, à paroi d'une épaisseur de 0,10 mm à 0,15 mm, scellés à une extrémité.

*Mode opératoire*. Sauf indication contraire, desséchez sous vide et sur *gel de silice anhydre R* pendant 24 h, la substance finement pulvérisée. Dans un tube capillaire, introduisez-en une quantité suffisante pour former une colonne compacte d'une hauteur de 4 mm à 6 mm. Chauffez jusqu'à obtention d'une température d'environ 10 °C inférieure au point de fusion présumé et réglez ensuite la vitesse de chauffage à environ 1 °C/min. Dès qu'une température de 5 °C inférieure au point de fusion présumé est atteinte, introduisez correctement le tube capillaire dans l'appareil. Dans le cas du dispositif décrit ci-dessus, placez le tube capillaire de façon que son extrémité scellée se trouve à mi-hauteur du réservoir à mercure et que le repère d'immersion du thermomètre soit au niveau de la surface du liquide. Notez la température à laquelle la dernière particule passe à l'état liquide.

*Etalonnage de l'appareil*. L'appareil peut être étalonné en utilisant des substances de référence pour point de fusion telles que celles de l'Organisation Mondiale de la Santé ou d'autres substances appropriées.

**01/2008:20215**

## 2.2.15. POINT DE FUSION - MÉTHODE AU TUBE CAPILLAIRE OUVERT

Pour certaines substances, la méthode suivante est appliquée pour déterminer le point de fusion.

Utilisez des tubes capillaires de verre, ouverts aux 2 extrémités, d'environ 80 mm de longueur, de 1,4 mm à 1,5 mm de diamètre extérieur et de 1,0 mm à 1,2 mm de diamètre intérieur.

Dans 5 de ces tubes, introduisez la substance préalablement traitée dans les conditions prescrites, en quantité suffisante pour former dans chaque tube une colonne d'environ 10 mm de hauteur. Conservez les tubes à la température et pendant le temps prescrits.

Sauf indication contraire, les substances de consistance cireuse sont fondues au bain-marie, avec précaution et complètement, avant introduction dans les tubes capillaires. Laissez reposer les tubes à 2-8 °C pendant 2 h.

Fixez un des tubes à un thermomètre gradué en 0,5 °C de façon que la substance soit proche du réservoir du thermomètre. Introduisez le thermomètre et le tube capillaire dans un vase cylindrique large, de façon que la distance entre le fond du récipient et l'extrémité du réservoir soit de 1 cm. Introduisez de l'eau dans le vase jusqu'à 5 cm du fond. Elevez progressivement la température de l'eau à raison de 1 °C/min.

La température à laquelle la substance commence à s'élever dans le tube capillaire est considérée comme le point de fusion.

Répétez l'opération avec les 4 autres tubes capillaires et calculez le résultat en prenant la moyenne des 5 lectures.

**01/2008:20216**

## 2.2.16. POINT DE FUSION - MÉTHODE DE LA FUSION INSTANTANÉE

Le point de la fusion instantanée est donné par l'expression :

$$\frac{t_1 + t_2}{2}$$

dans laquelle $t_1$ est la première température relevée et $t_2$ la seconde dans les conditions fixées ci-après.

*Appareillage.* L'appareillage est constitué par un bloc de métal inattaquable (par exemple, de laiton) bon conducteur de la chaleur, dont la face supérieure plane est soigneusement polie. Le bloc est chauffé uniformément dans toute sa masse à l'aide d'une micro-rampe à gaz ou d'un dispositif électrique permettant un réglage très précis de la température. Le bloc comporte une cavité cylindrique de diamètre suffisant pour contenir un thermomètre qui doit être maintenu à la même hauteur de colonne pendant l'étalonnage de l'appareil et la détermination du point de fusion de la substance à examiner. La cavité cylindrique est parallèle à la face polie supérieure du bloc et à une distance de 3 mm environ de celle-ci. L'appareil est étalonné à l'aide de substances de référence appropriées.

*Mode opératoire.* Chauffez assez rapidement le bloc jusqu'à 10 °C environ au-dessous de la température de fusion présumée. Réglez ensuite la vitesse de chauffe à environ 1 °C/min. Projetez régulièrement au niveau du réservoir du thermomètre quelques particules de substance pulvérisée, éventuellement desséchée selon les indications données dans la méthode au tube capillaire. Nettoyez la surface après chaque essai. Notez la température $t_1$ à laquelle la substance fond instantanément pour la première fois dès qu'elle touche le métal. Arrêtez le chauffage. Pendant le refroidissement, projetez régulièrement quelques particules de substance en nettoyant la surface après chaque essai. Notez la température $t_2$ à laquelle la substance cesse de fondre instantanément dès son contact avec le métal.

*Etalonnage de l'appareil.* L'appareil peut être étalonné en utilisant des substances de référence pour point de fusion telles que celles de l'Organisation Mondiale de la Santé ou d'autres substances appropriées.

**01/2008:20217**

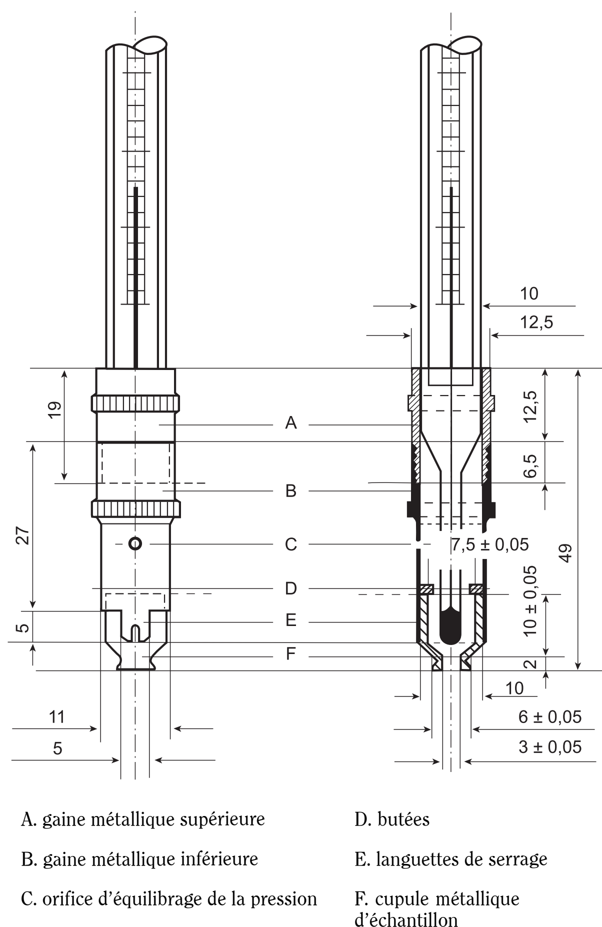
## 2.2.17. POINT DE GOUTTE

Le point de goutte est la température à laquelle la première goutte de la substance fondante tombe d'une cupule dans des conditions déterminées.

Si la monographie n'indique pas le procédé à utiliser, le procédé A est mis en oeuvre. Tout passage du procédé A au procédé B fait l'objet d'une validation.

PROCÉDÉ A

*Appareil.* L'appareil (voir figure 2.2.17.-1) est constitué par 2 gaines métalliques (*A* et *B*) assemblées par vissage. La gaine *A* est fixée à un thermomètre à mercure. Une cupule métallique est fixée de façon amovible à la partie inférieure de la gaine *B* à l'aide de 2 languettes de serrage. Des butées de 2 mm de longueur déterminent exactement la position de la cupule. Elles servent également à centrer le thermomètre. Un orifice percé dans la paroi de la gaine *B* permet l'équilibrage de la pression. La surface d'écoulement de la cupule doit être plane et les bords de l'orifice de sortie doivent être à angle droit. La partie inférieure du thermomètre à mercure a la forme et les dimensions indiquées sur la figure ; il permet des mesures de température de 0 °C à 110 °C et sur sa graduation, une distance de 1 mm représente une différence de 1 °C. Le réservoir à mercure du thermomètre a un diamètre de 3,5 ± 0,2 mm et une hauteur de 6,0 ± 0,3 mm. L'ensemble de l'appareil, placé dans l'axe d'un tube à essai d'environ 200 mm de longueur et d'environ 40 mm de diamètre extérieur, est fixé à ce tube à l'aide d'un bouchon rainuré latéralement et traversé par le thermomètre. L'orifice de la cupule doit être à environ 15 mm du fond du tube à essai. Le tout est plongé dans un vase cylindrique d'environ 1 litre rempli d'eau. Le fond du tube à essai doit être à environ 25 mm du fond du vase. Le niveau de l'eau doit atteindre la partie supérieure de la gaine *A*. Un agitateur assure l'homogénéité de température du bain.




A. gaine métallique supérieure
B. gaine métallique inférieure
C. orifice d'équilibrage de la pression
D. butées
E. languettes de serrage
F. cupule métallique d'échantillon

Figure 2.2.17.-1. – *Appareil pour la détermination du point de goutte*
*Dimensions en millimètres*

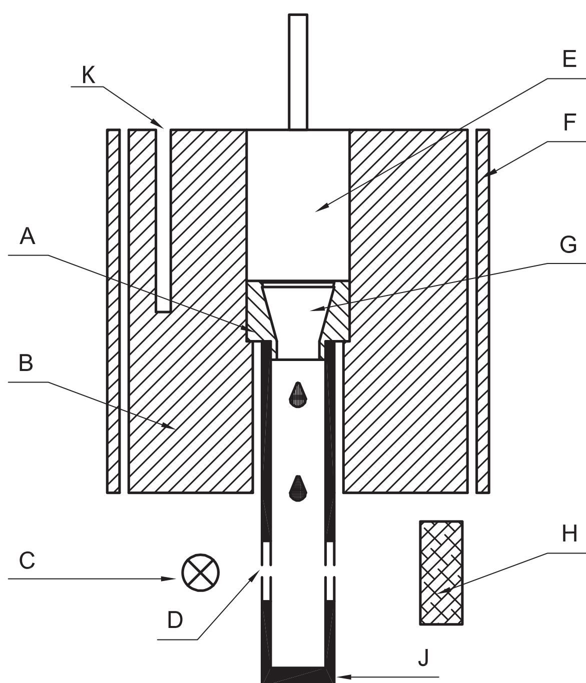
*Mode opératoire.* Préparez la substance à examiner selon les instructions de la monographie. Remplissez entièrement la cupule avec la substance à examiner. Eliminez avec une spatule l'excès de matière aux 2 extrémités de la cupule. Les gaines *A* et *B* étant assemblées, enfoncez la cupule dans son logement dans la gaine *B* jusqu'aux butées. Enlevez à la spatule ce qui a été expulsé par le thermomètre à l'extérieur de l'orifice de la cupule. Placez l'appareil dans le bain en respectant les positions décrites plus haut. Chauffez le bain d'eau. Lorsque la température est d'environ 10 °C au-dessous du point de goutte présumé, réglez la vitesse de chauffe à environ 1 °C/min. Notez la température au moment de la chute de la première goutte. Effectuez au moins 3 déterminations avec chaque fois une nouvelle prise de substance. L'écart entre les lectures ne doit pas être supérieur à 3 °C. Le point de goutte est donné par la moyenne de 3 lectures.

PROCÉDÉ B - MÉTHODE AUTOMATISÉE

*Appareillage.* L'appareillage (voir figure 2.2.17.-2) se compose d'une cartouche constituée d'un porte-échantillon dans lequel la cupule d'échantillon est fixée de façon amovible, et d'un manchon collecteur muni d'une fente lumineuse horizontale et fixé sous la cupule. Cet assemblage est placé dans un bloc

chauffant. Le bloc est un cylindre métallique percé d'un orifice cylindrique axial dans lequel est placée la cartouche. Une sonde de température est placée dans un autre orifice cylindrique plus étroit, au niveau de la cupule d'échantillon. Le bloc chauffant est entouré d'un système de chauffage électrique. Une lampe est montée sous le bloc chauffant de façon à permettre le passage d'un faisceau de lumière à travers le manchon collecteur, de la fente lumineuse jusqu'à un capteur optique opposé. Le système de chauffage permet de maintenir le bloc chauffant à une température précise prédéfinie et de le chauffer à une vitesse prédéfinie précise et constante après une période initiale isotherme.

*Mode opératoire.* Faites fondre la substance à examiner et introduisez-la dans la cupule conformément aux prescriptions de la monographie. Puis procédez comme indiqué ci-après ou selon les instructions du fabricant. Eliminez avec une spatule l'excès de matière aux 2 extrémités de la cupule. Avant d'effectuer la mesure, appliquez les spécifications de conditionnement de l'échantillon (température et durée) prescrites dans la monographie. Introduisez la cupule dans le porte-échantillon, puis fixez le manchon collecteur sur la cupule. Placez la cartouche ainsi assemblée dans le bloc chauffant. Ajustez l'instrument aux conditions isothermes initiales et réglez la vitesse du chauffage ultérieur, conformément aux prescriptions de la monographie relative à la substance à examiner. Lancez le programme de température. Quand la première goutte d'échantillon fondu chute à travers l'orifice situé au fond de la cupule d'échantillon et interrompt le faisceau lumineux, le signal émis par le capteur optique provoque l'enregistrement automatique de la température du bloc chauffant.




| | |
|---|---|
| A. porte-échantillon | F. système de chauffage |
| B. bloc chauffant | G. cupule d'échantillon |
| C. source de lumière | H. capteur optique |
| D. fente lumineuse | J. manchon collecteur |
| E. cartouche | K. sonde de température |

Figure 2.2.17.-2. – *Exemple d'appareil de mesure du point de goutte automatisé*

*Etalonnage.* Utilisez l'appareil selon les instructions du fabricant et effectuez les opérations de calibration prescrites et les essais de performance du système à intervalles réguliers, selon l'utilisation de l'appareil et des substances à examiner. L'acide benzoïque et la benzophénone sont généralement utilisés comme matériaux de référence certifiés. D'autres matériaux peuvent être utilisés à condition de ne pas présenter de polymorphisme. Procédez comme indiqué ci-après ou selon les instructions du fabricant. Préparez 3 cupules d'échantillon pour chacun des 2 matériaux de référence certifiés. Placez les cupules d'échantillon sur une surface propre. Introduisez une petite quantité d'échantillon dans les cupules et enfoncez-la à l'aide d'une baguette d'environ 4,5 mm de diamètre. Vérifiez que l'ouverture est complètement remplie. Remplissez environ la moitié de la cupule d'échantillon et comprimez l'échantillon avec une baguette d'environ 9 mm de diamètre. Remplissez complètement la cupule et comprimez l'échantillon ; ajoutez encore et comprimez autant d'échantillon que nécessaire pour remplir complètement la cupule.

Programme de température pour l'acide benzoïque : température de départ = 118,0 °C ; vitesse de chauffage = 0,2 °C/min ; température finale = 126,0 °C. Après insertion de la cupule à 118 °C, un temps d'attente de 30 s est programmé avant le début du chauffage.

Programme de température pour la benzophénone : température de départ = 44,0 °C ; vitesse de chauffage = 0,2 °C/min ; température finale = 56,0 °C. Après insertion de la cupule à 44 °C, un temps d'attente de 30 s est programmé avant le début du chauffage.

Vérifiez les 3 résultats individuels : l'essai est valable si les 3 résultats ne s'écartent pas de plus de 0,3 °C de la valeur moyenne.

Calculez la température moyenne corrigée $T_2$ à l'aide de l'expression suivante :

$$T_1 - F$$

$T_1$ = température moyenne du point de goutte de 3 échantillons, en °C,

$F$ = compensation de la différence de température entre l'échantillon et le point du bloc de chauffage où est mesurée la température ; cette valeur varie selon le modèle de l'instrument de mesure du point de goutte automatisé et est fourni par le fabricant.

En tenant compte du point de goutte $T_0$ du matériau de référence certifié, l'exactitude de l'échelle des températures est satisfaisante si $|T_2 - T_0|$ ne dépasse pas 0,3 °C.

**01/2008:20218**

## 2.2.18. POINT DE SOLIDIFICATION

Le point de solidification est la température maximale atteinte au cours de la solidification d'un liquide en surfusion.

*Appareil.* L'appareil (voir figure 2.2.18.-1) est constitué par un tube à essai d'environ 150 mm de longueur et 25 mm de diamètre placé à l'intérieur d'un autre tube d'environ 160 mm de longueur et 40 mm de diamètre.

Le tube intérieur est fermé par un bouchon muni d'un thermomètre de 175 mm environ de longueur, gradué en 0,2 °C et fixé de façon que le réservoir se trouve à 15 mm environ du fond du tube. Le bouchon comporte aussi un orifice laissant coulisser la tige d'un agitateur constitué par une baguette de verre ou autre matière appropriée, dont une des extrémités forme une boucle d'environ 18 mm de diamètre perpendiculaire à la tige. Le tube intérieur et son enveloppe sont maintenus au centre d'un vase cylindrique de 1 litre contenant un liquide réfrigérant approprié remplissant le récipient jusqu'à 20 mm du bord. Un thermomètre est maintenu dans le bain réfrigérant.

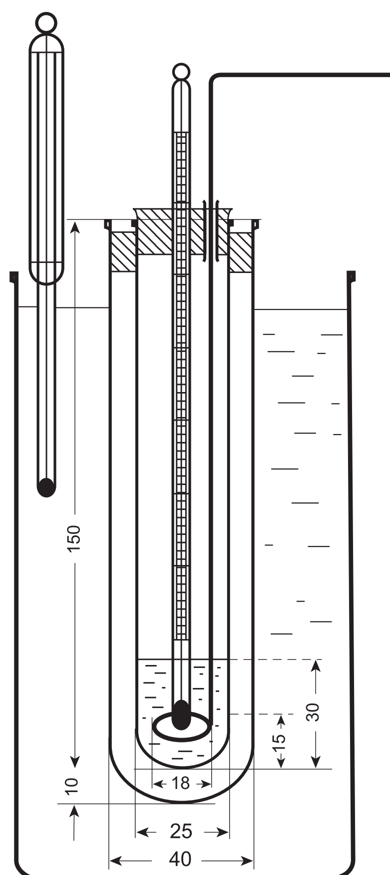



Figure 2.2.18.-1. – *Appareil pour la détermination du point de solidification*
*Dimensions en millimètres*

*Mode opératoire.* Dans le tube intérieur, introduisez une quantité suffisante de la substance à examiner liquide ou fondue au préalable de façon qu'elle recouvre entièrement le réservoir du thermomètre. Déterminez le point de solidification approximatif par refroidissement rapide. Plongez ensuite le tube intérieur dans un bain dont la température est supérieure de 5 °C environ au point de solidification approximatif et maintenez-le jusqu'à quasi-disparition de toute trace de cristaux. Remplissez le vase cylindrique d'eau ou d'une solution saturée de chlorure de sodium dont la température est inférieure de 5 °C environ au point de solidification présumé. Insérez le tube intérieur dans le tube extérieur, assurez-vous de la présence de germes cristallins, plongez l'appareil dans le bain et agitez énergiquement jusqu'à solidification. Notez la température la plus élevée observée au cours de la solidification.

**01/2008:20219**

## 2.2.19. TITRAGE AMPÉROMÉTRIQUE

Au cours d'un titrage ampérométrique le point de fin de titrage est déterminé en suivant la variation de l'intensité du courant, mesurée entre 2 électrodes (une électrode indicatrice et une électrode de référence ou 2 électrodes indicatrices) plongeant dans la solution à examiner et maintenues à une différence de potentiel constante, en fonction de la quantité de réactif titrant ajouté.

Le potentiel de l'électrode de mesure doit être tel qu'il existe un courant de diffusion de la substance électroactive.

*Appareillage.* L'appareillage comporte une source de tension réglable ainsi qu'un microampèremètre sensible ; le système de détection est généralement constitué d'une électrode indicatrice (par exemple une électrode de platine, une électrode à goutte de mercure, une électrode à disque tournant ou une électrode au carbone) couplée à une électrode de référence telle que l'électrode au calomel ou l'électrode à l'argent-chlorure d'argent.

Un appareil à 3 électrodes peut également être utilisé : outre l'électrode indicatrice et l'électrode de référence, il comporte une électrode auxiliaire polarisée.

*Mode opératoire.* Réglez le potentiel de l'électrode indicatrice selon les indications de la monographie et portez sur un graphique l'intensité initiale du courant ainsi que les valeurs obtenues par la suite en fonction de la quantité de réactif titrant ajouté. Ajoutez celui-ci en au moins 3 quantités successives représentant un volume total d'environ 80 pour cent du volume théorique correspondant au point d'équivalence présumé. Les 3 valeurs obtenues doivent se situer sur une droite. Poursuivez l'addition du réactif titrant au-delà du point d'équivalence présumé, en au moins 3 quantités successives : les 3 valeurs obtenues doivent aussi se situer sur une droite. Le point de fin de titrage est situé au point d'intersection des 2 droites.

Dans le cas d'un titrage ampérométrique à 2 électrodes indicatrices, il convient d'enregistrer la totalité de la courbe de titrage et d'utiliser celle-ci pour déterminer le point de fin de titrage.

**01/2008:20220**
**corrigé 6.0**

## 2.2.20. TITRAGE POTENTIOMÉTRIQUE

Au cours d'un titrage potentiométrique le point de fin de titrage est déterminé suivant la variation de la différence de potentiel mesurée entre 2 électrodes (une électrode indicatrice et une électrode de référence ou 2 électrodes indicatrices) plongeant dans la solution à examiner, en fonction de la quantité de réactif titrant ajoutée.

La mesure du potentiel est habituellement effectuée en maintenant le courant nul ou pratiquement nul.

*Appareillage.* L'appareillage utilisé (potentiomètre simple ou appareils à circuits électroniques) comporte un voltmètre permettant une lecture à 1 mV près.

Le choix de l'électrode indicatrice est fonction de la nature des composés à doser : électrode de verre ou électrode métallique (platine, or, argent, mercure, etc.). L'électrode de référence est généralement une électrode au calomel ou une électrode argent-chlorure d'argent.

Dans le cas de titrages acido-basiques et sauf mention contraire dans la monographie, un système d'électrodes de verre/calomel ou verre/argent-chlorure d'argent est utilisé.

*Mode opératoire.* Le mélange de solvants est neutralisé, si nécessaire, avant la dissolution de la substance à examiner. Portez sur un graphique les variations de potentiel en fonction de la quantité de réactif titrant ajouté, en continuant l'addition de ce dernier au-delà du point d'équivalence présumé. Le point de fin de titrage correspond à une variation brusque du potentiel.

**01/2008:20221**

## 2.2.21. FLUORIMÉTRIE

La fluorimétrie est une méthode qui utilise la mesure de l'intensité de lumière fluorescente émise par la substance à examiner par rapport à celle émise par un étalon déterminé.

*Mode opératoire.* Dissolvez la substance dans le solvant ou le mélange de solvants indiqué dans la monographie, versez la solution dans la cuve ou le tube du fluorimètre et illuminez par un faisceau de lumière excitatrice autant que possible monochromatique dont la longueur d'onde est indiquée dans la monographie.

Mesurez l'intensité de la lumière émise sous un angle de 90° par rapport à la direction du faisceau illuminant, après lui avoir fait traverser un filtre qui arrête la lumière incidente et laisse passer la radiation de fluorescence. D'autres types d'appareils peuvent être utilisés à condition qu'ils conduisent à des résultats identiques.

Pour l'analyse quantitative, introduisez d'abord dans l'appareil le solvant ou le mélange de solvants utilisé pour dissoudre l'échantillon. Ajustez l'instrument à zéro, puis introduisez la solution de référence et réglez la sensibilité de l'instrument de façon que le repère soit au-delà de 50. Après avoir effectué le deuxième réglage en ajustant la largeur des fentes, procédez à un nouveau réglage du zéro et à une nouvelle mesure de l'intensité de fluorescence de la solution de référence. Finalement, introduisez la solution de concentration inconnue et lisez la valeur indiquée sur la graduation de l'instrument. Calculez la concentration $c_x$ de la solution à l'aide de la formule :

$$c_x = \frac{I_x c_e}{I_e}$$

$c_x$ = concentration de la solution à examiner,

$c_e$ = concentration de la solution de référence,

$I_x$ = intensité de la lumière émise par la solution à examiner,

$I_e$ = intensité de la lumière émise par la solution de référence.

Lorsque l'intensité de fluorescence n'est pas rigoureusement proportionnelle à la concentration, la mesure peut être effectuée d'après un diagramme d'étalonnage.

Dans certains cas, la mesure peut être faite par rapport à un étalon fixe (par exemple un verre fluorescent ou une solution d'une autre substance fluorescente). La concentration de la substance à examiner sera alors déterminée sur un diagramme d'étalonnage établi dans les mêmes conditions.

**01/2008:20222**

# 2.2.22. SPECTROMÉTRIE D'ÉMISSION ATOMIQUE

PRINCIPE GÉNÉRAL

L'émission atomique est le phénomène observé lorsqu'un rayonnement électromagnétique est émis par des atomes ou des ions excités. En spectrométrie d'émission atomique, l'échantillon est soumis à des températures suffisamment élevées pour entraîner, outre la dissociation en atomes, des taux significatifs d'excitation collisionnelle et permettre l'ionisation des atomes de l'échantillon. Une fois les atomes et les ions portés à l'état excité, ils peuvent revenir à des niveaux d'énergie inférieurs par des transitions énergétiques thermiques ou radiatives, qui s'accompagnent de l'émission d'un rayonnement électromagnétique. Le spectre d'émission d'un élément comporte un plus grand nombre de raies que le spectre d'absorption correspondant.

La spectrométrie d'émission atomique est une technique de détermination de la concentration d'un élément dans un échantillon par mesure de l'intensité de l'une des raies émises par la vapeur atomique de l'élément générée à partir de l'échantillon. La mesure est effectuée à la longueur d'onde correspondant à cette raie.

Le présent chapitre traite uniquement de l'atomisation dans la flamme. La méthode de spectrométrie d'émission atomique utilisant une source plasma (ICP-SEA) est décrite dans un autre chapitre général.

APPAREILLAGE

L'appareillage comprend essentiellement :

– un système d'introduction et de nébulisation des échantillons,
– une flamme servant à générer les atomes à doser,
– un monochromateur,
– un détecteur,
– une unité d'acquisition des données.

La flamme est alimentée par un mélange d'air ou d'oxygène et d'un gaz combustible, par exemple, l'hydrogène, l'acétylène, le propane ou le butane. La source d'atomisation est cruciale, car elle doit fournir une énergie suffisante pour exciter et atomiser les atomes. La flamme présente l'avantage, sur les autres sources d'atomisation, de générer des spectres atomiques plus simples ; sa principale limitation est de manquer, pour de nombreux éléments, de la puissance voulue pour générer une émission permettant la mesure. De l'eau acidifiée est le solvant de choix pour la préparation des solutions à examiner et des solutions de référence. Il est toutefois possible d'utiliser aussi des solvants organiques en prenant les précautions nécessaires pour que le solvant n'affecte pas la stabilité de la flamme.

INTERFÉRENCES

Pour réduire ou éliminer les interférences spectrales, il faut choisir une raie d'émission appropriée à la mesure, ou ajuster la fente qui détermine la largeur de la bande passante. Les interférences physiques sont corrigées en diluant la solution à examiner, en adaptant la matrice ou en utilisant la méthode des ajouts dosés. La réduction des interférences chimiques est possible à l'aide de modificateurs chimiques ou de tampons d'ionisation.

EFFET MÉMOIRE

Pour limiter l'effet mémoire qui résulte du dépôt de l'analyte dans l'appareil, il convient d'effectuer des rinçages minutieux entre les enregistrements, de diluer (si possible) les solutions à analyser pour en réduire la teneur en sels, et d'aspirer les solutions aussi rapidement que possible.

MODE OPÉRATOIRE

L'emploi, dans la mesure du possible, de matériel de laboratoire en plastique est recommandé.

Utilisez un spectromètre d'émission atomique conformément aux instructions du fabricant et en opérant à la longueur d'onde prescrite. Optimisez les conditions expérimentales (température de flamme, hauteur de brûleur, utilisation d'un tampon ionique, concentration des solutions) en fonction de l'élément à doser et de la matrice de l'échantillon. Introduisez une solution à blanc dans le dispositif d'analyse et ajustez l'instrument au zéro ou à la valeur à blanc. Introduisez ensuite la solution de référence de concentration la plus élevée et réglez la sensibilité de façon à obtenir une lecture appropriée.

Il est préférable de travailler à des concentrations situées dans la partie linéaire de la courbe d'étalonnage. En cas d'impossibilité, on peut également utiliser des courbes d'étalonnage présentant une courbure, à condition de recourir à des logiciels de traitement appropriés.

Les mesures s'effectuent par comparaison avec des solutions de référence de concentration connue en élément à doser, soit par la méthode de la courbe d'étalonnage (Procédé I), soit par la méthode des ajouts dosés (Procédé II).

*PROCÉDÉ I - MÉTHODE DE LA COURBE D'ÉTALONNAGE*

Pour les analyses de routine, il convient de préparer et d'examiner 3 solutions de référence et une solution à blanc.

Préparez la solution de la substance à examiner (solution à examiner) comme prescrit dans la monographie. Préparez au moins 3 solutions de référence dont les concentrations en élément à doser encadrent la concentration présumée de la solution à examiner. Pour les dosages, la gamme d'étalonnage optimale va de 0,7 fois à 1,3 fois la teneur présumée en élément à doser ou la teneur limite prescrite dans la monographie. Pour les essais de pureté, la gamme d'étalonnage s'étend de la limite de détection à 1,2 fois la limite spécifiée pour l'élément à doser. Tous les réactifs utilisés dans la préparation de la solution à examiner sont ajoutés, à la même concentration, aux solutions de référence et à la solution à blanc.

Introduisez chacune des solutions dans le dispositif d'analyse avec le même nombre de réplications pour chaque solution de façon à obtenir une lecture stable.

**Calcul**. Tracez la courbe d'étalonnage à partir de la moyenne des lectures obtenues avec les solutions de référence, en représentant les moyennes en fonction de la concentration, et déterminez la concentration de l'élément à doser dans la solution à examiner à l'aide de la courbe obtenue.

*PROCÉDÉ II - MÉTHODE DES AJOUTS DOSÉS*

Dans au moins 3 fioles jaugées identiques, introduisez des volumes égaux de la solution de la substance à examiner (solution à examiner) préparée comme prescrit. Ajoutez à toutes les fioles, sauf une, des volumes croissants d'une solution de référence de concentration connue en élément à doser, de façon à obtenir une série de solutions contenant des quantités progressivement croissantes de l'élément, choisies de manière à obtenir des réponses situées dans la partie linéaire de la courbe, si possible. Complétez au trait de jauge avec le solvant.

Introduisez chacune des solutions dans le dispositif d'analyse avec le même nombre de réplications pour chaque solution de façon à obtenir une lecture stable.

**Calcul**. Calculez l'équation de régression linéaire du graphique en utilisant la méthode des moindres carrés et résolvez-la de façon à obtenir la concentration de l'élément à doser dans la solution à examiner.

VALIDATION DE LA MÉTHODE

Les performances des méthodes prescrites dans les monographies sont vérifiées à intervalles de temps appropriés.

*LINÉARITÉ*

Préparez et analysez au moins 4 solutions de référence couvrant l'intervalle d'étalonnage, et une solution à blanc, avec au minimum 5 réplications.

Calculez la courbe d'étalonnage par la méthode des moindres carrés à partir de l'ensemble des valeurs mesurées. Représentez graphiquement la courbe de régression, les moyennes, les valeurs mesurées et l'intervalle de confiance de la courbe d'étalonnage. Le mode opératoire est valable si :

- le coefficient de corrélation est supérieur ou égal à 0,99,
- les résidus obtenus pour chaque concentration d'étalonnage présentent une distribution aléatoire autour de la courbe d'étalonnage.

Calculez la moyenne et l'écart type relatif pour la concentration la plus faible et la plus élevée de la gamme d'étalonnage.

Si le rapport des écarts types estimés pour la plus faible et la plus élevée des concentrations d'étalonnage est inférieur à 0,5 ou supérieur à 2,0, une estimation plus précise de la courbe d'étalonnage peut être obtenue par régression linéaire pondérée. Des fonctions de pondération du premier et du second degré sont appliquées aux données pour déterminer la fonction de pondération la plus appropriée. Si les moyennes présentent un écart de linéarité par rapport à la courbe d'étalonnage, une régression linéaire bidimensionnelle est utilisée.

*EXACTITUDE*

Vérifiez l'exactitude en utilisant de préférence un matériel de référence certifié (CRM). En cas d'impossibilité, effectuez un essai de recouvrement.

**Recouvrement**. Pour les dosages, un recouvrement de 90 pour cent à 110 pour cent doit être obtenu. Pour d'autres déterminations, par exemple le dosage de traces d'éléments, l'essai n'est valable que si le recouvrement se situe dans l'intervalle allant de 80 pour cent à 120 pour cent de la valeur théorique. Le recouvrement peut être déterminé sur une solution de référence appropriée (matrice) dopée avec une quantité connue de l'élément à analyser (concentration médiane de l'intervalle d'étalonnage).

*RÉPÉTABILITÉ*

La répétabilité est au maximum de 3 pour cent pour un dosage et de 5 pour cent pour un essai de pureté.

*LIMITE DE QUANTIFICATION*

Vérifiez que la limite de quantification (déterminée par exemple par l'approche dite 10 $\sigma$) est inférieure à la valeur à mesurer.

**01/2008:20223**

## 2.2.23. SPECTROMÉTRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE

PRINCIPE GÉNÉRAL

L'absorption atomique est le phénomène observé lorsqu'un atome à l'état fondamental absorbe un rayonnement électromagnétique à une longueur d'onde spécifique et passe à un état excité. Les atomes à l'état fondamental absorbent l'énergie à leur fréquence de résonance, et cette absorption se traduit par une atténuation du rayonnement électromagnétique. L'absorption d'énergie est en théorie proportionnelle au nombre d'atomes présents.

Le présent chapitre fournit des informations générales et décrit les procédures à suivre pour les déterminations élémentaires par spectrométrie d'absorption atomique utilisant différentes techniques d'atomisation (flamme, vaporisation électrothermique dans un four de graphite, génération d'hydrures, technique de la vapeur froide pour le mercure).

La spectrométrie d'absorption atomique est une technique de détermination de la concentration d'un élément dans un échantillon, par mesure de l'absorption d'un rayonnement électromagnétique par la vapeur atomique de l'élément générée à partir de l'échantillon. La mesure est effectuée à la longueur d'onde de l'une des raies d'absorption (de résonance) de l'élément concerné. La quantité de rayonnement absorbée est, selon la loi de Lambert-Beer, proportionnelle à la concentration de l'élément.

APPAREILLAGE

L'appareillage comprend essentiellement :

- une source de rayonnement,
- un dispositif d'introduction des échantillons,
- un dispositif d'atomisation des échantillons,
- un monochromateur ou un polychromateur,
- un détecteur,
- une unité d'acquisition des données.

L'appareil est généralement équipé d'un système de correction du bruit de fond. Les sources de rayonnement utilisées peuvent être des lampes à cathode creuse ou des lampes à décharge sans électrode (EDL), qui émettent un spectre à raies très étroites (d'une largeur à mi-hauteur d'environ 0,002 nm) correspondant à l'élément à doser.

Il existe 3 techniques d'atomisation des échantillons.

- Atomisation dans la flamme

  Ce dispositif d'atomisation se compose d'un système de nébulisation, qui comporte un accessoire de production pneumatique d'aérosol, d'un régulateur de débit gazeux et d'un brûleur. Divers mélanges combustible-comburant sont couramment utilisés, pour produire des températures allant d'environ 2000 K à 3000 K. Parmi les combustibles gazeux figurent le propane, l'hydrogène et l'acétylène ; le comburant peut être de l'air ou du protoxyde d'azote. La configuration du brûleur est adaptée au gaz utilisé, et le débit gazeux est réglable. Les échantillons sont nébulisés, et le solvant de choix pour la préparation des solutions à examiner et des solutions de référence est de l'eau acidifiée. Il est toutefois possible d'utiliser aussi des solvants organiques en prenant les précautions nécessaires pour que le solvant n'affecte pas la stabilité de la flamme.
- Atomisation électrothermique

  Ce dispositif d'atomisation se compose généralement d'un four à tube de graphite à alimentation électrique. L'ensemble de l'échantillon est atomisé dans un four à tube de graphite, et la vapeur atomique est retenue sur le parcours optique pendant un certain temps, ce qui permet d'améliorer la limite de détection. Les échantillons, liquides ou solides, sont introduits directement dans le four à tube de graphite qui est chauffé en une série d'étapes programmées pour

dessécher l'échantillon, éliminer par pyrolyse les principaux composants de la matrice, puis atomiser la totalité de l'élément à analyser. Le nettoyage du four s'effectue par programmation d'une température finale supérieure à la température d'atomisation. La circulation d'un gaz inerte lors de l'étape de pyrolyse dans le four à tube de graphite permet d'améliorer les performances à l'atomisation.

– Génération d'hydrures et vapeur froide

La vapeur atomique peut aussi être générée à l'extérieur du spectromètre. Tel est notamment le cas lorsqu'il est fait appel à la méthode dite de vapeur froide pour le mercure ou à la génération d'hydrures pour des éléments tels que l'arsenic, l'antimoine, le bismuth, le sélénium et l'étain. En ce qui concerne le mercure, les atomes sont générés par réduction chimique avec du chlorure stanneux ou du borohydrure de sodium et la vapeur atomique est entraînée par un courant de gaz inerte dans une cellule froide de quartz placée sur le trajet optique de l'instrument. Les hydrures générés sont entraînés par un gaz inerte dans une cellule chauffée, à l'intérieur de laquelle ils sont dissociés en atomes.

INTERFÉRENCES

Des interférences chimiques, physiques, d'ionisation ou spectrales peuvent affecter les mesures d'absorption atomique. Les interférences chimiques sont compensées par addition de modificateurs de matrice, d'agents modifiant la volatilité de l'élément, ou en utilisant, pour la flamme, un mélange protoxyde d'azote-acétylène qui permet d'obtenir une température élevée. L'emploi de tampons d'ionisation spécifiques (lanthane ou césium par exemple) permet de compenser les interférences d'ionisation. Les interférences physiques liées à la salinité ou à la viscosité de l'échantillon sont éliminées en diluant l'échantillon, en utilisant la méthode des ajouts dosés ou en ajustant la matrice. Quant aux interférences spectrales, qui résultent de la superposition de raies de résonance, il est possible de s'en affranchir en opérant à une raie de résonance différente. La correction du fond par application de l'effet Zeeman permet également de compenser les interférences spectrales et les interférences d'absorption moléculaire, notamment en atomisation électrothermique. L'utilisation de lampes à cathode creuse multi-éléments peut elle aussi être à l'origine d'interférences spectrales. L'absorption spécifique ou non spécifique est mesurée dans un domaine spectral défini par la largeur de la bande passante sélectionnée par le monochromateur (0,2-2 nm).

CORRECTION DU BRUIT DE FOND

Dans une flamme ou en atomisation électrothermique, la diffusion et l'absorption de fond entraînent une erreur de mesure par excès. L'absorption de fond couvre un large intervalle de longueurs d'onde, alors que l'absorption atomique spécifique se produit sur un intervalle très étroit (environ 0,005-0,02 nm). L'absorption de fond peut en principe être corrigée en utilisant une solution à blanc de composition exactement identique à celle de l'échantillon, mais sans l'élément spécifique à déterminer ; cette méthode est toutefois souvent impraticable. En atomisation électrothermique, il convient d'optimiser la température de pyrolyse pour éliminer les produits de décomposition de la matrice qui sont responsables de l'absorption de fond. La correction de fond peut également être effectuée en utilisant 2 sources lumineuses différentes, la lampe à cathode creuse qui mesure l'absorption totale (élément + fond) et une lampe au deutérium à spectre d'émission continu, qui permet de mesurer l'absorption de fond. La correction consiste à soustraire le signal de la lampe au deutérium du signal de la lampe à cathode creuse. Cette méthode n'est cependant applicable que sur un domaine spectral limité, car les spectres émis par les lampes au deutérium vont de 190 nm à 400 nm. Il est également possible de mesurer l'absorption de fond en effectuant des lectures sur une raie non absorbante voisine de la raie de résonance, et en soustrayant cette mesure de celle obtenue sur la raie de résonance. Enfin, une autre méthode de correction de l'absorption de fond est l'application de l'effet Zeeman (décomposition de la raie d'absorption sous l'influence d'un champ magnétique). Elle est particulièrement utile lorsque l'absorption de fond présente une structure fine, et permet une correction efficace sur l'intervalle 185-900 nm.

CHOIX DES CONDITIONS OPÉRATOIRES

Après avoir sélectionné la longueur d'onde et la largeur de fente appropriées à l'élément à doser, il convient de vérifier la nécessité des points suivants :

– correction de l'absorption de fond non spécifique,
– addition de modificateurs chimiques ou de tampons d'ionisation à l'échantillon ainsi qu'à la solution à blanc et aux solutions de référence,
– dilution de l'échantillon pour réduire, par exemple, les interférences physiques,
– description détaillée de la programmation de température : préchauffage, séchage, pyrolyse, atomisation, post-atomisation, avec temps de rampe et temps d'arrêt,
– débit du gaz inerte,
– utilisation de modificateurs de matrice pour l'atomisation électrothermique (four),
– emploi d'agents réducteurs pour les mesures portant sur le mercure ou d'autres éléments générateurs d'hydrures, avec une cellule de vapeur froide ou une cellule chauffée,
– spécification du modèle du four (nacelle, plate-forme de L'vov, etc.).

MODE OPÉRATOIRE

L'emploi, dans la mesure du possible, de matériel de laboratoire en plastique est recommandé. La préparation de l'échantillon peut nécessiter une dissolution, une digestion (souvent assistée par micro-ondes) ou une étape de calcination ou une combinaison de ces étapes afin de purifier la matrice et/ou d'éliminer des substances carbonées. Si on travaille dans un système ouvert, la température de calcination ne doit pas dépasser 600 °C en raison de la volatilité de certains métaux, sauf spécification contraire dans la monographie.

Utilisez un spectromètre d'absorption atomique conformément aux instructions du fabricant et en opérant à la longueur d'onde prescrite. Introduisez une solution à blanc dans le dispositif d'analyse et ajustez la lecture de l'instrument de façon qu'il indique une transmission maximale. Il est possible de déterminer la valeur à blanc en utilisant du solvant pour régler le zéro de l'appareil. Introduisez ensuite la solution de référence de concentration la plus élevée et réglez la sensibilité de façon à obtenir une lecture d'absorbance maximale. Rincez pour éviter la contamination et l'effet mémoire. Une fois l'analyse terminée, effectuez un rinçage à l'*eau R* ou à l'eau acidifiée.

Si une technique d'échantillonnage solide est requise, le procédé à suivre est entièrement décrit dans la monographie.

Il est préférable de travailler à des concentrations situées dans la partie linéaire de la courbe d'étalonnage. En cas d'impossibilité, on peut également utiliser des courbes d'étalonnage présentant une courbure, à condition de recourir à des logiciels de traitement appropriés.

Les mesures s'effectuent par comparaison avec des solutions de référence de concentration connue en élément à doser, soit par la méthode de la courbe d'étalonnage (Procédé I), soit par la méthode des ajouts dosés (Procédé II).

*PROCÉDÉ I - ÉTALONNAGE DIRECT*

Pour les analyses de routine, il convient de préparer et d'examiner 3 solutions de référence et une solution à blanc.

Préparez la solution de la substance à examiner (solution à examiner) comme prescrit dans la monographie. Préparez au moins 3 solutions de référence dont les concentrations en élément à doser encadrent la concentration présumée de la solution à examiner. Pour les dosages, la gamme d'étalonnage

optimale va de 0,7 fois à 1,3 fois la teneur présumée en élément à doser ou la teneur limite prescrite dans la monographie. Pour les essais de pureté, la gamme d'étalonnage s'étend de la limite de détection à 1,2 fois la limite spécifiée pour l'élément à doser. Tous les réactifs utilisés dans la préparation de la solution à examiner sont ajoutés, à la même concentration, aux solutions de référence et à la solution à blanc.

Introduisez chacune des solutions dans le dispositif d'analyse avec le même nombre de réplications pour chaque solution, de façon à obtenir une lecture stable.

**Calcul**. Tracez la courbe d'étalonnage à partir de la moyenne des lectures obtenues avec les solutions de référence, en représentant les moyennes en fonction de la concentration, et déterminez la concentration de l'élément dans la solution à examiner à l'aide de la courbe obtenue.

*PROCÉDÉ II - MÉTHODE DES AJOUTS DOSÉS*

Dans au moins 3 fioles jaugées identiques, introduisez des volumes égaux de la solution de la substance à examiner (solution à examiner) préparée comme prescrit. Ajoutez à toutes les fioles, sauf une, des volumes croissants d'une solution de référence de concentration connue en élément à doser, de façon à obtenir une série de solutions contenant des quantités progressivement croissantes de l'élément et choisies de manière à obtenir des réponses situées dans la partie linéaire de la courbe, si possible. Complétez au trait de jauge avec le solvant.

Introduisez, à au moins 3 reprises, chacune des solutions dans le dispositif d'analyse avec le même nombre de réplications pour chaque solution, de façon à obtenir une lecture stable.

**Calcul**. Calculez l'équation de régression linéaire du graphique en utilisant la méthode des moindres carrés et résolvez-la de façon à obtenir la concentration de l'élément à doser dans la solution à examiner.

VALIDATION DE LA MÉTHODE

Les performances des méthodes prescrites dans les monographies sont vérifiées à intervalles de temps appropriés.

*LINÉARITÉ*

Préparez et analysez au moins 4 solutions de référence couvrant l'intervalle d'étalonnage, et une solution à blanc, avec au minimum 5 réplications.

Calculez la courbe d'étalonnage par la méthode des moindres carrés à partir de l'ensemble des valeurs mesurées. Représentez graphiquement la courbe de régression, les moyennes, les valeurs mesurées et l'intervalle de confiance de la courbe d'étalonnage. Le mode opératoire est valable si :

- le coefficient de corrélation est supérieur ou égal à 0,99,
- les résidus obtenus pour chaque concentration d'étalonnage présentent une distribution aléatoire autour de la courbe d'étalonnage.

Calculez la moyenne et l'écart type relatif pour la concentration la plus faible et la plus élevée de la gamme d'étalonnage.

Si le rapport des écarts types estimés pour la plus faible et la plus élevée des concentrations d'étalonnage est inférieur à 0,5 ou supérieur à 2,0, une estimation plus précise de la courbe d'étalonnage peut être obtenue par régression linéaire pondérée. Des fonctions de pondération du premier et du second degré sont appliquées aux données pour déterminer la fonction de pondération la plus appropriée. Si les moyennes présentent un écart de linéarité par rapport à la courbe d'étalonnage, une régression linéaire bidimensionnelle est utilisée.

*EXACTITUDE*

Vérifiez l'exactitude en utilisant de préférence un matériel de référence certifié (CRM). En cas d'impossibilité, effectuez un essai de recouvrement.

**Recouvrement**. Pour les dosages, un recouvrement de 90 pour cent à 110 pour cent doit être obtenu. Pour d'autres déterminations, par exemple le dosage de traces d'éléments, l'essai n'est valable que si le recouvrement se situe dans l'intervalle allant de 80 pour cent à 120 pour cent de la valeur théorique. Le recouvrement peut être déterminé sur une solution de référence appropriée (matrice) dopée avec une quantité connue de l'élément à analyser (concentration médiane de l'intervalle d'étalonnage).

*RÉPÉTABILITÉ*

La répétabilité est au maximum de 3 pour cent pour un dosage et de 5 pour cent pour un essai de pureté.

*LIMITE DE QUANTIFICATION*

Vérifiez que la limite de quantification (déterminée par exemple par l'approche dite 10 σ) est inférieure à la valeur à mesurer.

**01/2008:20224**

## 2.2.24. SPECTROPHOTOMÉTRIE D'ABSORPTION DANS L'INFRAROUGE

Les spectrophotomètres infrarouges sont adaptés aux mesures de spectres dans la région de 4000-650 $cm^{-1}$ (2,5-15,4 µm) ou éventuellement jusqu'à 200 $cm^{-1}$ (50 µm).

APPAREILLAGE

Les spectrophotomètres utilisés pour l'enregistrement de spectres comprennent une source de lumière appropriée, un monochromateur ou un interféromètre, et un détecteur.

Les spectrophotomètres à transformée de Fourier utilisent un rayonnement polychromatique. Ils effectuent le calcul du spectre dans le domaine de fréquence, à partir des données obtenues, par transformée de Fourier. Des spectrophotomètres munis d'un système optique susceptible de fournir un rayonnement monochromatique dans la région de mesure peuvent également être utilisés. Le spectre est généralement présenté en fonction de la transmittance, c'est-à-dire le rapport de l'intensité du rayonnement transmis à celle du rayonnement incident. Il peut également être présenté en fonction de l'absorbance.

L'absorbance ($A$) est définie comme le logarithme décimal de l'inverse de la transmittance ($T$) :

$$A = \log_{10}\left(\frac{1}{T}\right) = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

$T$ = $\frac{I}{I_0}$,

$I_0$ = intensité du rayonnement incident,

$I$ = intensité du rayonnement transmis.

PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

*MESURE PAR TRANSMISSION OU ABSORPTION*

Préparez la substance en utilisant l'une des méthodes suivantes.

**Liquides**. Examinez un liquide sous forme d'une pellicule maintenue entre 2 plaques (fenêtres) transparentes aux rayons infrarouges ou dans une cuve d'une longueur de parcours appropriée, également transparente aux rayons infrarouges.

**Liquides ou solides préparés sous forme de solution**. Préparez une solution dans un solvant approprié ; choisissez une concentration et une longueur de parcours de cuve qui donnent un spectre satisfaisant. Généralement, de bons résultats sont obtenus avec des concentrations de 10-100 g/L pour une longueur de parcours de 0,5-0,1 mm. L'absorption due au solvant doit être compensée par l'introduction dans le faisceau de référence d'une cuve semblable, contenant le solvant utilisé. Dans le cas d'instruments à transformée de Fourier, cette compensation est réalisée par enregistrement successif des spectres du solvant et de l'échantillon. L'absorbance du solvant, corrigée d'un facteur de compensation, est soustraite de celle de l'échantillon à l'aide d'un logiciel de calcul.

**Solides**. Examinez un solide dispersé soit dans un liquide convenable (pâte), soit dans un solide (pastille d'halogénure). Lorsque la monographie l'indique, utilisez une pellicule de substance fondue entre 2 plaques transparentes aux rayons infrarouges.

A. Pâte

Triturez une petite quantité de substance à examiner avec un minimum de *paraffine liquide R* ou d'un autre liquide approprié ; 5-10 mg de substance à examiner suffisent généralement pour préparer une pâte adéquate avec une goutte de *paraffine liquide R*. Comprimez la pâte entre 2 plaques transparentes aux rayons infrarouges.

B. Pastille

Triturez 1-2 mg de substance à examiner avec 300-400 mg, sauf indication contraire, de *bromure de potassium R* ou de *chlorure de potassium R* finement pulvérisé et desséché. Ces quantités suffisent généralement pour préparer une pastille d'un diamètre de 10-15 mm et obtenir un spectre d'intensité satisfaisante. Si la substance est un chlorhydrate, il est recommandé d'utiliser du *chlorure de potassium R*. Broyez soigneusement le mélange, étendez-le uniformément dans une matrice spéciale et soumettez-le à une pression d'environ 800 MPa (8 t·cm$^{-2}$). Dans le cas des substances instables dans les conditions atmosphériques normales, ou hygroscopiques, la pastille est comprimée sous vide. Plusieurs facteurs, par exemple un broyage insuffisant ou excessif, l'humidité ou d'autres impuretés dans le milieu de dispersion ou une pulvérisation insuffisante, peuvent provoquer la formation de pastilles imparfaites. Une pastille est rejetée lorsqu'un examen visuel révèle un manque d'uniformité dans la transparence ou lorsque la transmittance à environ 2000 cm$^{-1}$ (5 µm), en l'absence d'une bande d'absorption spécifique, est inférieure à 60 pour cent sans compensation, sauf indication contraire.

**Gaz**. Utilisez une cellule transparente aux rayons infrarouges permettant l'examen de l'échantillon gazeux sur une longueur de parcours optique d'environ 100 mm. Après avoir éliminé l'air de la cellule, reliez celle-ci à l'aide d'un tube adducteur approprié au récipient contenant le gaz à examiner. Ajustez le contenu de la cellule à une pression appropriée, au moyen d'un robinet à boisseau ou d'une vanne à aiguille.

Si nécessaire, ajustez le contenu de la cellule à la pression atmosphérique en faisant appel à un gaz transparent aux rayons infrarouges (par exemple l'*azote R* et l'*argon R*). En vue de pallier les interférences d'absorption dues à l'eau, au dioxyde de carbone ou à d'autres gaz atmosphériques, effectuez si possible la mesure par référence à une cellule identique soit vide de tout gaz, soit remplie d'un gaz transparent aux rayons infrarouges.

*MESURE PAR RÉFLEXION DIFFUSE*

**Solides**. Triturez un mélange de substance à examiner et de *bromure de potassium R* ou de *chlorure de potassium R* finement pulvérisé et desséché. Utilisez un mélange contenant environ 5 pour cent de la substance, sauf indication contraire. Broyez le mélange, placez-le dans une cupule et examinez le spectre de réflectance.

Pour obtenir le spectre d'absorbance de l'échantillon, traitez mathématiquement le spectre obtenu par la fonction de Kubelka-Munk.

*MESURE PAR RÉFLEXION TOTALE ATTÉNUÉE*

La réflexion totale atténuée (qui comprend la réflexion multiple) repose sur la réflexion interne de la lumière par un milieu transmetteur, généralement avec un certain nombre de réflexions. Il existe cependant des dispositifs dans lesquels ne se produit qu'une seule réflexion.

Préparez la substance comme suit. Placez la substance à examiner en contact étroit avec un élément de réflexion interne (ERI) de type diamant, germanium, séléniure de zinc, bromoiodure de thallium (KRS-5) ou tout autre matériau approprié possédant un indice de réfraction élevé. Veillez à assurer un contact intime et uniforme entre la substance et toute la surface du cristal de l'ERI, soit en appliquant une pression, soit en dissolvant la substance dans un solvant approprié, puis en recouvrant l'ERI avec la solution obtenue et en évaporant à siccité. Examinez le spectre de réflexion totale atténuée.

IDENTIFICATION AU MOYEN DE SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Préparez la substance à examiner et la substance de référence de la même façon et enregistrez les spectres entre 4000-650 cm$^{-1}$ (2,5-15,4 µm) dans les mêmes conditions opératoires. Les minimums de transmission (maximums d'absorption) du spectre obtenu avec la substance à examiner correspondent en position et en dimensions relatives à ceux du spectre obtenu avec la substance de référence (*SCR*).

Lorsque l'examen à l'état solide révèle des écarts dans la position des minimums de transmission (maximums d'absorption), traitez la substance à examiner et la substance de référence dans les mêmes conditions de façon qu'elles cristallisent ou se présentent sous la même forme ou opérez comme prescrit dans la monographie, puis enregistrez les spectres.

IDENTIFICATION AU MOYEN DE SPECTRES DE RÉFÉRENCE

**Contrôle du pouvoir de résolution**. Dans le cas des instruments comportant un monochromateur, enregistrez le spectre d'un film de polystyrène d'une épaisseur d'environ 35 µm. La différence $x$ (voir figure 2.2.24.-1) entre le pourcentage de transmittance au maximum de transmission $A$ à 2870 cm$^{-1}$ (3,48 µm) et celui au minimum de transmission $B$ à 2849,5 cm$^{-1}$ (3,51 µm) doit être supérieure à 18. La différence $y$ entre le pourcentage de transmittance au maximum de transmission $C$ à 1589 cm$^{-1}$ (6,29 µm) et celui au minimum de transmission $D$ à 1583 cm$^{-1}$ (6,32 µm) doit être supérieure à 10.

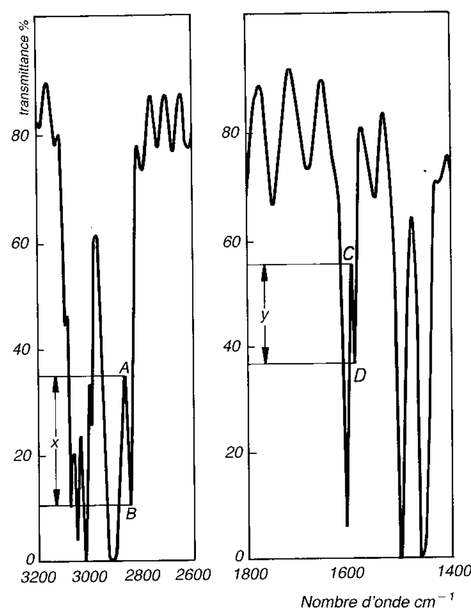



Figure 2.2.24.-1. – *Exemple d'un spectre de polystyrène utilisé pour contrôler le pouvoir de résolution*

Dans le cas des instruments à transformée de Fourier, utilisez une résolution convenable avec l'apodisation appropriée indiquée par le fabricant. Vérifiez la résolution par un moyen adéquat, par exemple l'enregistrement du spectre d'un film de polystyrène d'une épaisseur d'environ 35 µm. La différence d'absorbance entre le minimum d'absorption à 2870 cm$^{-1}$ et le maximum d'absorption à 2849,5 cm$^{-1}$ est supérieure à 0,33. La différence d'absorbance entre le minimum d'absorption à 1589 cm$^{-1}$ et le maximum d'absorption à 1583 cm$^{-1}$ est supérieure à 0,08.

**Vérification de l'échelle des nombres d'onde**. La vérification de l'échelle des nombres d'onde peut être effectuée à l'aide d'un film de polystyrène qui présente des minimums de transmission (maximums d'absorption) aux nombres d'onde (en $cm^{-1}$) indiqués dans le tableau 2.2.24.-1.

Tableau 2.2.24.-1. – *Minimums de transmission et tolérances admises pour un film de polystyrène*

| Minimums de transmission ($cm^{-1}$) | Tolérances admises ($cm^{-1}$) | |
|---|---|---|
| | Instruments à monochromateur | Instruments à transformée de Fourier |
| 3060,0 | ± 1,5 | ± 1,0 |
| 2849,5 | ± 2,0 | ± 1,0 |
| 1942,9 | ± 1,5 | ± 1,0 |
| 1601,2 | ± 1,0 | ± 1,0 |
| 1583,0 | ± 1,0 | ± 1,0 |
| 1154,5 | ± 1,0 | ± 1,0 |
| 1028,3 | ± 1,0 | ± 1,0 |

**Mode opératoire**. Préparez la substance à examiner conformément aux directives accompagnant le spectre ou la substance de référence. Enregistrez le spectre de la substance à examiner dans les mêmes conditions opératoires que celles utilisées pour obtenir le spectre de référence, qui sont habituellement les conditions dans lesquelles le contrôle du pouvoir de résolution a été effectué. Les positions et les dimensions relatives des bandes du spectre de la substance à examiner et du spectre de référence doivent être concordantes.

**Compensation pour la vapeur d'eau et le dioxyde de carbone**. Dans le cas des instruments à transformée de Fourier, une compensation d'interférence spectrale due à la vapeur d'eau et au dioxyde de carbone atmosphérique est effectuée à l'aide d'algorithmes appropriés, suivant les instructions du fabricant. L'acquisition des spectres peut également être réalisée avec des instruments convenablement purgés ou en veillant à enregistrer dans des conditions exactement identiques les spectres monofaisceau de l'échantillon et du fond.

IMPURETÉS DANS LES GAZ

La recherche des impuretés par cette méthode nécessite l'utilisation d'une cellule transparente au rayonnement infrarouge permettant l'examen du gaz sur une longueur de parcours optique appropriée (par exemple 1-20 m). Remplissez la cellule suivant le procédé indiqué sous Gaz. Procédez à la détection et à la détermination quantitative des impuretés en suivant les instructions données dans la monographie spécifique.

**01/2008:20225**

## 2.2.25. SPECTROPHOTOMÉTRIE D'ABSORPTION DANS L'ULTRAVIOLET ET LE VISIBLE

**Détermination de l'absorbance**. L'absorbance (*A*) d'une solution est le logarithme décimal de l'inverse de la transmittance (*T*) pour un rayonnement monochromatique. Elle s'exprime par l'équation :

$$A = \log_{10}\left(\frac{1}{T}\right) = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

$T$ = $I/I_0$,

$I_0$ = intensité du rayonnement monochromatique incident,

$I$ = intensité du rayonnement monochromatique transmis.

En l'absence d'autres facteurs physicochimiques, l'absorbance (*A*) est proportionnelle à l'épaisseur (*b*) de la couche traversée et à la concentration (*c*) de la substance dissoute, en accord avec l'équation :

$$A = \varepsilon c b$$

$\epsilon$ = absorbance molaire, si *b* est exprimé en centimètres et *c* en moles par litre.

L'expression $A_{1\,\mathrm{cm}}^{1\,\mathrm{pour\,cent}}$ représentant l'absorbance spécifique d'une substance dissoute, se rapporte à l'absorbance d'une solution à 10 g/L sous une épaisseur de 1 cm à une longueur d'onde déterminée d'où :

$$A_{1\,\mathrm{cm}}^{1\,\mathrm{pour\,cent}} = \frac{10\varepsilon}{M_r}$$

Sauf indication contraire, mesurez l'absorbance à la longueur d'onde prescrite sous une épaisseur de 1 cm. Sauf indication contraire, effectuez les mesures par rapport au même solvant ou au même mélange de solvants. L'absorbance du solvant, mesurée par rapport à l'air et à la longueur d'onde prescrite, ne doit en aucun cas dépasser 0,4 et doit être de préférence inférieure à 0,2. Tracez le spectre d'absorption en portant en ordonnée les valeurs d'absorbance ou toute fonction de celle-ci et en abscisse la longueur d'onde ou toute fonction de celle-ci.

Lorsque la monographie donne une seule valeur pour la position d'un maximum d'absorption, il est admis que la valeur obtenue peut s'en écarter de 2 nm.

**Appareil**. Les spectrophotomètres utilisés pour l'étude des régions ultraviolette et visible du spectre sont constitués par un système optique, susceptible de fournir un rayonnement monochromatique dans la région 200-800 nm, et par un dispositif approprié à la mesure de l'absorbance.

**Contrôle des longueurs d'onde**. Vérifiez l'échelle des longueurs d'onde en utilisant les maximums d'absorption de la *solution de perchlorate d'holmium R*, la raie de la lampe à hydrogène ou au deutérium ou les raies de l'arc à vapeur de mercure indiqués dans le tableau 2.2.25.-1. La tolérance admise est de ± 1 nm pour la région de l'ultraviolet et de ± 3 nm pour la région du visible. Des matériaux de référence certifiés appropriés peuvent également être utilisés.

Tableau 2.2.25.-1. – *Maximums d'absorption pour le contrôle de l'échelle des longueurs d'onde*

| | |
|---|---|
| 241,15 nm (Ho) | 404,66 nm (Hg) |
| 253,7 nm (Hg) | 435,83 nm (Hg) |
| 287,15 nm (Ho) | 486,0 nm (Dβ) |
| 302,25 nm (Hg) | 486,1 nm (Hβ) |
| 313,16 nm (Hg) | 536,3 nm (Ho) |
| 334,15 nm (Hg) | 546,07 nm (Hg) |
| 361,5 nm (Ho) | 576,96 nm (Hg) |
| 365,48 nm (Hg) | 579,07 nm (Hg) |

**Contrôle de l'absorbance**. Contrôlez l'absorbance au moyen de filtres appropriés ou de solution de *dichromate de potassium R* aux longueurs d'onde indiquées dans le tableau 2.2.25.-2. Pour chaque longueur d'onde, la valeur précise et les valeurs limites de l'absorbance spécifique y figurent. Le tableau est basé sur une tolérance admise pour l'absorbance de ± 0,01.

Pour le contrôle de l'absorbance, utilisez des solutions de *dichromate de potassium R* préalablement desséché à 130 °C jusqu'à masse constante. Pour le contrôle de l'absorbance à 235 nm, 257 nm, 313 nm et 350 nm, dissolvez une prise d'essai de 57,0-63,0 mg de *dichromate de potassium R* dans de l'*acide sulfurique 0,005 M* et complétez à 1000,0 mL avec le même acide. Pour le contrôle de l'absorbance à 430 nm, dissolvez une prise d'essai de 57,0-63,0 mg de substance desséchée dans de l'*acide sulfurique 0,005 M* et complétez à 100,0 mL avec le

même acide. Des matériaux de référence certifiés appropriés peuvent également être utilisés.

**Limite de lumière parasite**. La lumière parasite peut être décelée à une longueur d'onde donnée à l'aide de filtres ou de solutions appropriés ; par exemple, l'absorbance d'une solution de *chlorure de potassium R* à 12 g/L mesurée sous une épaisseur de 1 cm augmente de façon abrupte entre 220 nm et 200 nm et est supérieure à 2,0 à 198 nm, lorsqu'elle est comparée à l'eau comme liquide de compensation. Des matériaux de référence certifiés appropriés peuvent également être utilisés.

**Pouvoir de résolution** (analyse qualitative). Lorsque la monographie l'exige, effectuez comme suit la mesure du pouvoir de résolution de l'appareil : enregistrez le spectre d'une solution de *toluène R* à 0,02 pour cent *V/V* dans l'*hexane R*. Le rapport minimal entre l'absorbance au maximum à 269 nm et l'absorbance au minimum à 266 nm est indiqué dans la monographie. Des matériaux de référence certifiés appropriés peuvent également être utilisés.

**Largeur de la fente spectrale** (analyse quantitative). Pour éviter des lectures erronées dues à la largeur de la fente spectrale, lors de l'utilisation d'un instrument à largeur de fente variable à la longueur d'onde choisie, la largeur de la fente doit être faible par rapport à la demi-largeur de la bande d'absorption mais, en même temps, elle doit être aussi large que possible pour obtenir une valeur élevée de $I_0$. Toutefois, la largeur de fente est choisie de telle façon que toute nouvelle diminution de largeur ne modifie pas la lecture de l'absorbance.

Tableau 2.2.25.-2

| Longueur d'onde (nm) | Absorbance spécifique $A_{1\,\text{cm}}^{1\,\text{pour cent}}$ | Tolérance maximale |
|---|---|---|
| 235 | 124,5 | 122,9 à 126,2 |
| 257 | 144,5 | 142,8 à 146,2 |
| 313 | 48,6 | 47,0 à 50,3 |
| 350 | 107,3 | 105,6 à 109,0 |
| 430 | 15,9 | 15,7 à 16,1 |

**Cuves**. La tolérance d'épaisseur des cuves utilisées est de ± 0,005 cm. Remplies du même solvant, les cuves destinées à contenir la solution à examiner et le liquide de compensation doivent présenter la même transmittance. Si tel n'est pas le cas, une correction appropriée doit être apportée.

Veillez soigneusement à l'entretien et au nettoyage des cuves.

SPECTROPHOTOMÉTRIE DÉRIVÉE

La spectrophotométrie dérivée consiste en la transformation d'un spectre d'absorption (ordre zéro) en spectres de dérivée première, de dérivée seconde ou de dérivée d'ordres supérieurs.

Un *spectre de dérivée première* représente le tracé du gradient de la courbe d'absorption (c'est à dire du taux du changement de l'absorbance $dA/d\lambda$) en fonction de la longueur d'onde.

Un *spectre de dérivée seconde* représente la courbe du spectre d'absorption en fonction de la longueur d'onde ($d^2A/d\lambda^2$). La dérivée seconde à la longueur d'onde λ est liée à la concentration selon l'équation suivante :

$$\frac{d^2A}{d\lambda^2} = \frac{d^2A_{1\,\text{cm}}^{1\,\text{pour cent}}}{d\lambda^2} \times \frac{c'b}{10} = \frac{d^2A\varepsilon}{d\lambda^2} \times \frac{cb}{10}$$

$c'$ = concentration de la substance absorbante, en grammes par litre.

**Appareillage**. Utilisez un spectrophotomètre satisfaisant aux exigences ci-dessus et équipé d'un module analogique de différenciation à capacitance-résistance ou d'un module numérique ou de tout autre dispositif permettant de produire des spectres dérivés. Certains dispositifs permettant d'obtenir un spectre de dérivée seconde produisent un décalage des longueurs d'onde par rapport au spectre d'ordre zéro, dont il convient de tenir compte si nécessaire.

**Pouvoir de résolution**. Lorsque la monographie le prescrit, enregistrez la dérivée seconde du spectre d'une solution de *toluène R* à 0,02 pour cent *V/V* dans le *méthanol R*, en utilisant du *méthanol R* comme liquide de compensation. Le spectre présente un petit extremum négatif situé entre 2 extremums négatifs plus importants, respectivement, à 261 nm et 268 nm, comme le montre la figure 2.2.25.-1. Sauf indication contraire dans la monographie, le rapport *A/B* (voir figure 2.2.25.-1) n'est pas inférieur à 0,2.

**Procédé**. Préparez la solution de la substance à examiner, réglez l'appareil conformément aux instructions du fabricant et calculez la teneur de la substance à déterminer selon les instructions de la monographie.

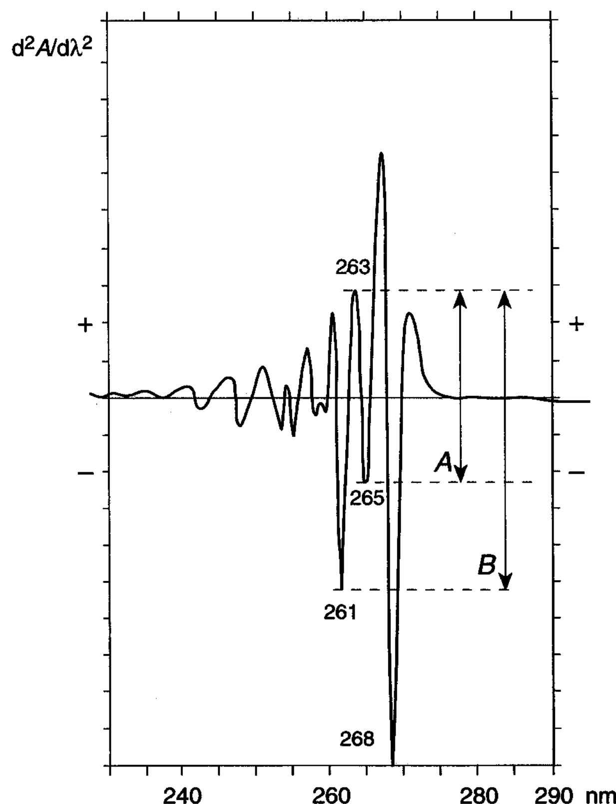



Figure 2.2.25.-1

**01/2008:20226**

## 2.2.26. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

CHROMATOGRAPHIE ASCENDANTE

*Appareillage.* L'appareillage est constitué par une chambre à chromatographie de verre dont les dimensions sont en rapport avec celles des papiers à utiliser. Elle est munie d'un couvercle de verre assurant une fermeture étanche et pourvue à la partie supérieure d'un dispositif destiné à assurer la suspension du papier à chromatographie, dispositif qui peut être abaissé sans ouvrir la chambre. Au fond de celle-ci se trouve une cuve pour la phase mobile dans laquelle peut descendre le papier. Le papier à chromatographie utilisé est un papier filtre convenable ; il est découpé en bandes de longueur suffisante et de largeur de 2,5 cm au moins, de façon que la migration du solvant s'effectue dans le sens des fibres du papier.

*Mode opératoire.* Versez dans la cuve une couche de 2,5 cm environ de la phase mobile indiquée dans la monographie, et, si celle-ci le prescrit, versez la phase stationnaire entre les

parois de la chambre et la cuve. Mettez en place le couvercle, laissez reposer à 20-25 °C pendant 24 h et maintenez à la même température pendant toute la durée des opérations. A 3 cm d'une des extrémités du papier, tracez au crayon une fine ligne parallèle au bord du papier. Avec une micropipette, déposez sur la ligne tracée le volume de solution indiqué dans la monographie. Si la tache atteint un diamètre supérieur à 10 mm, déposez la solution par fractions en laissant chaque fois au solvant le temps de s'évaporer. Si la même bande de papier est utilisée pour plus d'un chromatogramme, les différentes solutions sont déposées le long de la ligne à une distance minimale de 3 cm les unes des autres. Introduisez ensuite le papier dans la chambre, replacez le couvercle et laissez reposer pendant 1 h 30 min. Descendez le papier dans la phase mobile et retirez-le quand le solvant a parcouru la distance prescrite ou que s'est écoulé le temps indiqué dans la monographie. Séchez à l'air. Pendant la période de développement, maintenez le papier à l'abri d'une lumière vive.

CHROMATOGRAPHIE DESCENDANTE

*Appareillage*. L'appareillage est constitué par une chambre à chromatographie de verre à bord rodé dont les dimensions sont en rapport avec celles des papiers à utiliser. Elle est munie d'un couvercle de verre assurant une fermeture étanche et présentant un orifice central de 1,5 cm environ de diamètre ; cet orifice est obturé par une plaque de verre rodée ou par un bouchon. A la partie supérieure de la chambre et à l'intérieur de celle-ci, est disposée sur des supports une cuve à solvant munie d'un dispositif permettant de fixer la partie supérieure du papier à chromatographie. Sur les 2 côtés de la cuve, parallèlement et légèrement au-dessus de ses bords supérieurs, sont fixées 2 baguettes de verre destinées à servir de supports au papier dont l'extrémité libre ne doit toucher la chambre en aucun point.

Le papier à chromatographie est un papier filtre convenable ; il est découpé en bandes de longueur suffisante et de largeur comprise entre 2,5 cm et la longueur de la cuve de façon que la migration du solvant s'effectue dans le sens des fibres du papier.

*Mode opératoire*. Versez dans le fond de la chambre une couche de 2,5 cm environ du solvant indiqué dans la monographie ; mettez en place le couvercle, laissez reposer à 20-25 °C pendant 24 h et maintenez à la même température pendant toute la durée des opérations. Tracez au crayon une fine ligne parallèle à l'un des petits côtés du papier. La distance entre cette ligne et l'une des extrémités du papier est telle que, lorsque cette extrémité est fixée dans la cuve et que le reste du papier retombe librement, la ligne se trouve à quelques centimètres au-dessous de la baguette-guide et parallèle à celle-ci. Avec une micropipette, déposez sur la ligne tracée le volume de solution indiqué dans la monographie. Si la tache atteint un diamètre supérieur à 10 mm, déposez la solution par fractions en laissant chaque fois au solvant le temps de s'évaporer. Si la même bande de papier est utilisée pour plus d'un chromatogramme, les différentes solutions sont déposées le long de la ligne à une distance minimale de 3 cm les unes des autres. Introduisez ensuite le papier dans la chambre, replacez le couvercle et laissez reposer pendant 1 h 30 min. Versez dans la cuve par l'orifice du couvercle, la phase mobile en quantité suffisante et refermez. Retirez le papier quand le solvant a parcouru la distance prescrite ou que s'est écoulé le temps indiqué dans la monographie. Séchez à l'air. Pendant la période de développement, maintenez le papier à l'abri d'une lumière vive.

**01/2008:20227**

## 2.2.27. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

La chromatographie sur couche mince est une technique de séparation dans laquelle une phase stationnaire, constituée d'un matériau approprié, est répandue en une couche mince et uniforme sur un support (plaque) de verre, de métal ou de plastique. Des solutions d'analytes sont appliquées sur la plaque avant le développement. La séparation repose sur les mécanismes d'adsorption, de partage ou d'échange d'ions ou sur des combinaisons de ces mécanismes et elle s'effectue par migration (développement) de solutés (solutions d'analytes) dans un solvant ou un mélange de solvants approprié (phase mobile) à travers la couche mince (phase stationnaire).

APPAREILLAGE

**Plaques**. La chromatographie s'effectue avec des plaques préfabriquées, conformes à la description figurant sous *Réactifs* (*4.1.1*).

*Prétraitement des plaques*. Il peut être nécessaire de laver les plaques avant la séparation. Cette opération peut être effectuée par migration d'un solvant approprié. Les plaques peuvent aussi être imprégnées par des procédés tels que le développement, l'immersion ou la pulvérisation. Au moment de leur utilisation, les plaques peuvent être activées si nécessaire, par chauffage à l'étuve à 120 °C pendant 20 min.

**Cuve à chromatographie** à fond plat ou à double bac, en matière transparente et inerte, de dimensions appropriées aux plaques utilisées et munie d'un couvercle assurant une fermeture étanche. Pour le développement horizontal, la cuve sera munie d'un bac pour la phase mobile et d'un dispositif permettant de guider la phase mobile vers la phase stationnaire.

**Micropipettes, microseringues, capillaires calibrés jetables** ou tout autre dispositif d'application adapté au dépôt correct des solutions.

**Dispositif de détection de fluorescence** permettant de mesurer la fluorescence directe ou l'inhibition de fluorescence.

**Dispositifs de révélation et réactifs**. Afin de visualiser les composants séparés, des dispositifs appropriés sont employés pour la dérivatisation par transfert de réactifs sur la plaque (pulvérisation, immersion, vapeurs) et, dans les cas appropriés, pour le chauffage de la plaque.

**Documentation**. Un dispositif peut être employé pour établir une documentation du chromatogramme visualisé, par exemple une photographie ou un fichier informatique.

MODE OPÉRATOIRE

**Dépôt des échantillons**. Déposez le volume prescrit des solutions à une distance appropriée du bord inférieur et des côtés de la plaque et sur une ligne parallèle au bord inférieur ; laissez un intervalle d'au moins 10 mm (5 mm pour les plaques haute performance) entre les centres des dépôts circulaires et d'au moins 5 mm (2 mm pour les plaques haute performance) entre les côtés des dépôts en bande. Déposez les solutions en portions suffisamment petites pour obtenir des taches circulaires de 2-5 mm de diamètre (1-2 mm pour les plaques haute performance) ou des bandes de 10-20 mm (5-10 mm pour les plaques haute performance) sur 1-2 mm.

Quand une plaque ordinaire et une plaque haute performance peuvent être utilisées dans une même monographie, les conditions opératoires concernant la plaque haute performance sont indiquées entre crochets [ ] après celles qui concernent la plaque ordinaire.

**Procédé vertical**. Tapissez les parois de la cuve à chromatographie avec du papier filtre. Versez dans la cuve à chromatographie une quantité de phase mobile suffisante par rapport au volume de la cuve pour obtenir, après imprégnation du papier filtre, une hauteur de liquide adaptée aux dimensions de la plaque. Pour la saturation de la cuve, replacez le couvercle et laissez reposer à 20-25 °C pendant 1 h. Sauf indication contraire dans la monographie, la séparation s'effectue dans une cuve saturée. Déposez le volume prescrit des solutions comme décrit ci-dessus. Lorsque le solvant des solutions déposées est évaporé, déposez la plaque dans la cuve, placez-la en position aussi verticale que possible, les dépôts restant toujours au-dessus du niveau de la phase mobile. Refermez la cuve à chromatographie et maintenez-la à une température de 20-25 °C, à l'abri de la lumière du soleil. Retirez la plaque

lorsque la phase mobile a parcouru la distance prescrite, mesurée entre les points de dépôt et le front du solvant. Séchez-la et procédez à la visualisation des chromatogrammes comme prescrit.

Dans le cas d'une chromatographie bidimensionnelle, séchez les plaques après le premier développement et effectuez un second développement dans une direction perpendiculaire à celle du premier développement.

**Procédé horizontal**. Déposez le volume prescrit des solutions comme décrit ci-dessus. Lorsque le solvant des solutions déposées est évaporé, ajoutez une quantité suffisante de phase mobile dans le bac de la cuve à l'aide d'une seringue ou d'une pipette, posez la plaque dans la cuve après avoir vérifié l'horizontalité de cette dernière et raccordez le dispositif permettant de guider la phase mobile conformément aux instructions du fabricant. Si la monographie le prescrit, développez la plaque en commençant simultanément par les 2 extrémités. Fermez la cuve et maintenez la température à 20-25 °C. Retirez la plaque lorsque la phase mobile a parcouru la distance indiquée dans la monographie. Séchez et procédez à la visualisation des chromatogrammes comme prescrit.

Dans le cas d'une chromatographie bidimensionnelle, séchez les plaques après le premier développement et effectuez un second développement dans une direction perpendiculaire à celle du premier développement.

ÉVALUATION VISUELLE

**Identification**. Comparez visuellement la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner et la tache correspondante du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, en comparant la coloration, les dimensions et le facteur de retardement ($R_F$) respectifs des 2 taches.

Le facteur de retardement ($R_F$) est défini comme étant le rapport entre la distance séparant le point de dépôt du centre de la tache et la distance parcourue par le front du solvant à partir du point de dépôt.

*Vérification du pouvoir de séparation aux fins d'identification*. Normalement, les résultats obtenus par l'essai de performance décrit dans *Réactifs* (*4.1.1*) sont suffisants. Dans des cas particuliers seulement, un critère de performance supplémentaire est prescrit par la monographie.

**Essai des substances apparentées**. Comparez visuellement la (les) tache(s) secondaire(s) du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner soit à la (aux) tache(s) correspondante(s) du chromatogramme obtenu avec la solution témoin contenant la (les) impureté(s), soit à la tache du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, préparée à partir d'une dilution de la solution à examiner.

*Vérification du pouvoir de séparation*. Les exigences relatives à la vérification du pouvoir de séparation sont prescrites dans les monographies concernées.

*Vérification du pouvoir de détection*. Le pouvoir de détection est considéré comme satisfaisant si la tache ou la bande du chromatogramme obtenu avec la solution témoin la plus diluée est nettement visible.

MESURES QUANTITATIVES

Les exigences relatives à la résolution et à la séparation sont prescrites dans les monographies concernées.

Les substances répondant à l'exposition aux rayons UV-Vis séparées par chromatographie sur couche mince peuvent être directement déterminées sur une plaque, à condition d'utiliser un appareillage approprié. Examinez la plaque en mesurant la réflectance du faisceau incident, tout en déplaçant la plaque ou le dispositif de mesure. De la même manière la fluorescence peut être mesurée à l'aide d'un système optique approprié. Les substances contenant des radionucléides peuvent être quantifiées de 3 manières différentes : directement, soit en déplaçant la plaque ou un compteur approprié l'un par rapport à l'autre (voir *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*), soit en découpant les plaques en bandes et en mesurant la radioactivité sur chacune des bandes à l'aide d'un compteur approprié, ou en grattant la phase stationnaire, en la dissolvant dans un mélange pour scintillation adéquat et en mesurant la radioactivité à l'aide d'un compteur à scintillation liquide.

**Appareillage**. L'appareillage permettant la mesure directe sur la plaque comporte :

– un dispositif pour le positionnement exact et la reproduction précise du volume de substance déposée sur la plaque ;
– un dispositif mécanique permettant de déplacer la plaque ou le dispositif de mesure autour de l'axe des $x$ ou de l'axe des $y$ ;
– un enregistreur et un intégrateur approprié ou un ordinateur ;
– *pour les substances répondant à une exposition aux rayons UV-Vis* : un photomètre avec une source de lumière, un système optique capable de générer une lumière monochromatique et une cellule photoélectrique de sensibilité adéquate sont utilisés pour mesurer la réflectance ou la transmittance ; si la fluorescence est mesurée, un filtre est nécessaire afin d'empêcher la lumière d'excitation d'arriver au détecteur tout en laissant passer la lumière émise ou une partie spécifique de celle-ci ;
– *pour les substances contenant des radionucléides* : un compteur adéquat pour la mesure de la radioactivité. L'intervalle de linéarité du compteur doit être vérifié.

**Mode opératoire**. Préparez la solution de la substance à examiner (solution à examiner) selon les indications données dans la monographie et, si nécessaire, préparez les solutions témoins de la substance à déterminer en utilisant le même solvant que dans la solution à examiner. Déposez le même volume de chaque solution sur la plaque et développez.

*Substances répondant à une exposition aux rayons UV-Vis*. Préparez et déposez au moins 3 solutions témoins de la substance à examiner, dont les concentrations encadrent la valeur attendue dans la solution à examiner (environ 80 pour cent, 100 pour cent et 120 pour cent). Traitez par le réactif prescrit, si nécessaire, puis enregistrez la réflectance, la transmittance ou la fluorescence des chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et les solutions témoins. A l'aide des résultats obtenus, déterminez la quantité de substance dans la solution à examiner.

*Substances contenant des radionucléides*. Préparez et déposez une solution à examiner contenant environ 100 pour cent de la valeur attendue. Déterminez la radioactivité en fonction de la longueur du parcours et notez la radioactivité dans chaque pic en résultant, sous forme de pourcentage de la quantité de radioactivité totale.

Des critères de conformité du système sont décrits dans le chapitre *Techniques de séparation chromatographique* (*2.2.46*). Les limites dans lesquelles il est possible de faire varier les différents paramètres, pour satisfaire aux critères de conformité du système, sont également indiquées dans ce chapitre.

**01/2008:20228**

## 2.2.28. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation chromatographique reposant sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire contenue dans une colonne et un gaz vecteur, comme phase mobile, qui traverse cette phase stationnaire. Elle est applicable aux substances, ou dérivés de substances, qui se volatilisent dans les conditions de température utilisées.

La CPG est fondée sur les mécanismes d'adsorption, de distribution de masse ou d'exclusion.

APPAREILLAGE

L'appareillage se compose d'un injecteur, d'une colonne chromatographique placée dans un four, d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (ou d'un intégrateur ou enregistreur). Le gaz vecteur circule à travers la colonne à débit ou pression contrôlés, puis passe à travers le détecteur.

La chromatographie peut se dérouler à température constante ou selon un programme de température donné.

*INJECTEURS*

L'*injection directe* des solutions est le mode usuel d'injection, sauf indication contraire dans la monographie. Elle peut être effectuée soit directement en tête de colonne, au moyen d'une seringue ou d'une vanne d'injection, soit dans une chambre de vaporisation qui peut être équipée d'un diviseur de flux.

L'*injection en phase vapeur* peut être effectuée au moyen de systèmes d'injection à espace de tête statique ou dynamique.

Les systèmes d'injection à *espace de tête dynamique* (« purge and trap ») comprennent un dispositif qui entraîne les substances volatiles en solution vers une colonne-piège maintenue à basse température, où elles sont adsorbées. On procède ensuite, par chauffage rapide de la colonne-piège, à une désorption des substances retenues vers la phase mobile.

Les systèmes d'injection à *espace de tête statique* comprennent une enceinte de chauffage thermostatée dans laquelle des flacons fermés contenant les échantillons solides ou liquides sont placés pendant une durée donnée, pour permettre la vaporisation des composants volatils jusqu'à équilibre entre la phase vapeur et la phase non gazeuse. Une fois l'équilibre atteint, une quantité déterminée de l'espace de tête est injectée dans le chromatographe.

*PHASES STATIONNAIRES*

Les colonnes contenant la phase stationnaire peuvent être de différents types :

– colonne capillaire de silice fondue à paroi recouverte par la phase stationnaire,
– colonne remplie de particules inertes imprégnées avec la phase stationnaire,
– colonne remplie d'une phase stationnaire solide.

Les colonnes capillaires ont un diamètre intérieur (Ø) de 0,1 mm à 0,53 mm et une longueur de 5 m à 60 m. La phase liquide ou stationnaire est déposée sur la paroi interne de la colonne, à laquelle elle peut être chimiquement liée, sous la forme d'un film d'une épaisseur de 0,1 µm à 5,0 µm.

Les colonnes remplies, en verre ou métal, ont généralement une longueur de 1 m à 3 m et un diamètre intérieur (Ø) de 2 mm à 4 mm. Les phases stationnaires se composent généralement de polymères poreux ou supports solides imprégnés d'une phase liquide.

Les supports servant à l'analyse des composés polaires sur colonnes remplies à phase stationnaire faiblement polaire de faible capacité doivent être inertes, pour éviter le phénomène de traînée des pics. La réactivité du matériau constituant le support peut être réduite par silanisation, préalablement au dépôt de la phase liquide. On utilise fréquemment de la terre d'infusoire calcinée et lavée à l'acide. Les matériaux existent dans différentes granulométries, les plus couramment utilisées se situant dans les intervalles 150-180 µm et 125-150 µm.

*PHASES MOBILES*

Le temps de rétention et l'efficacité sont fonction du débit du gaz vecteur. Le temps de rétention est par ailleurs directement proportionnel à la longueur de la colonne, alors que la résolution est proportionnelle à la racine carrée de la longueur de la colonne. Dans le cas des colonnes remplies, le débit du gaz vecteur est généralement exprimé en millilitres par minute, sous pression atmosphérique et à température ambiante. Il est mesuré à la sortie du détecteur, à l'aide d'un dispositif mécanique étalonné ou d'un compte-bulles, lorsque la colonne a atteint sa température de service. A débit volumique donné, la vitesse linéaire de déplacement du gaz à travers une colonne remplie est inversement proportionnelle à la racine carrée du diamètre intérieur de la colonne : un débit de 60 mL/min dans une colonne de 4 mm de diamètre intérieur et un débit de 15 mL/min dans une colonne de 2 mm de diamètre intérieur donneront la même vitesse linéaire de déplacement, et par conséquent des temps de rétention semblables.

Les gaz vecteurs les plus couramment utilisés sont l'hélium ou l'azote pour les colonnes remplies, l'azote, l'hélium et l'hydrogène pour les colonnes capillaires.

*DÉTECTEURS*

Les détecteurs à ionisation de flamme sont les plus utilisés, mais, selon l'objectif de l'analyse, il est également possible de recourir à la capture d'électrons, à des détecteurs azote-phosphore, à la spectrométrie de masse, à la conductivité thermique ou à la spectrophotométrie infrarouge avec transformée de Fourier et d'autres méthodes.

MODE OPÉRATOIRE

Equilibrez la colonne, l'injecteur et le détecteur aux températures et débits indiqués dans la monographie, jusqu'à obtention d'une ligne de base stable. Préparez la (les) solution(s) à examiner et la (les) solution(s) témoin(s) prescrites. Les solutions doivent être exemptes de particules solides.

Des critères de conformité du système sont décrits dans le chapitre *Techniques de séparation chromatographique* (*2.2.46*). Les limites dans lesquelles il est possible de faire varier les différents paramètres, pour satisfaire aux critères de conformité du système, sont également indiquées dans ce chapitre.

## Chromatographie en phase gazeuse à espace de tête statique

La chromatographie en phase gazeuse à espace de tête statique est une technique spécialement adaptée à la séparation et au dosage des composés volatils présents dans des échantillons solides ou liquides. Elle est fondée sur l'analyse d'une phase vapeur à l'équilibre avec la phase solide ou liquide.

APPAREILLAGE

L'appareillage se compose d'un chromatographe en phase gazeuse sur lequel est adapté un dispositif d'introduction de l'échantillon, éventuellement relié à un module de programmation contrôlant automatiquement la température et la pression ; il peut également comprendre, si nécessaire, un dispositif d'élimination des solvants.

L'échantillon à analyser est introduit dans un récipient comportant un obturateur approprié, ainsi qu'un système de vannes permettant le passage du gaz vecteur. L'ensemble est placé dans une enceinte thermostatée à la température prescrite pour l'échantillon examiné.

L'échantillon est maintenu à cette température pendant le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre entre la phase gazeuse et la phase solide ou liquide.

Le gaz vecteur est introduit dans le récipient, puis, après le temps prescrit, l'ouverture d'une vanne appropriée permet au gaz de passer, en se détendant, sur la colonne, entraînant avec lui les composés volatilisés.

Au lieu d'un chromatographe spécialement équipé pour l'introduction des échantillons, il est également possible d'utiliser des seringues étanches et un chromatographe usuel. Dans ce cas, l'équilibrage est réalisé dans une enceinte séparée et il convient de prendre les précautions nécessaires pour éviter toute modification de l'équilibre lors du transfert de la phase vapeur sur la colonne.

MODE OPÉRATOIRE

A l'aide des préparations témoins, procédez aux réglages requis pour obtenir une réponse satisfaisante.

*ÉTALONNAGE DIRECT*

Dans des récipients identiques, introduisez séparément la préparation à examiner et chacune des préparations témoins, selon les prescriptions de la monographie, de façon que le dispositif de prélèvement n'entre pas en contact avec les échantillons.

Fermez hermétiquement les récipients et placez-les dans l'enceinte thermostatée, réglée sur la température et la pression indiquées dans la monographie ; après équilibrage, procédez à la chromatographie dans les conditions prescrites.

*AJOUTS DOSÉS*

Dans une série de récipients appropriés identiques, introduisez des volumes égaux de la préparation à examiner. Ajoutez à tous les récipients, sauf un, des quantités appropriées d'une préparation témoin contenant le composé à doser à concentration connue, de façon à obtenir une série de préparations de concentration progressivement croissante.

Fermez hermétiquement les récipients et placez-les dans l'enceinte thermostatée, réglée sur la température et la pression indiquées dans la monographie ; après équilibrage, procédez à la chromatographie dans les conditions prescrites.

Calculez l'équation de la droite par la méthode des moindres carrés. A l'aide de cette équation, calculez la concentration du composé à doser dans la préparation à examiner.

Il est également possible de procéder comme suit : portez sur un graphique la moyenne des valeurs lues, en fonction de la quantité ajoutée du composé à doser. Extrapolez la droite joignant les points du graphique jusqu'à l'axe des concentrations. La distance entre le point d'intersection et l'origine représente la concentration du composé à doser dans la préparation à examiner.

*ÉPUISEMENTS SUCCESSIFS (EXTRACTION À ESPACE DE TÊTE MULTIPLE)*

Lorsque la méthode des épuisements successifs est prescrite, le procédé est entièrement décrit dans la monographie.

**01/2008:20229**

## 2.2.29. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

La chromatographie liquide (CL) est une technique de séparation chromatographique reposant sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire contenue dans une colonne et une phase mobile liquide qui traverse, par percolation, cette phase stationnaire.

La CL est principalement fondée sur les mécanismes d'adsorption, de distribution de masse, d'échange d'ions, d'exclusion ou d'interaction stéréochimique.

### APPAREILLAGE

L'appareillage se compose d'un système de pompage, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique (éventuellement thermostatée), d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (ou d'un intégrateur ou enregistreur). La phase mobile, délivrée à partir d'un ou plusieurs réservoirs, circule à travers la colonne, généralement à débit constant, puis passe à travers le détecteur.

*SYSTÈMES DE POMPAGE*

Les systèmes de pompage pour CL doivent fournir la phase mobile à un débit constant. Il convient de limiter autant que possible les fluctuations de pression, par exemple en faisant passer le solvant sous pression à travers un dispositif amortissant les pulsations. Les tubes et raccords doivent pouvoir résister aux pressions développées par la pompe. Les pompes pour CL peuvent être équipées d'un dispositif de purge qui permet de chasser les bulles d'air emprisonnées.

Les systèmes pilotés par microprocesseur sont capables de délivrer avec précision une phase mobile de composition constante (élution isocratique) ou variable (gradient d'élution), selon un programme défini. Pour les chromatographies à gradient d'élution, il existe des systèmes de pompage qui délivrent le(s) solvant(s) à partir de plusieurs réservoirs, le mélange pouvant être effectué soit en amont (basse-pression) soit en aval (haute-pression) de la (des) pompe(s).

*INJECTEURS*

La solution à examiner est introduite dans la phase mobile circulante en tête de colonne, ou à proximité de celle-ci, à l'aide d'un système d'injection conçu pour fonctionner à pression élevée. Les injecteurs peuvent être à boucle fixe ou à volume variable, à fonctionnement manuel ou pilotés par un échantillonneur automatique. Le remplissage partiel des boucles, manuellement, peut entraîner une moindre fidélité du volume injecté.

*PHASES STATIONNAIRES*

De nombreux types de phases stationnaires sont utilisés en CL, notamment :

– de la silice, de l'alumine ou du graphite poreux, utilisés en chromatographie en polarité de phase normale, où la séparation repose sur une adsorption différentielle et/ou une distribution de masse,
– des résines ou polymères à groupements acides ou basiques, utilisés en chromatographie à échange d'ions, où la séparation repose sur la compétition entre les ions à séparer et ceux de la phase mobile,
– de la silice ou des polymères poreux, utilisés en chromatographie d'exclusion, où la séparation repose sur les différences de volume entre molécules, ce qui correspond à une exclusion stérique,
– divers supports chimiquement modifiés, préparés à partir de polymères, de silice ou de graphite poreux, utilisés en CL en polarité de phase inversée, où la séparation repose principalement sur le partage des molécules entre la phase mobile et la phase stationnaire,
– des phases stationnaires chimiquement modifiées spéciales, telles que des dérivés de la cellulose ou de l'amylose, des protéines ou des peptides, des cyclodextrines, etc., pour la séparation des énantiomères (chromatographie chirale).

La plupart des séparations reposent sur des mécanismes de partage utilisant de la silice chimiquement modifiée comme phase stationnaire et des solvants polaires comme phase mobile. La surface du support (par exemple les groupes silanol de la silice) est mise en présence de différents réactifs de la famille des silanes, avec lesquels elle réagit en formant, par liaison covalente, des dérivés silylés qui occupent un nombre variable des sites actifs de la surface du support. La nature de la phase greffée est un paramètre déterminant pour les propriétés de séparation du système chromatographique.

Les phases greffées les plus couramment utilisées sont les suivantes :

| | | |
|---|---|---|
| octyl | = $Si\text{-}[CH_2]_7\text{-}CH_3$ | $C_8$ |
| octadécyl | = $Si\text{-}[CH_2]_{17}\text{-}CH_3$ | $C_{18}$ |
| phényl | = $Si\text{-}[CH_2]_n\text{-}C_6H_5$ | $C_6H_5$ |
| cyanopropyl | = $Si\text{-}[CH_2]_3\text{-}CN$ | CN |
| aminopropyl | = $Si\text{-}[CH_2]_3\text{-}NH_2$ | $NH_2$ |
| diol | = $Si\text{-}[CH_2]_3\text{-}O\text{-}CH(OH)\text{-}CH_2\text{-}OH$ | |

Sauf indication contraire du fabricant, les colonnes en phase inversée à base de silice sont considérées comme stables pour les phases mobiles de pH apparent compris entre 2,0 et 8,0. Les phases à base de graphite poreux ou de particules de polymères tels que le copolymère styrène-divinylbenzène sont stables sur un intervalle de pH plus étendu.

Il est possible dans certains cas de procéder par chromatographie en phase normale en utilisant comme phase stationnaire de la silice non modifiée, du graphite poreux ou de la silice chimiquement modifiée polaire (cyanopropyl ou diol par exemple), avec une phase mobile non polaire.

En chromatographie analytique, la taille des particules constituant les phases stationnaires les plus souvent utilisées est comprise entre 3 µm et 10 µm. Les particules peuvent être de forme sphérique ou irrégulière, et de porosité et surface spécifique variables. Ces paramètres ont une influence sur le comportement chromatographique de la phase stationnaire. Dans le cas des phases inversées, la nature de la phase stationnaire, le taux de greffage (exprimé par exemple en taux de carbone) et le fait que la phase stationnaire soit ou non postgreffée (« end-capping » : silylation des groupes silanol résiduels) sont aussi des facteurs déterminants. La présence de groupes silanol résiduels peut entraîner une traînée des pics, notamment des substances basiques.

Les colonnes utilisées en chromatographie analytique sont en acier inoxydable, sauf indication contraire dans la monographie, et sont de longueur et de diamètre intérieur (Ø) variables. Les colonnes de diamètre intérieur inférieur à 2 mm sont souvent appelées microcolonnes. La température de la phase mobile et de la colonne doit être maintenue constante pendant toute la durée de l'analyse. La plupart des séparations sont effectuées à température ambiante, mais il est possible de chauffer les colonnes pour obtenir une efficacité supérieure. Il est toutefois recommandé de ne pas dépasser 60 °C, sous peine de dégradation de la phase stationnaire ou d'altération de la composition de la phase mobile.

*PHASES MOBILES*

Pour la chromatographie en phase normale, les solvants utilisés sont de faible polarité. Un strict contrôle de la présence d'eau dans la phase mobile est nécessaire pour obtenir des résultats reproductibles. Pour la CL en phase inversée, on utilise des phases mobiles aqueuses, avec ou sans modifiants organiques.

Les composants de la phase mobile sont généralement filtrés pour éliminer les particules de taille supérieure à 0,45 µm. Les phases mobiles à plusieurs composants sont préparées par mesure des volumes requis (à moins que les proportions ne soient spécifiées en masse) pour chaque composant, puis mélange des différents composants. Une autre méthode possible consiste à délivrer les solvants au moyen de pompes individuelles commandées par des vannes à débit proportionnant, le mélange étant ainsi effectué dans les proportions souhaitées. Les solvants sont normalement dégazés avant le pompage, par passage d'un courant d'hélium, sonication ou traitement en ligne par des modules membrane/vide, pour éviter la formation de bulles de gaz dans la cellule de détection.

Les solvants utilisés pour préparer la phase mobile sont normalement exempts d'agents stabilisants, et transparents à la longueur d'onde de détection si l'on utilise un détecteur UV. Les solvants et autres composants utilisés doivent être de qualité appropriée. L'ajustement du pH, s'il y a lieu, doit être exclusivement effectué sur le composant aqueux de la phase mobile et non sur le mélange. Si des solutions tampons sont utilisées, il convient de rincer soigneusement le système avec un mélange d'eau et du modifiant organique de la phase mobile (5 pour cent *V/V*) une fois la chromatographie terminée, afin d'éviter la cristallisation des sels.

Les phases mobiles peuvent contenir des additifs comme, par exemple, un contre-ion dans le cas d'une chromatographie à appariement d'ions, ou un sélecteur chiral dans le cas d'une chromatographie avec phase stationnaire achirale.

*DÉTECTEURS*

Les détecteurs les plus utilisés sont les spectrophotomètres dans l'ultraviolet/visible (UV/Vis), dont les détecteurs à barrette de diodes. La détection peut également reposer sur la fluorimétrie, la réfractométrie différentielle, des méthodes électrochimiques, la spectrométrie de masse, la dispersion de la lumière, la radioactivité et d'autres méthodes particulières.

MODE OPÉRATOIRE

Equilibrez la colonne avec la phase mobile et le débit indiqués, à température ambiante ou à la température spécifiée dans la monographie, jusqu'à obtention d'une ligne de base stable. Préparez la (les) solution(s) à examiner et la (les) solution(s) témoin(s) prescrites. Les solutions doivent être exemptes de particules solides.

Des critères de conformité du système sont décrits dans le chapitre *Techniques de séparation chromatographique* (*2.2.46*). Les limites dans lesquelles il est possible de faire varier les différents paramètres, pour satisfaire aux critères de conformité du système, sont également indiquées dans ce chapitre.

**01/2008:20230**

## 2.2.30. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

La chromatographie d'exclusion est un procédé de séparation des molécules en solution en fonction de leur taille. Dans le cas de phases mobiles organiques, cette méthode de séparation est appelée *chromatographie de perméation sur gel*, et dans le cas de phases mobiles aqueuses, *chromatographie de filtration sur gel*. L'échantillon à examiner est introduit dans une colonne qui contient un support constitué par un gel ou par des particules d'un solide poreux et est élué par la phase mobile à travers la colonne. La séparation des molécules, en fonction de leur taille, se fait par des échanges répétés des molécules du soluté entre le solvant de la phase mobile et le même solvant immobilisé à l'intérieur du support (phase stationnaire). La porosité moyenne définit l'intervalle de la grandeur moléculaire à l'intérieur duquel une séparation peut avoir lieu.

Les molécules dont la taille est telle qu'elle permet la pénétration à l'intérieur de tous les pores du support sont éluées de la colonne au *volume de perméation total* ($V_t$). D'autre part, les molécules, dont la taille est apparemment supérieure à la taille maximale des pores du support, migrent le long de la colonne en passant seulement à travers les espaces interparticulaires du support sans être retenues et sont éluées de la colonne au *volume d'exclusion* ($V_0$ volume interstitiel). La séparation selon la taille moléculaire se fait entre le volume d'exclusion et le volume de perméation total ; en fait, elle s'effectue généralement dans les deux premiers tiers de cet intervalle.

*Appareillage.* Il est constitué essentiellement par une colonne chromatographique, thermostatée si nécessaire, de longueur et de diamètre intérieur (Ø) variables, remplie par un support apte à séparer les substances dans un intervalle approprié de grandeurs moléculaires. L'éluant passe à travers la colonne à débit constant. L'entrée de la colonne est généralement reliée à un dispositif approprié permettant l'introduction des échantillons, tel qu'un régulateur de débit, une seringue à travers un septum ou une valve à injection. Elle peut être également reliée à un système de pompage adéquat qui contrôle le débit de l'éluant. Par ailleurs, l'échantillon peut être directement introduit sur la surface du support drainé ou, lorsque sa densité est supérieure à celle de l'éluant, il peut être réparti sur l'interface du support et de l'éluant. La sortie de la colonne est généralement reliée à un détecteur approprié, couplé à un enregistreur automatique permettant la mesure des concentrations relatives des composés séparés. Les détecteurs sont basés le plus souvent sur la photométrie, la réfractométrie ou la luminescence. Un collecteur de fractions automatique peut, si nécessaire, être relié au système.

Le support peut être un support mou tel qu'un gel imprégné ou un support rigide constitué par un matériau tel que du verre, de la silice ou un polymère organique réticulé compatible avec des solvants. Les supports rigides requièrent généralement des systèmes pressurisés permettant des séparations plus rapides. Le choix de la phase mobile dépend de la nature de l'échantillon, du support de séparation et de la méthode de détection. Avant d'effectuer la séparation, le support doit être traité et la colonne remplie selon les indications de la monographie ou les instructions du fabricant.

Des critères de conformité du système sont décrits dans le chapitre *Techniques de séparation chromatographique* (*2.2.46*). Les limites dans lesquelles il est possible de faire varier les différents paramètres, pour satisfaire aux critères de conformité du système, sont également indiquées dans ce chapitre.

*DÉTERMINATION DES TENEURS RELATIVES DES COMPOSÉS DANS LES MÉLANGES*

Procédez à la séparation d'après les indications de la monographie. Si possible, suivez l'élution des composés par enregistrement et mesurez la surface des pics correspondants. Si l'échantillon est décelé à l'aide d'une propriété physicochimique donnant des réponses équivalentes pour tous les composants (par exemple, la même absorbance spécifique), calculez la quantité relative de chaque composant en divisant la surface du pic correspondant par la somme des surfaces des pics de tous les composants à examiner. Si la réponse des détecteurs n'est pas équivalente pour tous les composants à examiner, calculez leur concentration à l'aide de courbes d'étalonnage en utilisant les étalons de calibrage prescrits dans la monographie.

*DÉTERMINATION DES MASSES MOLÉCULAIRES*

La chromatographie d'exclusion peut être utilisée pour la détermination des masses moléculaires par comparaison avec des étalons de calibrage appropriés prescrits dans la monographie. Les volumes de rétention des étalons de calibrage peuvent être représentés en fonction du logarithme des masses moléculaires. La représentation graphique tend vers une droite à l'intérieur des limites d'exclusion et de perméation totale pour le système utilisé. Les masses moléculaires peuvent être déterminées à partir de cette courbe de calibrage. Le calibrage de la masse moléculaire n'est valable que pour un système donné, soluté macromoléculaire/système de solvant, dans les conditions expérimentales prescrites.

*DÉTERMINATION DE LA DISTRIBUTION DES TAILLES MOLÉCULAIRES DE POLYMÈRES*

La chromatographie d'exclusion peut être appliquée à la détermination de la distribution de la taille moléculaire de polymères. Cependant, une comparaison entre échantillons peut n'être valable que pour des résultats obtenus dans les mêmes conditions expérimentales. Les substances de référence utilisées pour le calibrage et les techniques de détermination de la distribution des tailles moléculaires de polymères sont indiquées dans la monographie.

**01/2010:20231**

## 2.2.31. ÉLECTROPHORÈSE[(2)]

♦PRINCIPES GÉNÉRAUX

Sous l'action d'un champ électrique, les particules chargées dissoutes ou dispersées dans une solution électrolytique migrent vers l'électrode de polarité opposée. En électrophorèse sur gel, le déplacement des particules est retardé par les interactions avec la matrice gel qui constitue le milieu de migration et se comporte comme un tamis moléculaire. Le champ électrique et le tamis moléculaire agissent en sens contraire, ce qui produit un effet de vitesse de migration différentielle selon la taille, la forme et la charge des particules. En raison de leurs propriétés physicochimiques différentes, les diverses macromolécules contenues dans un mélange migreront à des vitesses différentes au cours de l'électrophorèse, et se trouveront ainsi séparées en fractions discrètes. Les séparations électrophorétiques peuvent être conduites soit dans des systèmes sans phase support (exemple : électrophorèse capillaire libre en solution) soit dans des milieux stabilisants tels que des plaques à couche mince, des films ou des gels.

ÉLECTROPHORÈSE LIBRE OU DE FRONTIÈRE

Cette méthode est principalement utilisée pour la détermination des mobilités, les caractéristiques expérimentales étant directement mesurables et reproductibles. Elle s'applique surtout aux substances de masse moléculaire relative élevée, peu diffusibles. A l'origine, les frontières sont repérées par un procédé physique tel que la réfractométrie ou la conductimétrie. Après application d'un champ électrique défini pendant un temps exactement mesuré, les nouvelles frontières obtenues et leurs positions respectives sont déterminées. Les conditions opératoires doivent permettre la détermination d'autant de frontières que de constituants.

ÉLECTROPHORÈSE DE ZONE UTILISANT UN SUPPORT

L'électrophorèse sur support ne nécessite que des prises d'essai réduites.

La nature du support tel que papier, gélose, acétate de cellulose, amidon, agarose, méthacrylamide, gel mixte, fait intervenir des facteurs supplémentaires modifiant la mobilité :

a) par suite de la sinuosité des canalicules du support, la distance apparemment parcourue est plus petite que la distance réelle,

b) certains supports ne sont pas électriquement neutres ; comme le milieu constitue une phase stationnaire, il peut provoquer un courant d'électro-endosmose important,

c) le chauffage, par effet joule, peut produire une certaine évaporation du liquide du support, qui entraîne, par capillarité, un déplacement de la solution des extrémités vers le centre. La force ionique tend donc à s'accroître progressivement.

La vitesse de migration dépend alors de 4 facteurs principaux : mobilité de la particule chargée, courant d'électro-endosmose, courant d'évaporation et intensité du champ. Il est donc nécessaire d'opérer dans des conditions expérimentales bien déterminées et d'utiliser si possible des substances témoins.

Un *appareil* à électrophorèse comprend :

– un *générateur de courant continu* à tension contrôlable et de préférence stabilisée,

– une *cuve à électrophorèse*, généralement de forme rectangulaire, de verre ou de matière plastique rigide, comportant 2 compartiments séparés, anodique et cathodique, contenant la solution d'électrolyte ; dans chaque compartiment est immergée une électrode de platine ou de graphite par exemple, respectivement anode et cathode, reliée par un circuit convenablement isolé à la borne correspondante du générateur. Le niveau du liquide est maintenu égal dans les 2 compartiments pour éviter tout effet de siphonage.

  La cuve à électrophorèse est munie d'un couvercle qui assure l'étanchéité et permet ainsi de maintenir une atmosphère saturée d'humidité et d'atténuer l'évaporation de la solution pendant la migration. Un dispositif de sécurité peut être utilisé pour assurer la coupure du courant lorsque le couvercle est enlevé. Pour des puissances supérieures à 10 W, il est préférable de refroidir le support de l'électrophorèse.

– un *dispositif porte-support* :

  *Electrophorèse sur bande*. La bande de support préalablement imprégnée de la même solution conductrice et trempant à chaque extrémité dans un compartiment à électrode, est convenablement tendue et fixée sur un porte-support approprié permettant d'éviter la diffusion de la solution conductrice, tel qu'un cadre horizontal, un chevalet en V renversé ou une surface uniforme, avec des points de contact convenablement espacés.

  *Electrophorèse sur gel*. Le dispositif comprend une plaque de verre, par exemple une lame classique de microscope, sur laquelle est déposée une couche de gel adhérente et d'épaisseur constante sur toute la surface de la lame. La

(2) Ce chapitre a fait l'objet du processus d'harmonisation des pharmacopées. Voir chapitre *5.8. Harmonisation des pharmacopées.*

connexion entre le gel et la solution conductrice est assurée selon des modalités différentes en fonction du type d'appareil utilisé. Il convient d'éviter toute condensation de l'humidité ou le séchage de la couche solide.

– un *dispositif de repérage ou de révélation*.

*Mode opératoire.* Dans les compartiments à électrodes, introduisez la solution d'électrolyte. Disposez le support convenablement imbibé de la solution d'électrolyte dans la cuve selon les conditions spécifiées pour le type d'appareil utilisé. Repérez la ligne de départ et déposez la prise d'essai. Faites passer le courant électrique pendant le temps prescrit. Après coupure du courant, retirez le support de la cuve, séchez et révélez.

## ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE CYLINDRIQUE

Dans l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide cylindrique, la phase stationnaire est constituée par un gel préparé à partir d'acrylamide et de *N,N'*-méthylène bisacrylamide ; les gels sont préparés dans des tubes, le plus souvent de 7,5 cm de longueur et de 0,5 cm de diamètre intérieur ; un seul échantillon est déposé dans chaque tube.

*Appareillage.* L'appareillage est constitué par deux réservoirs destinés à recevoir les solutions tampons et construits en un matériau approprié tel que le poly(méthacrylate de méthyle). Ils sont disposés verticalement l'un au-dessus de l'autre et sont munis chacun d'une électrode de platine. Ces deux électrodes sont reliées à une source de courant permettant d'opérer à intensité constante ou à tension constante. Pour les gels cylindriques, le réservoir supérieur est muni à sa base de joints en élastomère situés à égale distance de l'électrode.

*Mode opératoire.* D'une manière générale, il est recommandé de dégazer les solutions avant polymérisation et d'utiliser le gel immédiatement après sa préparation. Préparez le gel selon les indications de la monographie. Versez le mélange dans des tubes de verre appropriés, fermés à l'extrémité inférieure par un bouchon, jusqu'à une hauteur égale, distante de 1 cm environ du bord supérieur du tube. Veillez à éviter l'introduction de bulles d'air dans les tubes. Recouvrez le mélange d'une couche d'*eau R* afin d'empêcher le contact de l'air et laissez reposer. La formation du gel demande le plus souvent 30 min environ ; elle est complète lorsqu'une délimitation nette apparaît entre le gel et la couche d'eau. Eliminez la couche aqueuse. Remplissez le réservoir inférieur avec la solution tampon prescrite et enlevez les bouchons des tubes. Placez les tubes sur les joints du réservoir supérieur de manière que leur partie inférieure plonge dans la solution tampon du réservoir inférieur. Préparez les solutions à examiner et les solutions témoins contenant le marqueur coloré prescrit. Remplissez soigneusement les tubes avec la solution tampon prescrite. Déposez les solutions, dont la densité a été augmentée, par exemple par addition de *saccharose R*, à la surface du gel en utilisant un tube différent pour chaque solution. Ajoutez la même solution tampon dans le réservoir supérieur. Reliez les électrodes à la source de courant et procédez à l'électrophorèse, en utilisant le courant d'intensité ou de tension constante et la température prescrits dans la monographie. Coupez le courant lorsque le marqueur coloré a atteint le réservoir inférieur. Retirez immédiatement les tubes de l'appareil et extrudez le gel. Repérez la position des bandes dans les électrophorégrammes selon le procédé prescrit.♦

## ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRÉSENCE DE DODÉCYLSULFATE DE SODIUM (SDS-PAGE)

**Champ d'application**. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est utilisée pour la caractérisation qualitative des protéines contenues dans des préparations biologiques, ainsi que pour les contrôles de pureté et les déterminations quantitatives.

**Objet**. L'analyse par électrophorèse sur gel est un outil adapté à l'identification et au contrôle d'homogénéité des protéines contenues dans les préparations pharmaceutiques. Elle est utilisée en routine pour estimer la masse moléculaire des sous-unités protéiques et déterminer les sous-unités composant les protéines purifiées.

Il existe sur le marché un grand choix de gels et de réactifs prêts à l'emploi, qui peuvent être utilisés à la place de ceux décrits plus loin à condition de donner des résultats équivalents et de satisfaire aux conditions de validité décrites sous Validation de l'essai.

### *CARACTÉRISTIQUES DES GELS DE POLYACRYLAMIDE*

Les propriétés de tamis des gels de polyacrylamide sont liées à leur structure particulière, qui est celle d'un réseau tridimensionnel de fibres et de pores résultant du greffage d'unités bisacrylamide bifonctionnelles sur des chaînes polyacrylamide adjacentes. La polymérisation est catalysée par un générateur de radicaux libres composé de persulfate d'ammonium et de tétraméthyléthylènediamine.

La taille effective des pores d'un gel est d'autant plus petite que sa concentration en acrylamide est élevée. La porosité effective d'un gel est définie de façon opérationnelle par ses propriétés de tamis moléculaire, c'est-à-dire la résistance qu'il oppose à la migration des macromolécules. Il existe des limites aux concentrations d'acrylamide pouvant être utilisées. A concentration trop élevée, les gels se brisent plus facilement et deviennent difficiles à manipuler. Lorsque la taille des pores d'un gel diminue, la vitesse de migration d'une protéine dans ce gel diminue aussi. En ajustant la porosité d'un gel par le biais de sa concentration en acrylamide, il est possible d'optimiser la résolution de la méthode pour un produit protéique donné. Les caractéristiques physiques d'un gel donné dépendent donc de sa teneur en acrylamide et en bisacrylamide.

Outre la composition du gel, l'état de la protéine constitue un autre facteur important de sa mobilité électrophorétique. Dans le cas des protéines, la mobilité électrophorétique dépend du pK des groupements chargés et de la taille de la molécule. Elle est également affectée par la nature, la concentration et le pH du tampon, la température, l'intensité du champ, ainsi que la nature du support.

### *ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE AVEC DÉNATURATION*

La méthode décrite ici à titre d'exemple est applicable à l'analyse des polypeptides monomères de masse moléculaire comprise entre 14 000 et 100 000 daltons. Il est possible d'étendre cet intervalle par différentes techniques (par exemple : emploi de gels à gradient ou de systèmes-tampons particuliers), mais ces techniques ne sont pas traitées ici.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec dénaturation par le dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) est la technique d'électrophorèse la plus utilisée pour évaluer la qualité pharmaceutique des produits protéiques, et c'est sur elle que porte principalement le présent texte. De façon générale, l'électrophorèse analytique des protéines est réalisée sur gel de polyacrylamide dans des conditions qui entraînent la dissociation des protéines en leurs sous-unités polypeptidiques et limitent le phénomène d'agrégation. On utilise très fréquemment à cet effet, pour dissocier les protéines avant leur dépôt sur le gel, le dodécylsulfate de sodium (SDS), un détergent fortement anionique, en combinaison avec la chaleur. Les polypeptides dénaturés se lient au SDS, deviennent porteurs de charges négatives, et se caractérisent par un rapport charge/masse constant quel que soit le type de protéine considéré. La quantité de SDS lié étant presque toujours proportionnelle à la masse moléculaire du polypeptide, et indépendante de sa séquence, les complexes SDS-polypeptide migrent dans les gels de polyacrylamide avec des mobilités qui sont fonction de la taille du polypeptide.

La mobilité électrophorétique des complexes détergent-polypeptide résultants présente toujours la même relation fonctionnelle avec la masse moléculaire. La migration des complexes SDS s'effectue de manière prévisible vers l'anode, à vitesse plus élevée pour les complexes de faible masse moléculaire que pour ceux de haute masse moléculaire. Il est ainsi possible d'estimer la masse moléculaire d'une protéine à partir de sa mobilité relative, après étalonnage de la méthode SDS-PAGE, et l'observation d'une bande unique constitue un critère de pureté.

Toutefois, les éventuelles modifications du squelette polypeptidique, par exemple une *N*- ou une *O*-glycosylation, ont un impact non négligeable sur la masse moléculaire apparente d'une protéine. En effet, le SDS ne se lie pas de la même manière aux groupements glucidiques et aux peptides, de sorte que la constance du rapport charge/masse ne se vérifie plus. La masse moléculaire apparente des protéines ayant subi des modifications post-traductionnelles ne reflète pas réellement la masse de la chaîne polypeptidique.

**Conditions réductrices**. L'association des sous-unités polypeptidiques et la structure tridimensionnelle des protéines reposent souvent sur l'existence de ponts disulfure. L'un des objectifs à atteindre en analyse SDS-PAGE sous conditions réductrices est la rupture de cette structure par réduction des ponts disulfure. La dénaturation et la dissociation complètes des protéines par traitement par le 2-mercaptoéthanol ou le dithiothréitol (DTT) entraînent un déploiement de la structure polypeptidique, suivi d'une complexation avec le SDS. Dans ces conditions, la masse moléculaire des sous-unités polypeptidiques peut être calculée par régression linéaire à l'aide d'étalons de masse moléculaire appropriée.

**Conditions non réductrices**. Pour certaines analyses, la dissociation complète de la protéine en sous-unités peptidiques n'est pas souhaitable. En l'absence de traitement par des agents réducteurs tels que le 2-mercaptoéthanol ou le DTT, les ponts disulfure covalents restent intacts, et la conformation oligomérique de la protéine est préservée. Les complexes SDS-oligomère migrent plus lentement que les sous-unités SDS-peptide. Par ailleurs, les protéines non réduites peuvent ne pas être totalement saturées en SDS, et par conséquent ne pas se lier au détergent dans un rapport de masse constant. Ceci rend la détermination de la masse moléculaire de ces molécules par SDS-PAGE plus difficile que l'analyse de polypeptides totalement dénaturés car, pour que leur comparaison soit valable, il est nécessaire que les étalons et les protéines inconnues aient des configurations semblables. Toutefois, l'obtention dans le gel d'une bande colorée unique reste un critère de pureté.

*CARACTÉRISTIQUES DE L'ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL EN SYSTÈME-TAMPON DISCONTINU*

La méthode électrophorétique la plus répandue pour la caractérisation des mélanges complexes de protéines repose sur l'emploi d'un système-tampon discontinu comportant deux gels contigus, mais distincts : un gel (inférieur) dit de séparation, ou de résolution, et un gel (supérieur) dit de tassement. Ces deux gels sont de porosité, pH et force ionique différents. Par ailleurs, les ions mobiles utilisés dans les gels et dans les tampons d'électrode sont eux aussi différents. La discontinuité du système-tampon entraîne une concentration des échantillons de grand volume dans le gel de tassement, et donc une amélioration de la résolution. Lorsque le champ électrique est appliqué, un gradient de tension négatif s'instaure à travers la solution échantillon et entraîne les protéines dans le gel de tassement. Les ions glycinate contenus dans le tampon d'électrode suivent les protéines dans le gel de tassement. Il se forme rapidement une zone frontière mobile dont le front est constitué par les ions chlorures à haute mobilité, et l'arrière par les ions glycinate plus lents. Un gradient de haute tension localisé s'instaure entre les fronts ioniques de tête et de queue, et conduit les complexes SDS-protéine à se concentrer en une bande très mince qui migre entre les fractions chlorure et glycinate. Dans une large mesure, indépendamment de l'épaisseur d'échantillon déposé, l'ensemble des complexes SDS-protéine subissent un effet de condensation et pénètrent dans le gel de séparation sous la forme d'une bande étroite, bien définie, à haute densité protéique. Le gel de tassement, à larges pores, ne retarde pas de façon générale la migration des protéines mais joue principalement le rôle de milieu anticonvectif. A l'interface des gels de tassement et de séparation, les protéines se trouvent confrontées à une brusque augmentation de l'effet de retardement, due au faible diamètre des pores du gel de séparation. Lorsqu'elles ont pénétré dans le gel de séparation, ce ralentissement se poursuit à cause de l'effet de tamis moléculaire exercé par la matrice. Les ions glycinate dépassent les protéines, dont la migration se poursuit alors dans un milieu à pH uniforme constitué par le tris(hydroxyméthyl)aminométhane et la glycine. L'effet de tamis moléculaire entraîne une séparation des complexes SDS-polypeptide sur la base de leur masse moléculaire respective.

*PRÉPARATION DES GELS DE POLYACRYLAMIDE SDS VERTICAUX À TAMPON DISCONTINU*

**Assemblage du moule**. Avec un détergent doux, nettoyez les deux plaques de verre (dimensions 10 cm × 8 cm par exemple), le peigne de polytétrafluoroéthylène, les deux espaceurs et le tube de caoutchouc silicone (0,6 mm de diamètre × 35 cm, par exemple), puis rincez abondamment à l'eau. Séchez tous les éléments avec du papier absorbant ou du tissu. Lubrifiez les espaceurs et le tube avec de la graisse non siliconée. Placez les espaceurs à 2 mm du bord le long des deux côtés courts et d'un des côtés longs de la plaque de verre. Ce dernier correspondra au fond du gel. Commencez à installer le tube sur la plaque de verre en utilisant l'un des espaceurs comme guide. Arrivé au bout de l'espaceur, pliez le tube avec précaution pour lui faire suivre le côté long de la plaque de verre. Tout en maintenant le tube en place avec un doigt, pliez-le à nouveau pour lui faire suivre le second côté court de la plaque, en utilisant l'espaceur comme guide. Mettez la seconde plaque en place, en l'alignant parfaitement sur la première, et maintenez l'ensemble par pression manuelle. Placez deux pinces sur chacun des côtés courts du moule puis, avec précaution, quatre autres pinces sur le côté long qui constituera la base du moule. Vérifiez que le tube suit toujours le bord des plaques et n'a pas été déplacé lors de la mise en place des pinces. Le moule est prêt et le gel peut y être coulé.

**Préparation des gels**. Pour les gels à système-tampon discontinu, il est recommandé de verser d'abord le gel de séparation et de le laisser polymériser avant de verser le gel de tassement, car la teneur en acrylamide-bisacrylamide des deux gels, leur tampon et leur pH sont différents.

*Préparation du gel de séparation*. Dans une fiole conique, préparez le volume approprié d'une solution d'acrylamide à la concentration souhaitée, à l'aide des valeurs indiquées dans le tableau 2.2.31.-1. Mélangez les composants dans l'ordre indiqué. Avant d'ajouter la solution de persulfate d'ammonium et la tétraméthyléthylènediamine (TEMED), filtrez si nécessaire la solution sous vide sur une membrane d'acétate de cellulose (diamètre des pores : 0,45 µm) ; maintenez la solution sous vide en agitant l'unité de filtration jusqu'à ce qu'il ne se forme plus de bulles dans la solution. Ajoutez les quantités appropriées de solution de persulfate d'ammonium et de TEMED (voir tableau 2.2.31.-1), agitez et versez immédiatement dans l'espace séparant les deux plaques de verre du moule. Laissez une hauteur libre suffisante pour le gel de tassement (hauteur d'une dent du peigne plus 1 cm). A l'aide d'une pipette de verre effilée, recouvrez avec précaution la solution avec de l'isobutanol saturé en eau. Laissez polymériser le gel en position verticale, à température ambiante.

Tableau 2.2.31.-1. – *Préparation du gel de séparation*

| **Constituants de la solution** | **Volume (mL) de chaque constituant pour un volume de gel moulé de** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **5 mL** | **10 mL** | **15 mL** | **20 mL** | **25 mL** | **30 mL** | **40 mL** | **50 mL** |
| **6 pour cent d'acrylamide** | | | | | | | | |
| *Eau R* | 2,6 | 5,3 | 7,9 | 10,6 | 13,2 | 15,9 | 21,2 | 26,5 |
| Solution d'acrylamide(1) | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 5,0 | 6,0 | 8,0 | 10,0 |
| Tris pH 8,8 (1,5 M)(2) | 1,3 | 2,5 | 3,8 | 5,0 | 6,3 | 7,5 | 10,0 | 12,5 |
| SDS 100 g/L(3) | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,4 | 0,5 |
| PSA 100 g/L(4) | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,4 | 0,5 |
| TEMED(5) | 0,004 | 0,008 | 0,012 | 0,016 | 0,02 | 0,024 | 0,032 | 0,04 |
| **8 pour cent d'acrylamide** | | | | | | | | |
| *Eau R* | 2,3 | 4,6 | 6,9 | 9,3 | 11,5 | 13,9 | 18,5 | 23,2 |
| Solution d'acrylamide(1) | 1,3 | 2,7 | 4,0 | 5,3 | 6,7 | 8,0 | 10,7 | 13,3 |
| Tris pH 8,8 (1,5 M)(2) | 1,3 | 2,5 | 3,8 | 5,0 | 6,3 | 7,5 | 10,0 | 12,5 |
| SDS 100 g/L(3) | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,4 | 0,5 |
| PSA 100 g/L(4) | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,4 | 0,5 |
| TEMED(5) | 0,003 | 0,006 | 0,009 | 0,012 | 0,015 | 0,018 | 0,024 | 0,03 |
| **10 pour cent d'acrylamide** | | | | | | | | |
| *Eau R* | 1,9 | 4,0 | 5,9 | 7,9 | 9,9 | 11,9 | 15,9 | 19,8 |
| Solution d'acrylamide(1) | 1,7 | 3,3 | 5,0 | 6,7 | 8,3 | 10,0 | 13,3 | 16,7 |
| Tris pH 8,8 (1,5 M)(2) | 1,3 | 2,5 | 3,8 | 5,0 | 6,3 | 7,5 | 10,0 | 12,5 |
| SDS 100 g/L(3) | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,4 | 0,5 |
| PSA 100 g/L(4) | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,4 | 0,5 |
| TEMED(5) | 0,002 | 0,004 | 0,006 | 0,008 | 0,01 | 0,012 | 0,016 | 0,02 |
| **12 pour cent d'acrylamide** | | | | | | | | |
| *Eau R* | 1,6 | 3,3 | 4,9 | 6,6 | 8,2 | 9,9 | 13,2 | 16,5 |
| Solution d'acrylamide(1) | 2,0 | 4,0 | 6,0 | 8,0 | 10,0 | 12,0 | 16,0 | 20,0 |
| Tris pH 8,8 (1,5 M)(2) | 1,3 | 2,5 | 3,8 | 5,0 | 6,3 | 7,5 | 10,0 | 12,5 |
| SDS 100 g/L(3) | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,4 | 0,5 |
| PSA 100 g/L(4) | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,4 | 0,5 |
| TEMED(5) | 0,002 | 0,004 | 0,006 | 0,008 | 0,01 | 0,012 | 0,016 | 0,02 |
| **14 pour cent d'acrylamide** | | | | | | | | |
| *Eau R* | 1,4 | 2,7 | 3,9 | 5,3 | 6,6 | 8,0 | 10,6 | 13,8 |
| Solution d'acrylamide(1) | 2,3 | 4,6 | 7,0 | 9,3 | 11,6 | 13,9 | 18,6 | 23,2 |
| Tris pH 8,8 (1,5 M)(2) | 1,2 | 2,5 | 3,6 | 5,0 | 6,3 | 7,5 | 10,0 | 12,5 |
| SDS 100 g/L(3) | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,4 | 0,5 |
| PSA 100 g/L(4) | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,4 | 0,5 |
| TEMED(5) | 0,002 | 0,004 | 0,006 | 0,008 | 0,01 | 0,012 | 0,016 | 0,02 |
| **15 pour cent d'acrylamide** | | | | | | | | |
| *Eau R* | 1,1 | 2,3 | 3,4 | 4,6 | 5,7 | 6,9 | 9,2 | 11,5 |
| Solution d'acrylamide(1) | 2,5 | 5,0 | 7,5 | 10,0 | 12,5 | 15,0 | 20,0 | 25,0 |
| Tris pH 8,8 (1,5 M)(2) | 1,3 | 2,5 | 3,8 | 5,0 | 6,3 | 7,5 | 10,0 | 12,5 |
| SDS 100 g/L(3) | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,4 | 0,5 |
| PSA 100 g/L(4) | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,4 | 0,5 |
| TEMED(5) | 0,002 | 0,004 | 0,006 | 0,008 | 0,01 | 0,012 | 0,016 | 0,02 |

(1) Solution d'acrylamide : *solution d'acrylamide/bisacrylamide (29:1) à 30 pour cent R.*

(2) Tris pH 8,8 (1,5 M) : *solution tampon tris-chlorhydrate pH 8,8 (1,5 M) R.*

(3) SDS 100 g/L : solution de *dodécylsulfate de sodium R* à 100 g/L.

(4) PSA 100 g/L : solution de *persulfate d'ammonium R* à 100 g/L. Le persulfate d'ammonium fournit les radicaux libres qui induisent la polymérisation de l'acrylamide et du bisacrylamide. La solution de persulfate d'ammonium se décompose lentement et doit être renouvelée chaque semaine.

(5) TEMED : *tétraméthyléthylènediamine R.*

*Préparation du gel de tassement.* Lorsque la polymérisation est terminée (30 min environ), videz l'isobutanol et lavez plusieurs fois la surface supérieure du gel avec de l'eau pour éliminer complètement l'isobutanol et le cas échéant l'acrylamide non polymérisé. Laissez le minimum de liquide à la surface du gel et épongez éventuellement l'eau résiduelle avec le bord d'une serviette de papier.

Dans une fiole conique, préparez le volume approprié d'une solution d'acrylamide à la concentration voulue, à l'aide des valeurs données dans le tableau 2.2.31.-2. Mélangez les composants dans l'ordre indiqué. Avant d'ajouter la solution de persulfate d'ammonium et la TEMED, filtrez si nécessaire la solution sous vide sur une membrane d'acétate de cellulose (diamètre des pores : 0,45 µm) ; maintenez la solution sous vide en agitant l'unité de filtration jusqu'à ce qu'il ne se forme plus de bulles dans la solution. Ajoutez les quantités appropriées de solution de persulfate d'ammonium et de TEMED (voir tableau 2.2.31.-2), agitez et versez immédiatement sur le gel de séparation polymérisé. Mettez immédiatement en place un peigne de polytétrafluoroéthylène propre dans la solution pour gel de tassement, en veillant à éviter la formation de bulles d'air. Ajoutez de la solution pour gel de tassement de façon à remplir totalement les interstices du peigne. Laissez polymériser le gel en position verticale, à température ambiante.

**Mise en place du gel dans l'appareil à électrophorèse et séparation électrophorétique**. Lorsque la polymérisation est terminée (30 min environ), retirez le peigne de polytétrafluoroéthylène avec précaution. Rincez immédiatement les puits avec de l'eau ou du *tampon d'électrophorèse SDS-PAGE R* pour éliminer l'acrylamide éventuellement non polymérisé. Si nécessaire, redressez les dents du gel de tassement avec une aiguille hypodermique épointée fixée à une seringue. Enlevez les pinces sur l'un des côtés courts de la plaque, retirez le tube avec précaution et replacez les pinces. Procédez de même pour l'autre côté court, puis pour la base du moule. Placez le gel dans l'appareil à électrophorèse. Introduisez les tampons d'électrophorèse dans les réservoirs supérieur et inférieur. Eliminez les bulles éventuellement emprisonnées à la base du gel entre les plaques de verre. Il est recommandé d'employer à cet effet une aiguille hypodermique coudée fixée à une seringue. Ne mettez jamais le gel sous tension sans les échantillons, sous peine de détruire la discontinuité du système-tampon. Avant de déposer l'échantillon, rincez le puits avec précaution au moyen de *tampon d'électrophorèse SDS-PAGE R*. Préparez les solutions à examiner et les solutions témoins en utilisant le tampon pour échantillons recommandé et traitez-les comme spécifié dans la monographie de la substance à examiner. Déposez dans les puits du gel de tassement le volume approprié des différentes solutions. Procédez à l'électrophorèse dans les conditions recommandées par le fabricant de l'appareil. Certains fabricants d'appareils pour SDS-PAGE fournissent des gels de diverses surfaces et épaisseurs. Pour obtenir une séparation optimale, il peut être nécessaire de faire varier la durée d'électrophorèse et les paramètres électriques comme indiqué par le fabricant. Vérifiez que le front de coloration se déplace dans le gel de séparation. Lorsqu'il atteint la base du gel, arrêtez l'électrophorèse. Sortez le moule de l'appareil et séparez les deux plaques de verre. Enlevez les espaceurs, séparez et jetez le gel de tassement, puis procédez immédiatement à la coloration.

*DÉTECTION DES PROTÉINES DANS LES GELS*

La coloration au Coomassie est la méthode la plus couramment employée pour les protéines, avec un niveau de détection de l'ordre de 1 µg à 10 µg de protéine par bande. La coloration à l'argent est la méthode la plus sensible pour la coloration des protéines en gels ; elle permet la détection de bandes contenant 10 ng à 100 ng de protéine.

Toutes les étapes de la coloration des gels sont conduites à température ambiante sous agitation modérée (par exemple sur plateau à mouvement orbital) dans un récipient approprié. Le port de gants est nécessaire pour éviter d'apposer sur le gel des empreintes digitales qui se coloreront ensuite.

**Coloration au Coomassie**. Immergez le gel pendant 1 h au moins dans de la *solution de coloration au Coomassie R* en large excès. Eliminez la solution de coloration.

Immergez le gel dans de la *solution de décoloration R* en large excès. Renouvelez à plusieurs reprises la solution de décoloration, jusqu'à ce que les bandes protéiques colorées apparaissent nettement sur fond clair. Plus la décoloration du gel est poussée, plus la quantité de protéine détectable par cette méthode est faible. Il est possible d'accélérer la décoloration en incorporant à la *solution de décoloration R* quelques grammes de résine échangeuse d'anions ou une petite éponge.

*NOTE : les solutions acido-alcooliques utilisées dans cette méthode ne fixent pas totalement les protéines dans le gel. Il peut donc y avoir perte de certaines protéines de basse masse moléculaire au cours des opérations de coloration-décoloration des gels minces. On peut obtenir une fixation permanente en plaçant le gel pendant 1 h dans un mélange de 1 volume d'acide trichloracétique R, de 4 volumes de méthanol R et de 5 volumes d'eau R avant de l'immerger dans la solution de coloration au Coomassie R.*

**Coloration à l'argent**. Immergez le gel pendant 1 h dans de la *solution de fixation R* en large excès. Eliminez et renouvelez la solution de fixation, puis laissez incuber pendant 1 h au moins, ou pendant toute une nuit si cela est plus pratique. Jetez la solution de fixation et lavez le gel en le plaçant dans un large excès d'*eau R* pendant 1 h, puis immergez-le pendant 15 min dans une solution de *glutaraldéhyde R* à 1 pour cent *V/V*. Lavez le gel en le plaçant à deux reprises dans un large excès d'*eau R* pendant 15 min, puis immergez-le pendant 15 min, à l'obscurité, dans du *réactif au nitrate d'argent R* récemment préparé. Lavez le gel en le plaçant à trois reprises dans un large excès

Tableau 2.2.31.-2. – *Préparation du gel de tassement*

| **Constituants de la solution** | **Volume (mL) de chaque constituant pour un volume de gel moulé de** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **1 mL** | **2 mL** | **3 mL** | **4 mL** | **5 mL** | **6 mL** | **8 mL** | **10 mL** |
| *Eau R* | 0,68 | 1,4 | 2,1 | 2,7 | 3,4 | 4,1 | 5,5 | 6,8 |
| Solution d'acrylamide(1) | 0,17 | 0,33 | 0,5 | 0,67 | 0,83 | 1,0 | 1,3 | 1,7 |
| Tris pH 6,8 (1,0 M)(2) | 0,13 | 0,25 | 0,38 | 0,5 | 0,63 | 0,75 | 1,0 | 1,25 |
| SDS 100 g/L(3) | 0,01 | 0,02 | 0,03 | 0,04 | 0,05 | 0,06 | 0,08 | 0,1 |
| PSA 100 g/L(4) | 0,01 | 0,02 | 0,03 | 0,04 | 0,05 | 0,06 | 0,08 | 0,1 |
| TEMED(5) | 0,001 | 0,002 | 0,003 | 0,004 | 0,005 | 0,006 | 0,008 | 0,01 |

(1) Solution d'acrylamide : *solution d'acrylamide/bisacrylamide (29:1) à 30 pour cent R.*

(2) Tris pH 6,8 (1,0 M) : *solution tampon tris-chlorhydrate pH 6,8 (1 M) R.*

(3) SDS 100 g/L : solution de *dodécylsulfate de sodium R* à 100 g/L.

(4) PSA 100 g/L : solution de *persulfate d'ammonium R* à 100 g/L. Le persulfate d'ammonium fournit les radicaux libres qui induisent la polymérisation de l'acrylamide et du bisacrylamide. La solution de persulfate d'ammonium se décompose lentement et doit être renouvelée chaque semaine.

(5) TEMED : *tétraméthyléthylènediamine R.*

d'*eau R* pendant 5 min, puis immergez-le pendant 1 min environ dans de la *solution de développement R*, jusqu'à obtention d'une coloration satisfaisante. Stoppez le développement par immersion pendant 15 min dans la *solution d'arrêt R*. Rincez avec de l'*eau R*.

*SÉCHAGE DES GELS DE POLYACRYLAMIDE SDS COLORÉS*

Le traitement des gels est légèrement différent selon la méthode de coloration utilisée. Dans le cas de la coloration au Coomassie, l'étape de décoloration est suivie d'une immersion du gel dans une solution de *glycérol R* à 100 g/L pendant 2 h au moins (ou toute une nuit). Dans le cas de la coloration par l'argent, le rinçage final est suivi d'une immersion dans une solution de *glycérol R* à 20 g/L pendant 5 min.

Immergez deux feuilles de cellulose poreuse dans de l'*eau R* pendant 5-10 min. Placez l'une d'elles sur un cadre de séchage. Soulevez délicatement le gel et déposez-le sur la feuille de cellulose. Eliminez éventuellement les bulles d'air emprisonnées et versez quelques millilitres d'*eau R* le long des bords du gel. Recouvrez avec la seconde feuille et éliminez éventuellement les bulles d'air emprisonnées. Terminez l'assemblage du cadre de séchage. Placez à l'étuve ou laissez sécher à température ambiante.

*DÉTERMINATION DE LA MASSE MOLÉCULAIRE*

La masse moléculaire des protéines est déterminée par comparaison de leur mobilité avec celle de plusieurs marqueurs protéiques de masse moléculaire connue. Il existe, pour l'étalonnage des gels, des mélanges de protéines de masse moléculaire précisément connue qui permettent d'obtenir une coloration uniforme. De tels mélanges sont disponibles pour différentes plages de masse moléculaire. Les solutions mères concentrées de protéines de masse moléculaire connue sont diluées dans le tampon pour échantillons approprié et déposées sur le même gel que l'échantillon protéique à examiner.

Immédiatement après l'électrophorèse, repérez la position du colorant de marquage (bleu de bromophénol) pour identifier le front de migration des ions. On peut à cet effet découper une encoche dans le bord du gel, ou enfoncer dans le gel, au niveau du front de migration du colorant, une aiguille trempée dans de l'encre de Chine. Après la coloration du gel, mesurez la distance de migration de chaque bande protéique (marqueurs et bandes inconnues) à partir du bord supérieur du gel de séparation, et divisez chacune de ces distances de migration par la distance parcourue par le colorant de marquage. Les distances de migration ainsi obtenues sont appelées mobilités relatives des protéines (par rapport au front de coloration) et conventionnellement notées $R_F$. Tracez un graphe du logarithme de la masse moléculaire relative $M_r$ des étalons protéiques en fonction des $R_F$ correspondants. Les graphes obtenus sont légèrement sigmoïdes. L'estimation des masses moléculaires inconnues peut être effectuée par régression linéaire ou par interpolation à partir de la courbe de variation de $\log(M_r)$ en fonction de $R_F$ à condition que les valeurs obtenues pour les échantillons inconnus soient situées dans la partie linéaire du graphe.

*VALIDATION DE L'ESSAI*

L'essai n'est valable que si les protéines utilisées comme marqueurs de masse moléculaire sont distribuées sur 80 pour cent de la longueur du gel et si, sur l'intervalle de séparation requis (par exemple l'intervalle couvrant le produit et son dimère, ou le produit et ses impuretés apparentées), il existe pour les bandes protéiques à considérer une relation linéaire entre le logarithme de la masse moléculaire et la valeur de $R_F$. Des exigences de validation supplémentaires concernant la préparation à examiner peuvent être spécifiées dans les monographies particulières.

*QUANTIFICATION DES IMPURETÉS*

Lorsqu'une teneur limite en impureté(s) est spécifiée dans la monographie particulière, il convient de préparer une solution témoin correspondant à cette teneur, en diluant la solution à examiner. Si, par exemple, cette limite est de 5 pour cent, la solution témoin sera une dilution au 1/20 de la solution à examiner. L'électrophorégramme obtenu avec la solution à examiner ne doit présenter aucune bande d'impureté (bande autre que la bande principale) qui soit plus intense que la bande principale de l'électrophorégramme obtenu avec la solution témoin.

Il est possible, sous réserve d'opérer dans des conditions validées, de quantifier les impuretés par normalisation par rapport à la bande principale, en utilisant un densitomètre intégrateur. Dans ce cas, la linéarité des réponses doit être vérifiée.

**01/2008:20232**

## 2.2.32. PERTE À LA DESSICCATION

La perte à la dessiccation est la perte de masse exprimée en pourcentage *m/m*.

*Mode opératoire*. Placez la quantité prescrite de la substance à examiner dans un flacon à tare, desséché lui-même au préalable dans les conditions précisées pour la substance à examiner. La dessiccation de la substance se fait jusqu'à masse constante ou pendant la durée prescrite à l'aide d'un des procédés décrits ci-après. Si la température de dessiccation est indiquée par une seule valeur plutôt qu'un intervalle, la dessiccation est effectuée à la température prescrite ± 2 °C.

a) « dans un dessiccateur » : la dessiccation est effectuée en présence de *pentoxyde de diphosphore R*, à la pression atmosphérique, à température ambiante ;

b) « sous vide » : la dessiccation est effectuée en présence de *pentoxyde de diphosphore R*, sous une pression comprise entre 1,5 kPa et 2,5 kPa, à température ambiante ;

c) « sous vide avec indication d'un intervalle de température » : la dessiccation est effectuée en présence de *pentoxyde de diphosphore R*, sous une pression comprise entre 1,5 kPa et 2,5 kPa et dans l'intervalle de température prescrit dans la monographie ;

d) « à l'étuve avec indication d'un intervalle de température » : la dessiccation est effectuée à l'étuve dans l'intervalle de température prescrit dans la monographie ;

e) « sous vide poussé » : la dessiccation est effectuée en présence de *pentoxyde de diphosphore R* sous une pression inférieure à 0,1 kPa, à la température prescrite dans la monographie.

Si d'autres conditions sont prescrites, le procédé à utiliser est intégralement décrit dans la monographie.

**01/2009:20233**

## 2.2.33. SPECTROMÉTRIE DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE

INTRODUCTION

La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode d'analyse qui permet, en particulier, d'élucider la structure chimique des molécules organiques par interprétation des spectres RMN obtenus, par exemple, pour $^{1}H$ ou les noyaux X de type $^{13}C$, $^{19}F$, $^{15}N$, $^{31}P$. Les spectres peuvent être utilisés à des fins d'analyse qualitative ou quantitative.

Dans des conditions expérimentales appropriées, l'intensité des signaux RMN (obtenue par intégration) est directement proportionnelle au nombre de spins nucléaires que compte le groupe structurel responsable du signal. Ces intégrales peuvent servir à l'analyse quantitative.

## PRINCIPE GÉNÉRAL

Une population de noyaux possédant un moment cinétique et un moment magnétique, placée dans un champ magnétique statique $B_0$, subit un réarrangement en relation avec l'axe du champ magnétique. Les noyaux prennent alors certaines orientations, régies par la mécanique quantique, auxquelles correspondent des énergies différentes. Si l'on applique un champ magnétique oscillant de haute fréquence $B_1$, perpendiculaire à $B_0$, il se produit, entre ces orientations, des transitions qui s'accompagnent d'une absorption nette d'énergie. D'après la condition de résonance $\omega_0 = \gamma B_0$ ($\gamma$ = rapport gyromagnétique, $\omega_0$ = fréquence de Larmor), on peut faire varier le champ magnétique $B_0$ ou la fréquence $\omega_1$ du champ $B_1$ de façon à obtenir un spectre (méthode de l'onde continue). De nos jours, l'irradiation $B_1$ est plutôt exercée au moyen d'une impulsion de radiofréquence (RF), selon la méthode de la transformée de Fourier (FT). Le rayonnement cohérent émis lors du retour à l'état initial est observé sous la forme d'une courbe de relaxation, également appelée signal de précession libre (ou FID, *free induction decay*). L'application de la méthode de la transformée de Fourier fournit ensuite le spectre fréquentiel dont peuvent être extraites des informations sur la structure moléculaire. Des champs de radiofréquence auxiliaires peuvent être appliqués lors de l'acquisition du signal FID, pour supprimer les interactions scalaires entre noyaux (interactions s'exerçant par le biais des liaisons chimiques) ; on parle alors de « découplage ». Les techniques utilisées peuvent être unidimensionnelles ou multidimensionnelles, servir à des fins d'analyse qualitative ou quantitative, et être appliquées à des échantillons à l'état liquide ou solide.

On peut, à partir de divers paramètres spectroscopiques, accéder à d'importantes informations structurelles :

| | |
|---|---|
| fréquence de résonance | espèce nucléaire observée |
| nombre des signaux de résonance (singulets, multiplets) | nombre de groupes de noyaux chimiquement distincts |
| déplacement chimique $\delta$ (ppm) | nature et environnement chimiques du groupe structurel observé |
| intensité des signaux de résonance | nombre relatif de noyaux résonants par groupe chimique distinct |
| multiplicité des modes de couplage | nombre de noyaux en interaction scalaire avec le noyau observé |
| constante de couplage $^nJ$ (Hz) | nombre de liaisons impliquées dans le chemin de couplage, et géométrie de ce dernier |

Les méthodes homonucléaires et hétéronucléaires, bidimensionnelles ou multidimensionnelles, permettent d'établir des corrélations entre paramètres spectraux différents (par exemple, déplacement chimique et constante de couplage, ou déplacements chimiques de différents noyaux dans un même système moléculaire). Des expériences appropriées permettent également d'accéder à des informations sur les temps de relaxation $T_1$ et $T_2$, les effets Overhauser nucléaires (NOE, *nuclear Overhauser effects*) et la cinétique des processus dépendants du temps.

## APPAREILLAGE

Un spectromètre RMN haute résolution comporte au moins les éléments suivants :

- un aimant chargé de générer le champ magnétique constant $B_0$,
- une sonde, contrôlée en température, qui contient l'échantillon, délivre l'impulsion de radiofréquence et détecte le rayonnement émis par l'échantillon,
- une console électronique qui génère les impulsions de radiofréquence haute puissance, collecte et numérise le signal FID ; cette unité assure également la stabilisation de l'électronique instrumentale,
- une unité d'acquisition et de traitement des données (ordinateur).

Il peut également comprendre :

- une cellule en flux continu pour la RMN couplée à la chromatographie liquide ou la RMN par injection en flux continu,
- un système adapté à la RMN à gradient de champ pulsé.

La génération du haut champ magnétique est réalisée par une bobine supraconductrice plongée dans un vase Dewar contenant de l'hélium liquide. L'échantillon est en général introduit dans la sonde, dans un tube à essai d'un diamètre extérieur de 5 mm ou dans une cellule de flux, et la sonde est connectée à l'électronique par des câbles RF assurant le transport de la fréquence de stabilisation (*lock*) et les fréquences des noyaux $^1$H et X. La présence de dispositifs auxiliaires assurant le réglage d'accord et d'adaptation des circuits électroniques est essentielle, et l'emploi de systèmes de contrôle de la température de l'échantillon est fréquent.

Il convient de démontrer le bon fonctionnement du spectromètre RMN. Les tests appropriés à cet effet sont, typiquement, la mesure de la largeur de raie à mi-hauteur pour des pics et dans des conditions d'acquisition définis, le rapport signal/bruit (*S/N*) pour des mélanges de référence, la puissance d'impulsion (mesurée par la largeur de l'impulsion 90°) et la reproductibilité de l'impulsion. Tous les fabricants d'instruments publient des spécifications et des protocoles de mesure de ces paramètres pour des combinaisons instrument/sonde spécifiques, et la conformité de l'appareillage à ces spécifications doit être démontrée.

## RMN À TRANSFORMÉE DE FOURIER (RMN-FT)

Les spectromètres contemporains opèrent généralement selon le principe de la transformée de Fourier : après excitation de l'échantillon par une impulsion de radiofréquence $\nu$, d'amplitude $B_1$ et de durée $\tau_p$ appropriées, puis un temps mort $t_d$ de courte durée (pour permettre la restauration de l'électronique), le signal FID analogique amplifié est échantillonné au cours du temps d'acquisition $t_{ac}$, puis numérisé par un convertisseur analogique-numérique, et les résultats sont stockés dans la mémoire du spectromètre. L'amplification du signal délivré par le récepteur intervient avant la numérisation, afin d'optimiser la sensibilité sans saturer le convertisseur. Dans le cas de l'observation de noyaux X, l'équipement standard comporte si nécessaire un découplage $^1$H large bande opéré via l'irradiation de tous les protons lors de l'expérience. Pour accroître le rapport *S/N*, plusieurs signaux FID peuvent être accumulés de façon cohérente, puis sommés. La transformée de Fourier de ces données temporelles donne le spectre fréquentiel.

### *PARAMÈTRES*

En RMN à transformée de Fourier, différents paramètres d'acquisition influencent les résultats et doivent être ajustés et contrôlés.

**Largeur d'impulsion $\tau_p$.** L'impulsion d'excitation est orientée selon l'axe des x du repère tournant, sa durée (ou « largeur » $\tau_p$) détermine l'angle de basculement $\theta$, et donc l'intensité *I* du signal de résonance :

$$\theta = \gamma' \times B_1 \times \tau_p \qquad (1)$$

$$M_y = M_o \times sin\, \theta \qquad (2)$$

La magnétisation observée $M_y$ est maximale à $\theta$ = 90°. La durée d'impulsion doit être courte afin que tous les signaux de la fenêtre spectrale *SW* présentent un degré d'excitation similaire. La magnétisation décroît par suite du processus de relaxation.

**Temps mort $t_d$.** Le temps mort est l'intervalle de temps séparant la fin de l'impulsion du début de l'acquisition ; il répond à des impératifs techniques, mais il faut prendre garde à son influence possible sur l'intensité du signal et la phase du pic. La réduction d'intensité liée au temps mort affecte davantage les signaux à

décroissance rapide (qui donnent des raies spectrales larges) que les signaux à décroissance lente (qui donnent des raies spectrales étroites).

**Temps d'acquisition $t_{ac}$**. Le temps d'acquisition $t_{ac}$ est en relation avec la fenêtre spectrale (largeur totale de la région observée) et le nombre de données numériques (DP, *data points*) collectées lors de l'acquisition du signal.

$$t_{ac} = \frac{DP}{2SW} \quad (3)$$

L'intensité du signal et le rapport signal/bruit atteignent leur maximum lorsque $t_{ac} \approx 1{,}2/(\pi\nu_{1/2})$, $\nu_{1/2}$ étant la largeur à mi-hauteur, mais il convient d'opérer avec un $t_{ac}$ d'au moins $5/(\pi\nu_{1/2})$ pour limiter la distorsion du signal.

**Temps de répétition $t_r$**. Le temps de relaxation spin-réseau $T_1$ détermine le temps requis pour le retour de l'aimantation à sa valeur d'équilibre après une impulsion. Il est possible de réduire le temps de relaxation à l'aide de réactifs spéciaux. Pour les analyses quantitatives, le temps de répétition utilisé doit être fixé en fonction de $T_1$ et θ afin d'éviter les effets de saturation.

**Gain de réception**. Le signal analogique détecté par la sonde est amplifié avant d'être numérisé et mis en mémoire. L'amplification, ou gain de réception, doit être réglée (de façon automatique ou manuelle) de telle sorte que le signal ne sature pas le convertisseur analogique-numérique, ce qui entraîne une distorsion du signal, mais permette au bruit aléatoire généré dans la sonde d'être numérisé (bruit non nul).

*OPTIMISATION DES PARAMÈTRES D'ACQUISITION ET DE TRAITEMENT EN ANALYSE QUANTITATIVE*

En plus des paramètres d'acquisition, différents paramètres de traitement affectent également l'intensité du signal. Après collecte d'un nombre suffisant de balayages (répétitions), le signal FID résultant fait l'objet d'une transformation de Fourier. La fiabilité des analyses quantitatives passe par l'optimisation des paramètres suivants.

**Résolution numérique**. La résolution numérique est la séparation, en fréquence, des données (DP). Le signal traité doit comporter au moins 5 valeurs numériques au-dessus de la hauteur médiane du signal à intégrer. Pour améliorer cette résolution, on peut ajouter des points d'intensité zéro à la fin du signal FID expérimental, avant transformation (procédé du *zero filling*).

**Rapport signal/bruit (*S/N*)**. Il s'agit du rapport entre l'intensité (mesurée par la hauteur de pic) d'un signal spécifié du spectre RMN et les fluctuations aléatoires de ce signal, que l'on mesure généralement dans une région du spectre ne contenant pas de signal provenant de l'analyte. Un rapport *S/N* médiocre compromet l'exactitude de l'intégration des pics et des analyses quantitatives. Un rapport *S/N* supérieur ou égal à 150:1 permet l'intégration des pics avec un écart type inférieur à 1 pour cent. Les spectromètres actuels comportent des algorithmes de calcul donnant le rapport *S/N* des pics appropriés. Il peut être difficile d'obtenir un rapport *S/N* suffisant lors de l'analyse de solutions diluées, notamment lorsque la détection porte sur des noyaux autres que $^1H$. Différentes méthodes permettent d'améliorer ce rapport :

– l'augmentation du nombre *n* de signaux accumulés, puisque le rapport *S/N* croît comme $\sqrt{n}$,
– la multiplication exponentielle du signal FID avant transformation de Fourier ; le facteur de multiplication exponentielle doit être de l'ordre de grandeur de la largeur du pic à mi-hauteur,
– l'emploi de spectromètres à champ magnétique $B_0$ plus intense, puisque le rapport *S/N* est proportionnel à $B_0^{3/2}$,
– le recours à un filtrage numérique pour réduire le bruit,
– l'emploi de sondes permettant de maximiser le facteur de remplissage,
– l'emploi de cryosondes permettant de réduire le bruit thermique.

**Région d'intégration**. L'intensité des signaux RMN est obtenue par intégration du signal quasi-analogique soit par une fonction en escalier soit, pour une plus grande exactitude, par intégration séparée des raies et présentation des données numériques. En RMN du liquide, les signaux ont l'allure d'une courbe de Lorentz. Sauf indication contraire dans la monographie ou chevauchement des pics, il convient d'utiliser pour le pic considéré et pour le pic de référence le même intervalle d'intégration, exprimé en multiple de la largeur à mi-hauteur du pic.

**Etendue dynamique**. L'étendue dynamique du convertisseur analogique-numérique détermine la raie d'intensité la plus faible pouvant être observée ou quantifiée lors de l'intégration de 2 signaux de même largeur de raie dans un spectre. Un convertisseur de 16 bits permet d'identifier un signal ayant une intensité relative de 0,003 pour cent par rapport à un signal fort dont l'intensité occupe la totalité de l'étendue dynamique du convertisseur.

*RMN D'ÉCHANTILLONS EN SOLUTION*

La plupart des mesures de RMN sont effectuées sur des solutions diluées (à environ 1 pour cent) de l'analyte dans un solvant approprié, qui peut être additionné d'un composé de référence approprié destiné à l'étalonnage du déplacement chimique.

**Solvants**. Le solvant doit être capable d'assurer la dissolution de l'analyte sans exercer d'autre interaction, sauf intention contraire. Pour limiter l'interférence des signaux émanant du solvant, il convient de travailler avec des solvants entièrement deutériés (*oxyde de deutérium R*, *chloroforme deutérié R*, *diméthylsulfoxyde deutérié R*, *acétone deutériée R*, *méthanol deutérié R*, etc.). Les atomes de solvants donnent des signaux facilement identifiables par leur déplacement chimique, et peuvent être utilisés pour étalonner l'axe des déplacements chimiques (témoin secondaire).

**Références**. La caractéristique spectrale la plus sensible à l'environnement chimique de l'atome au sein de la molécule est le déplacement chimique, désigné par δ et exprimé en parties par million. Le déplacement chimique $\delta_{X,\text{échantillon}}$ de la résonance d'un noyau X actif en RMN s'exprime en parties par million et est mesuré par la différence observée entre la fréquence de résonance $\nu_{X,\text{échantillon}}$ de ce noyau et la fréquence de résonance $\nu_{X,\text{référence}}$ d'un témoin interne, toutes deux exprimées en hertz, rapportée à la fréquence de travail $\nu_{X,\text{référence}}$ du spectromètre, en megahertz, pour un champ $B_0$ :

$$\delta_{\text{X,échantillon}} = \frac{(\nu_{\text{X,échantillon}} - \nu_{\text{X,référence}})}{\nu_{\text{X,référence}}} \quad (4)$$

Par convention, la référence utilisée pour déterminer les déplacements chimiques exacts est la raie $^1H$ du *tétraméthylsilane R* (*TMS*), avec réglage de $\delta_{TMS} = 0$ ppm. En principe, une fois l'échelle de déplacement du $^1H$ établie par référence au TMS, la fréquence exacte de toute autre résonance X peut être calculée et son échelle de déplacement chimique étalonnée. La fréquence $\nu_{X,\text{référence}}$ d'une référence (secondaire) à $\delta_X = 0$ ppm est calculée à partir de la fréquence $^1H$ du TMS, $\nu_{H,TMS}$ et de la valeur indiquée dans une table du rapport $\Xi_{X,\text{référence}}$, entre la fréquence spécifique de l'isotope et la fréquence $^1H$ du TMS :

$$\nu_{\text{X,référence}} = \nu_{\text{H,TMS}} \times \Xi_{\text{X,référence}} \quad (5)$$

Les composés de référence à $\delta_X$ = 0 ppm et les rapports $\Xi_{X,référence}$ correspondants sont indiqués ci-après :

| Noyau | Eau[a] | $\Xi_{X,référence}$ | Autres solvants | $\Xi_{X,référence}$ |
|---|---|---|---|---|
| $^{1}H$ | DSS[b] | 1,00000000 | TMS | 1,00000000 |
| $^{13}C$ | DSS[b] | 0,25144953 | TMS | 0,25145020 |
| $^{15}N$ | $NH_3$ | 0,10132912 | $CH_3NO_2$ | 0,10136767 |
| $^{19}F$ | $CF_3COOH$ | non indiqué | $CCl_3F$ | 0,94094011 |
| $^{31}P$ | $H_3PO_4$ (85 pour cent) | 0,40480742 | $(CH_3O)_3PO$ | 0,40480864 |
| [a]Le déplacement chimique dépend du pH | | | | |
| [b]DSS = 2,2-diméthyl-2-silapentane-5-sulfonate de sodium | | | | |

En pratique, les déplacements chimiques X sont directement étalonnés à l'aide d'un composé de référence approprié. En RMN du $^{1}H$ et du $^{13}C$, la principale méthode utilisée est celle de l'étalon interne, où le composé de référence est directement ajouté au système étudié. En RMN du $^{15}N$, du $^{19}F$ ou du $^{31}P$, la méthode de l'étalon externe, où l'échantillon et le composé de référence sont contenus séparément dans des tubes cylindriques coaxiaux, est souvent appropriée.

**Stabilisation**. Pour éviter la dérive du spectre dans le temps, une procédure de stabilisation champ-fréquence (*lock*) est appliquée. Sauf spécification contraire dans la monographie, le signal $^{2}H$ (deutérium) émanant de solvants deutériés est utilisé à cet effet.

*ANALYSE QUALITATIVE*

En analyse qualitative, les spectres RMN sont principalement utilisés comme outils d'identification, le spectre $^{1}H$ ou $^{13}C$ d'un échantillon à analyser étant alors comparé au spectre d'un composé de référence ou, plus rarement, à un spectre de référence publié. Les spectres du composé à examiner et du composé de référence doivent être acquis par la même procédure et dans les mêmes conditions opératoires. Les pics figurant dans les 2 spectres, ou les régions caractéristiques des spectres, doivent correspondre en position, en intensité et en multiplicité. Dans certains cas, une comparaison mathématique, par exemple par calcul d'un coefficient de corrélation, peut être utile. En l'absence d'étalon de référence, il est admis d'opérer avec une substance de référence « maison », dont l'identité a été établie par des méthodes alternatives, ou en démontrant que le spectre RMN est intégralement compatible avec la structure déclarée du composé.

*ANALYSE QUANTITATIVE*

Dans une expérience de RMN basique, l'intensité du signal est l'aire, obtenue par intégration, située sous la courbe du signal enregistré. Ce n'est que lorsque 2 signaux sont de largeur à mi-hauteur et de multiplicité identiques que la hauteur du signal peut servir de mesure de l'intensité. Dans des conditions de relaxation pratiquement complète entre 2 acquisitions, l'intensité $I_A$ du signal est une mesure vraie du nombre $N_A$ de noyaux responsables du signal :

$$I_A = K_S \times N_A \quad (6)$$

La constante $K_S$ englobe les constantes fondamentales, les propriétés de l'échantillon et les paramètres du récepteur, et elle peut être éliminée lorsqu'il s'agit de comparer l'intensité de signaux, puisqu'elle exprime la relation de proportionnalité qui existe entre les nombres de noyaux des 2 groupes structurels A et B faisant l'objet de la comparaison :

$$\frac{I_A}{I_B} = \frac{N_A}{N_B} \quad (7)$$

Les nombres $N_i$ de noyaux appartenant à des groupes structurels différents dans une même molécule sont des petits entiers. Les valeurs mesurées sont arrondies à l'entier le plus proche. Cependant, il est facile de vérifier que le spectromètre effectue correctement les opérations d'acquisition et de traitement en comparant les intensités exactes dans le spectre d'un composé organique approprié de structure connue.

Outre le fait que les intensités des signaux dus à chacun des composés d'un mélange sont liées les unes aux autres par de petits entiers, les quantités molaires relatives de ces composés peuvent être mesurées par comparaison des intensités normalisées des résonances des différents composants. Le rapport molaire entre deux composants d'un mélange est donné par l'équation suivante :

$$\frac{n_A}{n_B} = \frac{I_A}{I_B} \times \frac{N_B}{N_A} \quad (8)$$

La détermination n'est valide que lorsque sont connues les structures moléculaires (ou du moins les valeurs de $N$ pour les groupes structurels observés) pour lesquelles sont déterminés $I_A$ et $I_B$. Elle est effectuée soit au moyen d'un étalon interne soit par normalisation des pics.

**Méthode de l'étalon interne**. On peut déterminer la masse $m_A$ d'un analyte A en ajoutant à la solution, comme étalon d'intensité, une masse connue $m_B$ d'une substance B dont on connaît la teneur pour cent $P_B$. L'équation (8) devient alors l'équation (9) :

$$m_A = \frac{I_A}{I_B} \times \frac{N_B}{N_A} \times \frac{M_A}{M_B} \times m_B \times \frac{P_B}{100} \quad (9)$$

où $M_i$ désigne la masse moléculaire.

L'étalon d'intensité doit être soigneusement choisi : il doit être totalement soluble dans le solvant utilisé pour l'analyte, il ne doit produire qu'un petit nombre de signaux, et le « groupe témoin » doit émettre un signal dans une région vide du spectre. L'emploi d'un composé de haute pureté et de masse moléculaire relativement élevée est recommandé.

**Procédé de normalisation**. Les proportions relatives des composants d'un mélange, le degré de substitution d'un polymère structurellement modifié, la teneur d'un contaminant peuvent être déterminés par comparaison de l'intensité relative des résonances.

Il convient de valider la méthode expérimentale utilisée, pour s'assurer de l'absence de chevauchement entre les signaux considérés. Lorsque le contaminant est un composé de structure ou de masse moléculaire mal connue (émulsifiant par exemple), l'addition de petites quantités de ce composé dans le tube RMN permet de construire une courbe d'étalonnage.

MODE OPÉRATOIRE

**Préparation de l'échantillon**. Mettez la substance à examiner en solution dans le solvant éventuellement additionné, selon les indications de la monographie, du composé de référence approprié pour étalonner le déplacement chimique. Pour les analyses quantitatives, les solutions doivent être exemptes de particules solides. Certaines analyses quantitatives peuvent exiger l'addition d'un étalon interne permettant la comparaison, après intégration, des résonances observées pour la substance à examiner et pour le composé de référence. Les composés de référence et concentrations à utiliser sont indiqués dans les monographies spécifiques. Dans d'autres analyses quantitatives, le résultat est obtenu par comparaison de l'intensité relative de 2 ou de la totalité des résonances observées pour la substance à examiner. Après avoir placé l'échantillon dans un tube, fermez le tube, introduisez-le dans l'aimant du spectromètre, puis réglez les paramètres expérimentaux et effectuez la mesure. Les paramètres opératoires fondamentaux sont indiqués dans les monographies.

**Procédure de mesure**. Equilibrez l'échantillon contenu dans la sonde, puis optimisez les réglages instrumentaux afin d'obtenir des conditions de résonance optimales et un rapport *S/N* maximal par réglage d'accord et d'adaptation de la sonde, et procédez aux ajustements nécessaires pour maximiser

l'homogénéité du champ magnétique à travers l'échantillon (*shimming*). Notez ou enregistrez dans l'ordinateur les réglages utilisés. Une expérience peut être composée de multiples séquences d'impulsion-acquisition-latence, et les signaux FID correspondants sont sommés dans la mémoire de l'ordinateur, avec calcul du bruit aléatoire moyen. Lorsqu'un rapport *S/N* convenable a été obtenu, le signal FID est mis en mémoire et le spectre fréquentiel est généré par transformation de Fourier des signaux FID sommés.

RMN DU SOLIDE

L'analyse d'échantillons solides est possible au moyen de spectromètres RMN spécialement équipés à cet effet. Certaines techniques rendent observables les raies individuelles des différents sites atomiques, d'où l'extension possible, et d'un grand intérêt, de l'application de la RMN à des composés inorganiques.

L'une de ces techniques consiste à soumettre l'échantillon pulvérisé à une rotation rapide (4-30 kHz) dans un rotor (d'un diamètre extérieur d'environ 4 mm) incliné d'un angle de 54,7° (l'angle « magique ») par rapport à l'axe du champ magnétique $B_0$ ; cette technique est appelée rotation à l'angle magique (MAS, *magic angle spinning*). Le découplage haute puissance constitue un autre outil efficace, et une 3e méthode, dite de polarisation croisée (CP, *cross polarisation*), repose sur un transfert de polarisation de noyaux facilement excitables vers des noyaux moins facilement polarisables. La combinaison de ces techniques permet d'obtenir des spectres de haute résolution apportant une grande quantité d'informations sur les caractéristiques chimiques et structurelles des solides vitreux, amorphes et cristallins, qu'il s'agisse de céramiques, polymères ou minéraux.

Si la RMN est appliquée à un solide, la procédure doit être intégralement décrite dans la monographie.

**01/2008:20234**
**corrigé 6.1**

# 2.2.34. ANALYSE THERMIQUE

L'analyse thermique désigne un ensemble de techniques qui permettent de mesurer la variation d'une propriété physique d'une substance en fonction de la température. Les techniques les plus habituellement utilisées sont celles qui mesurent les changements d'énergie ou de masse d'un échantillon de substance.

THERMOGRAVIMÉTRIE

La thermogravimétrie est une technique qui permet d'enregistrer la masse d'un échantillon de substance en fonction de la température suivant un programme de température contrôlé.

**Appareillage**. Les constituants principaux d'une thermobalance sont : un dispositif permettant de chauffer ou de refroidir la substance suivant un programme de température déterminé, un porte-échantillon sous atmosphère contrôlée, une électrobalance et un enregistreur. Dans certains cas, l'appareil peut être associé à un système permettant d'analyser les substances volatiles.

**Contrôle de la température**. Vérifiez l'échelle des températures à l'aide d'un matériau approprié, selon les indications du fabricant.

**Vérification de l'électrobalance**. Placez une quantité appropriée de matériau de référence certifié approprié (par exemple, l'*oxalate de calcium monohydraté SCR*) dans le porte-échantillon et déterminez-en la masse. Fixez la vitesse de chauffage selon les indications du fabricant. Commencez le chauffage et enregistrez la courbe thermogravimétrique en portant la température, ou le temps, en abscisse par valeurs croissantes de gauche à droite et la masse en ordonnée par valeurs croissantes vers le haut. Interrompez le chauffage lorsque la température atteint environ 230 °C. Mesurez sur le graphique la différence entre les paliers initial et final de la courbe masse-température, ou masse/temps, qui représente la perte de masse. La perte de masse déclarée de la substance de référence certifiée est indiquée sur l'étiquette.

**Mode opératoire**. Utilisez la même méthode avec la substance à examiner en utilisant les conditions opératoires prescrites dans la monographie. Calculez la perte de masse de la substance à examiner à partir de la différence mesurée sur le graphique obtenu. Exprimez la perte de masse en pour cent $\Delta\ m/m$.

En cas d'utilisation fréquente de l'appareil, effectuez le contrôle de la température et l'étalonnage régulièrement. Dans le cas contraire, effectuez-les avant chaque détermination.

L'atmosphère d'essai étant critique, les paramètres suivants sont notés lors de chaque mesure : pression ou débit, composition du gaz.

ANALYSE CALORIMÉTRIQUE DIFFÉRENTIELLE

L'analyse calorimétrique différentielle (ACD) est une technique permettant de mettre en évidence les phénomènes énergétiques qui se produisent au cours du chauffage (ou du refroidissement) d'une substance (ou d'un mélange de substances) et d'en déterminer les variations d'enthalpie, les changements de chaleur spécifique et la température à laquelle ils apparaissent.

Cette technique permet de mesurer le flux de chaleur différentielle (par rapport à la température), émis ou absorbé par l'échantillon analysé comparativement à la cellule de référence en fonction de la température. Deux types d'appareillage sont disponibles : ceux à compensation qui maintiennent l'échantillon et la cellule de référence à la même température par un apport de chaleur et ceux qui appliquent un taux de chauffage constant et détectent une différence de température par mesure de la différence de flux de chaleur entre l'échantillon et la cellule de référence.

**Appareillage**. L'appareillage à compensation est composé d'un four contenant un porte-échantillon comportant une cellule de référence et une cellule de mesure. Le second type d'appareillage est composé d'un four contenant une seule cellule comportant un porte-échantillon pour le creuset de référence et le creuset de mesure.

Les appareillages comportent un dispositif de programmation de température, un ou plusieurs détecteurs thermiques et un système d'enregistrement pouvant être associé à un système de traitement de données. Les mesures sont effectuées sous atmosphère contrôlée.

**Etalonnage de l'appareil**. Etalonnez l'appareil en température et en variation d'enthalpie, en utilisant de l'indium de grande pureté ou tout autre matériau certifié approprié, selon les indications du constructeur. Une combinaison de 2 métaux, tels l'indium et le zinc, peuvent être utilisés pour contrôler la linéarité.

**Mode opératoire**. Pesez dans un creuset adéquat une quantité appropriée de substance à examiner ; placez-la dans le porte-échantillon. Fixez la température de départ et de fin d'analyse, la vitesse de chauffage, selon les conditions opératoires prescrites dans la monographie.

Commencez l'analyse et enregistrez la courbe d'analyse calorimétrique différentielle, la température, ou le temps, étant portés en abscisse par valeurs croissantes de gauche à droite et la variation d'énergie en ordonnée, en précisant le sens (endothermique ou exothermique).

Le point d'intersection (A) du prolongement de la ligne de base avec la tangente au point de plus grande pente (point d'inflexion) de la courbe correspondant au changement de phase, marque la température à laquelle survient le phénomène (figure 2.2.34.-1). La fin du phénomène thermique est marquée par le sommet de la courbe.

L'enthalpie du phénomène est proportionnelle à l'aire sous la courbe limitée par la ligne de base, le facteur de proportionnalité étant déterminé à partir de la mesure de l'enthalpie de fusion d'une substance connue (de l'indium, par exemple) dans les mêmes conditions opératoires.

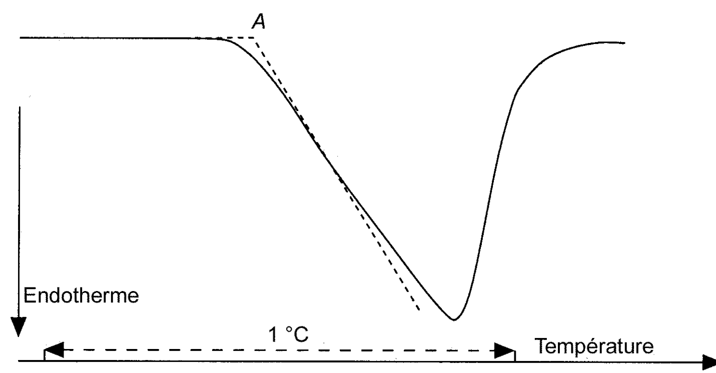



Figure 2.2.34.-1. – *Thermogramme*

Chaque thermogramme peut être accompagné des données suivantes : conditions employées, indication du dernier étalonnage, taille et identité de l'échantillon (y compris son historique thermique), récipient, atmosphère (identité, débit, pression), direction et taux du changement de température, sensibilité de l'instrument et de l'enregistreur.

**Applications**

*Changements de phase.* Détermination de la température, des variations de capacité thermique et de l'enthalpie des transitions de phase que subit une substance en fonction de la température :

| | |
|---|---|
| transition solide- solide : | allotropie - polymorphisme<br>transition vitreuse<br>désolvatation<br>amorphe cristallin |
| transition solide - liquide : | fusion |
| transition solide - gaz : | sublimation |
| transition liquide - solide : | solidification<br>recristallisation |
| transition liquide - gaz : | évaporation |

*Changements de composition chimique.* Mesure des enthalpies et des températures de réaction dans des conditions expérimentales données, permettant par exemple de déterminer les cinétiques de décomposition ou de désolvatation.

*Diagrammes de phases.* Etablissement des diagrammes de phases de mélanges à l'état solide. L'établissement du diagramme de phases peut être une étape importante de la préformulation et de l'optimisation du processus de lyophilisation.

*Détermination de la pureté.* La mesure de l'enthalpie et de la température de fusion par ACD, permet d'obtenir la teneur en impureté à partir d'un seul diagramme thermique, en n'utilisant que quelques milligrammes d'échantillon, sans nécessiter des mesures répétées de la température réelle.

En théorie, la fusion d'une substance pure, totalement cristalline est caractérisée, à une pression constante, par l'enthalpie de fusion $\Delta H_f$ dans un domaine infiniment étroit, correspondant à la température de fusion $T_0$. Un élargissement de ce domaine constitue un critère sensible de détection d'impuretés. Ainsi, des échantillons d'une même substance, dont les teneurs en impuretés diffèrent de quelques dixièmes de pour cent, donnent des diagrammes thermiques visuellement différentiables (figure 2.2.34.-2).

La détermination de pureté molaire par ACD est basée sur l'utilisation d'une approximation mathématique de la forme intégrée de l'équation de Van't Hoff appliquée aux concentrations (et non aux activités) dans un système binaire [$\ln(1 - x_2) = -x_2$ et $T \times T_0 = T_0^2$] :

$$T = T_0 - \frac{RT_0^2}{\Delta H_f} \times x_2 \qquad (1)$$

$x_2$ = la fraction molaire de l'impureté, c'est-à-dire le nombre de molécules de l'impureté divisé par le nombre total de molécules, dans la phase liquide (ou fondue) à la température $T$ (exprimée en kelvins),

$T_0$ = la température de fusion de la substance chimiquement pure, en kelvins,

$\Delta H_f$ = l'enthalpie molaire de fusion de la substance, en joules,

$R$ = la constante des gaz parfaits, en joules·kelvin$^{-1}$·mole$^{-1}$.

En conséquence, la détermination de pureté par ACD est réservée à la détection des impuretés formant un eutectique avec la substance principale et de fraction molaire inférieure à 2 pour cent dans la substance à analyser.

Cette méthode ne peut s'appliquer :

– aux substances amorphes,
– aux solvants ou aux composés polymorphes qui sont instables dans la gamme de température expérimentale,
– aux impuretés formant des solutions solides avec la substance principale,
– aux impuretés insolubles dans la phase liquide ou dans la substance principale en fusion.

Au cours du chauffage de la substance à examiner, l'impureté fond entièrement à la température de l'eutectique. Au-dessus de cette température, la phase solide ne contient plus que de la substance pure. Lors de l'augmentation progressive de température entre la température de l'eutectique et la température de fusion de la substance pure, la fraction molaire de l'impureté dans le liquide diminue constamment, puisque la quantité de substance pure liquéfiée augmente constamment. A toute température supérieure à la température de l'eutectique :

$$x_2 = \frac{1}{F} \times x_2^* \qquad (2)$$

$F$ = fraction fondue de l'échantillon analysé,

$x_2^*$ = fraction molaire de l'impureté de l'échantillon analysé.

Quand tout l'échantillon est fondu, $F = 1$ et $x_2 = x_2^*$.

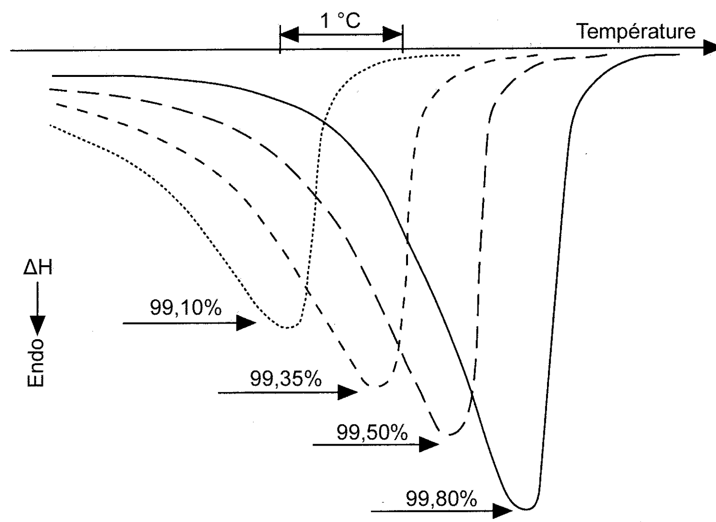



Figure 2.2.34.-2. – *Diagrammes thermiques selon la pureté*

En reportant l'équation (2) dans l'équation (1), celle-ci devient :

$$T = T_0 - \frac{x_2^* R T_0^2}{\Delta H_f} \times \frac{1}{F}$$

La valeur de l'enthalpie de fusion est obtenue par intégration du pic de fusion.

La température de fusion $T_0$ de la substance pure est déterminée à partir du graphe $1/F$, en fonction de la température exprimée en kelvins. La pente α de la droite, obtenue après linéarisation éventuelle, correspondant à $RT_0^2 \frac{x_2^*}{\Delta H_f}$, permet de calculer $x_2^*$.

La fraction $x_2^*$, multipliée par 100 donne le pourcentage molaire des impuretés eutectiques totales.

THERMOMICROSCOPIE

Les transitions de phase peuvent être visualisées par thermomicroscopie, méthode permettant d'observer au microscope, sous lumière polarisée, un échantillon soumis à une variation programmée de température.

Les observations faites en thermomicroscopie permettent d'identifier sans conteste la nature des phénomènes décelés en thermogravimétrie et en analyse calorimétrique différentielle.

**Appareillage**. L'appareil est composé d'un microscope équipé d'un dispositif de polarisation de la lumière, d'une platine chauffante, d'un programmateur de température et de vitesse de chauffage et/ou de refroidissement et d'un dispositif d'enregistrement des températures de transition. Il peut y être adjoint une caméra vidéo et un magnétoscope.

**01/2008:20235**

## 2.2.35. OSMOLALITÉ

En pratique, l'osmolalité est une façon globale de mesurer la contribution des différents solutés, présents dans une solution, à la pression osmotique de cette solution.

Une valeur approximative acceptable de l'osmolalité $\xi_m$ d'une solution aqueuse est donnée par :

$$\xi_m = \upsilon m \Phi$$

Si le soluté n'est pas ionisé, υ = 1 ; dans le cas contraire, υ est le nombre total d'ions préexistants ou éventuellement formés par solvolyse à partir d'une molécule du soluté.

*m* = molalité de la solution, c'est-à-dire nombre de moles de soluté par kilogramme de solvant,

Φ = coefficient osmotique molal permettant de tenir compte des interactions entre ions de charge opposée au sein de la solution. Il dépend de la valeur de *m*. Lorsque la complexité des solutions augmente, Φ devient difficilement mesurable.

L'unité d'osmolalité est l'osmole par kilogramme (osmol/kg) mais c'est très généralement son sous-multiple, la milliosmole par kilogramme (mosmol/kg), qui est utilisé.

Sauf indication contraire, l'osmolalité est déterminée par mesure de l'abaissement du point de congélation. Dans ce cas, la relation existant entre l'osmolalité et l'abaissement $\Delta T$ est :

$$\xi_m = \frac{\Delta T}{1,86} \times 1000 \text{ mosmol/kg}$$

*Appareillage*. L'appareil utilisé (osmomètre) comprend :

– un système de refroidissement du récipient de mesure,
– un système de mesure de la température constitué d'une résistance variable avec la température (thermistance) et muni d'un dispositif approprié de mesure du courant ou de la différence de potentiel qui peut être étalonné en abaissement de température ou directement en osmolalité,
– l'appareil est généralement muni d'un dispositif permettant l'agitation du prélèvement.

*Mode opératoire*. Préparez les solutions de référence requises, selon les indications du tableau 2.2.35.-1. Déterminez le zéro de l'appareil avec de l'*eau R*. Etalonnez l'appareil à l'aide des solutions de référence, en introduisant 50 µL à 250 µL d'échantillon dans la cellule de mesure et en déclenchant le système de réfrigération. Généralement la mise en marche de l'agitateur est programmée à une température inférieure à l'abaissement cryoscopique prévu afin d'arrêter la surfusion. Un système approprié indique la réalisation de l'équilibre. Avant chaque mesure, rincez la cellule de mesure avec la solution à examiner.

Réalisez les mêmes opérations avec la préparation à examiner. Lisez directement l'osmolalité ou calculez-la à partir de l'abaissement cryoscopique mesuré. La valeur doit être comprise entre deux valeurs de la gamme d'étalonnage.

Tableau 2.2.35.-1. – *Solutions de référence pour étalonnage de l'osmomètre*

| Masse en grammes de *chlorure de sodium R* par kilogramme d'*eau R* | Osmolalité réelle (mosmol/kg) | Osmolalité idéale (mosmol/kg) | Coefficient osmotique | Abaissement cryoscopique (°C) |
|---|---|---|---|---|
| 3,087 | 100 | 105,67 | 0,9463 | 0,186 |
| 6,260 | 200 | 214,20 | 0,9337 | 0,372 |
| 9,463 | 300 | 323,83 | 0,9264 | 0,558 |
| 12,684 | 400 | 434,07 | 0,9215 | 0,744 |
| 15,916 | 500 | 544,66 | 0,9180 | 0,930 |
| 19,147 | 600 | 655,24 | 0,9157 | 1,116 |
| 22,380 | 700 | 765,86 | 0,9140 | 1,302 |

**01/2008:20236**

# 2.2.36. DÉTERMINATION POTENTIOMÉTRIQUE DE LA CONCENTRATION IONIQUE À L'AIDE D'ÉLECTRODES À MEMBRANE SÉLECTIVE

Idéalement, le potentiel $E$ d'une électrode à membrane sélective dépend de façon linéaire du logarithme de l'activité $a_i$ d'un ion donné, comme l'exprime l'équation de Nernst :

$$E = E_0 + 2,303\frac{\mathrm{R}T}{z_\mathrm{i}\mathrm{F}}\log a_\mathrm{i}$$

$E_0$ = partie du potentiel constant attribuable au dispositif utilisé,

R = constante des gaz parfaits,

$T$ = température absolue,

F = nombre de Faraday,

$z_i$ = nombre de charge de l'ion affecté de son signe.

A force ionique constante :

$$E = E_0 + \frac{k}{z_\mathrm{i}}\log fC_\mathrm{i}$$

$C_i$ = concentration molaire de l'ion,

$f$ = coefficient d'activité $(a_\mathrm{i} = fC_\mathrm{i})$,

$k$ = $\frac{\mathrm{R}T}{\mathrm{F}}$

Si : $E_0 + \frac{k}{z_\mathrm{i}}\log f = E'_0$ et $S = \frac{k}{z_i}$

$S$ = pente de la courbe d'étalonnage de l'électrode considérée,

on obtient : $E = E'_0 + S\log C_\mathrm{i}$

et pour $-\log C_\mathrm{i} = \mathrm{p}C_\mathrm{i}$ : $E = E'_0 - S\mathrm{p}C_\mathrm{i}$.

La détermination potentiométrique de la concentration ionique s'effectue par mesure de la différence de potentiel entre 2 électrodes appropriées plongeant dans la solution à examiner : l'électrode indicatrice est une électrode sélective de l'ion à doser et l'autre, une électrode de référence.

*Appareillage.* Utilisez comme appareil de mesure un voltmètre permettant une mesure à 0,1 millivolt près et dont la résistance d'entrée est au moins 100 fois supérieure à celles des électrodes utilisées.

Les électrodes à membrane sélectives peuvent être soit des électrodes primaires à membrane cristalline ou non cristalline, ou à matrice rigide (par exemple, l'électrode de verre), soit des électrodes à porteur mobile chargé positivement ou négativement ou non chargé, soit encore des électrodes sensibilisées (éléctrodes à substrat enzymatique, électrodes indicatrices de gaz). L'électrode de référence est généralement une électrode argent-chlorure d'argent ou une électrode au calomel avec des liquides de jonction appropriés, n'entraînant aucune interférence.

*Mode opératoire.* Effectuez toutes les mesures à température constante à ± 0,5 °C près en tenant compte des variations de la pente de l'électrode en fonction de la température (tableau 2.2.36.-1). Ajustez la force ionique et éventuellement le pH de la solution à examiner, à l'aide du réactif tampon prescrit dans la monographie. Equilibrez l'électrode en la maintenant dans la solution à examiner, sous agitation lente et régulière, jusqu'à lecture constante.

Tableau 2.2.36.-1. - *Valeurs de k à différentes températures*

| Température (°C) | *k* |
|---|---|
| 20 | 0,0582 |
| 25 | 0,0592 |
| 30 | 0,0602 |

Dans le cas d'utilisation fréquente du système d'électrodes, vérifiez régulièrement la répétabilité et la stabilité des réponses ainsi que la linéarité de la courbe d'étalonnage ou de l'algorithme de calcul dans la gamme de concentration de la solution à examiner. Dans le cas contraire, effectuez ce contrôle avant chaque série de mesures. On peut considérer que la réponse de l'électrode est linéaire si la pente $S$ de la courbe d'étalonnage est voisine de $k/z_i$, par unité de p$C_i$.

PROCÉDÉ I (ÉTALONNAGE DIRECT)

Mesurez, à 3 reprises au moins, le potentiel d'au-moins 3 solutions de référence dont les concentrations en ion à doser encadrent la concentration présumée de la solution à examiner. Calculez la courbe d'étalonnage ou portez sur un graphique le potentiel moyen $E$ obtenu en fonction de la concentration de l'ion à doser exprimée en – log $C_i$ ou p$C_i$.

Préparez la solution à examiner selon les indications de la monographie ; mesurez-en le potentiel à 3 reprises et, à partir du potentiel moyen et de la courbe d'étalonnage, calculez la concentration de l'ion à doser.

PROCÉDÉ II (MÉTHODE DES AJOUTS MULTIPLES)

Préparez la solution à examiner selon les indications de la monographie. Mesurez à l'équilibre le potentiel $E_T$ d'un volume $V_T$ de cette solution, de concentration $C_T$ inconnue en l'ion à doser. Ajoutez, à au moins 3 reprises, un volume $V_S$ négligeable par rapport à $V_T$ ($V_S \leq 0{,}01V_T$), d'une solution de référence de concentration connue $C_S$, donnant une réponse située dans la partie linéaire de la courbe d'étalonnage. Après chaque ajout, mesurez le potentiel et calculez la variation de potentiel $\Delta E$ entre le potentiel mesuré et $E_T$. $\Delta E$ est lié à la concentration en l'ion à doser par l'équation :

$$\Delta E = S\log\left(1 + \frac{C_\mathrm{S}V_\mathrm{S}}{C_\mathrm{T}V_\mathrm{T}}\right)$$

ou

$$10^{\frac{\Delta E}{S}} = 1 + \frac{C_S V_S}{C_T V_T}$$

$V_T$ = volume de la solution à examiner,

$C_T$ = concentration de l'ion à doser dans la solution à examiner,

$V_S$ = volume ajouté de solution de référence,

$C_S$ = concentration de l'ion à doser dans la solution de référence,

$S$ = pente de l'électrode déterminée expérimentalement, à température constante, en mesurant la différence entre les potentiels obtenus à partir de 2 solutions de référence dont la concentration diffère d'un facteur 10 et se situe dans la gamme des concentrations où la réponse est linéaire.

Portez sur un graphique $10^{\frac{\Delta E}{S}}$ (en ordonnée) en fonction de $V_S$ (en abscisse) et extrapolez la droite obtenue jusqu'à son intersection avec l'axe des abscisses. A l'intersection, la concentration $C_T$ de la solution à examiner en l'ion à doser est donnée par l'équation :

$$C_T = \frac{C_S V_S}{V_T}$$

PROCÉDÉ III (MÉTHODE DE L'AJOUT SIMPLE)

Au volume $V_T$ de la solution à examiner, préparée selon les indications de la monographie, ajoutez un volume $V_S$ d'une solution de référence contenant une concentration distincte de l'ion à doser connue pour donner une réponse située dans la partie linéaire de la courbe d'étalonnage. Effectuez un essai à blanc dans les mêmes conditions. Mesurez, à au moins 3 reprises, le potentiel de la solution à examiner et du blanc, avant et après l'addition de la solution de référence. Calculez la concentration $C_T$ en ion à doser dans la solution à examiner à l'aide de l'équation suivante, en effectuant les corrections nécessaires pour la concentration du blanc, calculée de la même manière :

$$C_T = \frac{C_S V_S}{10^{\frac{\Delta E}{S}} (V_T + V_S) - V_T}$$

$V_T$ = volume de la solution à examiner ou du blanc,

$C_T$ = concentration de l'ion à doser dans la solution à examiner,

$C_S$ = concentration de l'ion à doser dans la solution de référence,

$V_S$ = volume ajouté de la solution de référence,

$\Delta E$ = différence entre les potentiels moyens mesurés avant et après addition de $V_S$.

$S$ pente de l'électrode déterminée expérimentalement, à température constante, en mesurant la différence entre les potentiels obtenus à partir de 2 solutions de référence dont la concentration diffère d'un facteur 10 et se situe dans la gamme des concentrations où la réponse est linéaire.

**01/2008:20237**

# 2.2.37. SPECTROMÉTRIE DE FLUORESCENCE-X(3)

La spectrométrie de fluorescence-X dispersive est une méthode qui utilise la mesure de l'intensité de la lumière fluorescente émise par un élément chimique (de nombre atomique de 11 à 92), soumis à un rayonnement X continu. L'intensité de la fluorescence produite par un élément donné dépend de la concentration en cet élément dans l'échantillon mais aussi de l'absorption par la matrice, du rayonnement d'excitation et du rayonnement fluorescent. Dans le domaine des concentrations faibles où la courbe d'étalonnage est linéaire, l'intensité de la fluorescence d'un élément donné dans une matrice donnée à une longueur d'onde donnée est directement proportionnelle à la concentration de cet élément et inversement proportionnelle au coefficient d'absorption massique de la matrice à cette longueur d'onde.

*Mode opératoire.* Réglez et utilisez l'appareil conformément aux instructions du fabricant. Les échantillons liquides peuvent être placés directement dans l'appareil alors que les échantillons solides sont d'abord comprimés sous forme de pastilles, si nécessaire après mélange avec un liant approprié.

Pour déterminer la concentration d'un élément dans un échantillon, il est nécessaire de déterminer le taux d'impulsions net produit par un ou plusieurs étalons contenant des quantités connues de l'élément à doser dans une matrice donnée, et de calculer ou de mesurer le coefficient d'absorption massique de la matrice dans laquelle se trouve l'élément à doser.

*Etalonnage.* A partir d'une solution étalon ou d'une série de dilutions de l'élément à analyser dans diverses matrices, déterminez la pente de la courbe d'étalonnage $b_0$ à l'aide de l'équation suivante :

$$b_0 \frac{1}{\mu_M} = \frac{I_C^N}{C}$$

$\mu_M$ = coefficient d'absorption de la matrice M, calculé ou mesuré,

$I_C^N$ = taux net d'impulsions,

C = concentration de la préparation étalon en l'élément à doser.

*Détermination du coefficient d'absorption massique de la matrice de l'échantillon.* Si la formule empirique de l'échantillon à analyser est connue, calculez son coefficient d'absorption massique à partir du coefficient d'absorption massique des éléments qui le composent, fourni par les tables. Si la composition élémentaire de l'échantillon est inconnue, calculez son coefficient d'absorption massique en mesurant l'intensité $I_U$ du rayonnement X diffusé (effet Compton), à l'aide de l'équation suivante :

$$\frac{1}{\mu_{MP}} = \mathrm{a} + \mathrm{b} I_U$$

$\mu_{MP}$ = coefficient d'absorption massique de l'échantillon,

$I_U$ = rayonnement X diffusé.

*Détermination du taux net d'impulsions de l'élément à doser dans l'échantillon.* Calculez le taux net d'impulsions de l'élément à doser $I_{EP}^N$ à partir de l'intensité mesurée de la raie de fluorescence et de l'intensité de la ou des raies associées au rayonnement de fond, en tenant compte des éventuelles contaminations dues au tube.

*Calcul de la concentration de l'élément à doser.* Si la concentration $C$ de l'élément à doser dans l'échantillon se situe dans la partie linéaire de la courbe d'étalonnage, elle peut être calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$C = \frac{I_{EP}^N}{b_0 \frac{1}{\mu_{MP}}} \times f$$

$f$ = facteur de dilution.

(3) G. Andermann &M.W. Kemp, Analytical Chemistry 30 1306 (1958). Z.H. Kalman & L. Heller, Analytical Chemistry 34 946 (1962). R.C. Reynolds, Jr., The American Mineralogist 46 1133 (1963). R.O. Müller, Spectrochimica Acta 20 143 (1964). R.O. Müller, Spectrochemische Analyse mit Röntgenfluoreszenz, R. Oldenburg München-Wien (1967).

01/2008:20238

## 2.2.38. CONDUCTIVITÉ

Le courant d'intensité $I$ (en ampères) qui traverse un conducteur est directement proportionnel à la force électromotrice $E$ (en volts) appliquée et inversement proportionnel à la résistance $R$ (en ohms) du conducteur :

$$I = \frac{E}{R}$$

La conductivité $\kappa$ d'une solution ou, à proprement parler, sa conductance spécifique, est par définition l'inverse de la résistivité $\rho$. Celle-ci est définie comme le quotient du champ électrique par la densité de courant. La résistance $R$ (en Ω) d'un conducteur de section $S$ (en cm$^2$) et de longueur $L$ (en cm) est donnée par l'expression :

$$R = \rho \frac{L}{S}$$

$$\text{d'où : } R = \frac{1}{\kappa} \times \frac{L}{S} \text{ soit } \kappa = \frac{1}{R} \times \frac{L}{S}$$

$L/S$ correspond à la constante idéale de la cellule.

L'unité de conductivité dans le système international est le siemens par mètre (S·m$^{-1}$). Dans la pratique, la conductivité électrique d'une solution est exprimée en siemens par centimètre (S·cm$^{-1}$) ou en microsiemens par centimètre (μS·cm$^{-1}$). L'unité de résistivité dans le système international est l'ohm-mètre (Ω·m). La résistivité d'une solution est généralement exprimée en ohms-centimètre (Ω·cm). Sauf indication contraire, la température de référence pour l'expression de la conductivité ou de la résistivité est de 25 °C.

L'appareillage et le mode opératoire décrits ci-après conviennent pour la mesure en laboratoire de valeurs de la conductivité supérieures à 10 μS·cm$^{-1}$. La mesure de la conductivité de l'eau est traitée dans les monographies concernées.

APPAREILLAGE

L'appareil utilisé (conductimètre ou résistivimètre) permet de déterminer la valeur de la résistance de la colonne de liquide comprise entre les électrodes de l'élément de mesure immergé (cellule de mesure). L'appareil est alimenté en tension alternative afin d'éviter les effets de polarisation des électrodes. Il est équipé d'une sonde de température et d'un dispositif de compensation de température.

La cellule de mesure est constituée par 2 électrodes de platine recouvertes de noir de platine, ayant chacune une surface $S$, maintenues parallèles à une distance $L$ l'une de l'autre et généralement protégées par une gaine de verre. D'autres types de cellule peuvent être utilisés.

MODE OPÉRATOIRE

**Détermination de la constante de la cellule de mesure**

Choisissez une cellule de mesure adaptée aux propriétés et à la conductivité de la solution à examiner. La constante de la cellule doit être d'autant plus élevée que la conductivité attendue est grande ($\rho$ faible). A titre indicatif, les cellules de mesure couramment utilisées ont des constantes de cellule de l'ordre de 0,1 cm$^{-1}$, 1 cm$^{-1}$ et 10 cm$^{-1}$. Utilisez un matériau de référence certifié, par exemple du chlorure de potassium, approprié à la mesure. La conductivité du matériau de référence certifié doit être voisine de la conductivité attendue de la solution à examiner. D'autres matériaux de référence certifiés peuvent être utilisés, notamment pour les cellules ayant une constante de 0,1 cm$^{-1}$. Rincez la cellule de mesure plusieurs fois à l'*eau distillée R*, puis au moins 2 fois avec la solution de matériau de référence certifié qui est utilisée pour la détermination de la constante de la cellule de mesure. Mesurez la résistance de la cellule de mesure en présence de la solution de matériau de référence certifié amenée à 25 ± 1 °C. La constante $K_{cell}$ de la cellule de mesure est fonction de sa géométrie, en cm$^{-1}$ ; elle est donnée par l'expression :

$$K_{cell} = R_{MRC} \times \kappa_{MRC}$$

$R_{MRC}$ = résistance mesurée, exprimée en mégaohms,

$\kappa_{MRC}$ = conductivité de la solution du matériau de référence certifié utilisée, exprimée en microsiemens par centimètre.

La constante $K_{cell}$ de la cellule de mesure ne doit pas s'écarter de plus de 5 pour cent de la valeur indiquée.

Si la détermination de la constante de la cellule de mesure est effectué à une température différente de celle indiquée pour le matériau de référence certifié, la valeur de la conductivité peut être calculée à l'aide de l'expression :

$$\kappa_T = \kappa_{TMRC} \times [1 + \alpha (T - T_{MRC})]$$

$\kappa_T$ = valeur de la conductivité à la température d'étalonnage,

$\kappa_{TMRC}$ = valeur de la conductivité du matériau de référence certifié,

$T$ = température d'étalonnage,

$T_{MRC}$ = température indiquée pour le matériau de référence certifié,

$\alpha$ = coefficient thermique applicable à la conductivité du matériau de référence certifié ; $\alpha$ = 0,021 pour le chlorure de potassium.

**Détermination de la conductivité de la solution à examiner**

Après étalonnage de l'appareil avec une solution de matériau de référence certifié, rincez la cellule de mesure à plusieurs reprises avec de l'*eau distillée R*, puis au moins 2 fois avec la solution aqueuse à examiner. Effectuez ensuite des mesures successives comme décrit dans la monographie.

01/2008:20239

## 2.2.39. DISTRIBUTION DE LA MASSE MOLÉCULAIRE DES DEXTRANS

Opérez par chromatographie d'exclusion (*2.2.30*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,200 g de la substance à examiner dans la phase mobile et complétez à 10 mL avec la phase mobile.

*Solution de marquage*. Dissolvez 5 mg de *glucose R* et 2 mg de *dextran* $V_0$ *SCR* dans 1 mL de phase mobile.

*Solutions d'étalonnage*. Dissolvez séparément, dans 1 mL de phase mobile, 15 mg de *dextran 4 pour étalonnage SCR*, 15 mg de *dextran 10 pour étalonnage SCR*, 20 mg de *dextran 40 pour étalonnage SCR*, 20 mg de *dextran 70 pour étalonnage SCR* et 20 mg de *dextran 250 pour étalonnage SCR*.

*Solution de validation du système*. Dissolvez 20 mg de *dextran 40 pour validation SCR* (pour l'analyse du dextran 40) ou 20 mg de *dextran 60/70 pour validation SCR* (pour l'analyse du dextran 60 et du dextran 70), dans 1 mL de phase mobile.

La chromatographie peut être réalisée en utilisant :

– une colonne d'une longueur de 0,3 m et d'un diamètre intérieur de 10 mm, remplie d'*agarose réticulé pour chromatographie R*, ou une série de colonnes, d'une longueur de 0,3 m et d'un diamètre intérieur de 10 mm, remplies de *gel polyéther hydroxylé pour chromatographie R*,
– comme phase mobile, à un débit de 0,5-1 mL/min, maintenu constant à ± 1 pour cent par heure, une solution contenant 7 g de *sulfate de sodium anhydre R* et 1 g de *chlorobutanol R* par litre d'*eau R*,
– comme détecteur, un réfractomètre différentiel,
– un injecteur à boucle de 100 μL à 200 μL,

en maintenant constante à ± 0,1 °C près la température du système.

ETALONNAGE DU SYSTÈME CHROMATOGRAPHIQUE

Injectez à plusieurs reprises le volume choisi de la solution de marquage. Le chromatogramme obtenu présente 2 pics successifs correspondant respectivement au *dextran $V_0$ SCR* et au *glucose R*. Calculez le volume interstitiel $V_0$ à partir du volume d'élution du pic correspondant au dextran $V_0$, et le volume total $V_t$ à partir du pic correspondant au dextrose.

Injectez le volume choisi de chacune des solutions d'étalonnage. Tracez soigneusement la ligne de base de chacun des chromatogrammes obtenus. Divisez chaque chromatogramme en *p* (au moins 60) bandes verticales égales (correspondant à des volumes d'élution égaux). Dans chaque bande *i*, correspondant à un volume d'élution $V_i$, mesurez la hauteur $y_i$ séparant la ligne de base du tracé du chromatogramme, et calculez le coefficient de distribution $K_i$ à l'aide de l'expression :

$$\frac{(V_i - V_0)}{(V_t - V_0)} \quad (1)$$

$V_0$ = volume interstitiel de la colonne, déterminé à partir du pic correspondant au *dextran $V_0$ SCR* dans le chromatogramme obtenu avec la solution de marquage,

$V_t$ = volume total de la colonne, déterminé à partir du pic correspondant au glucose dans le chromatogramme obtenu avec la solution de marquage,

$V_i$ = volume d'élution de la bande *i* du chromatogramme obtenu avec chacune des solutions d'étalonnage.

Effectuez l'étalonnage du système chromatographique par l'une des 2 méthodes ci-après.

**Etalonnage par dessin de la courbe**. Pour chacun des dextrans pour étalonnage, calculez, à l'aide de l'expression (1), le coefficient de distribution $K_{max}$ correspondant au point le plus élevé du tracé chromatographique. Portez sur un graphique semilogarithmique les valeurs de $K_{max}$ (en abscisse) en fonction de la masse moléculaire déclarée au point le plus élevé du tracé chromatographique $M_{max}$ de chacun des dextrans pour étalonnage et du glucose. Tracez une première courbe d'étalonnage à travers les points obtenus, en l'extrapolant entre le point $K_{max}$ obtenu avec le *dextran 250 pour étalonnage SCR* et la valeur la plus basse de *K* obtenue avec ce même dextran (voir figure 2.2.39.-1). A l'aide de cette première droite d'étalonnage, transformez, pour chaque chromatogramme, toutes les valeurs de coefficient de distribution $K_i$ en masse moléculaire $M_i$, puis calculez la masse moléculaire moyenne $M_w$ de chaque dextran pour étalonnage à l'aide de l'équation (3) ci-après. Si les valeurs calculées de $M_w$ ne diffèrent pas de plus de 5 pour cent de celles déclarées pour chacun des 5 dextrans pour étalonnage et si la différence moyenne est de ± 3 pour cent, la courbe d'étalonnage convient. Sinon, déplacez la courbe d'étalonnage le long de l'axe des ordonnées et répétez la procédure jusqu'à ce que les valeurs calculées et déclarées de $M_w$ ne diffèrent pas de plus de 5 pour cent.

**Etalonnage par calcul de la courbe**. Calculez, à l'aide des équations (2) et (3) ci-après, en utilisant une méthode appropriée(4), les valeurs de $b_1$, $b_2$, $b_3$, $b_4$ et $b_5$ qui donnent des valeurs de $M_w$ ne différant pas de plus de 5 pour cent de la valeur déclarée de chacun des dextrans pour étalonnage, et à 180 ± 2 pour le glucose :

$$M_i = b_5 + e^{\left(b_4 + b_1K_i + b_2K_i^2 + b_3K_i^3\right)} \quad (2)$$

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_{i=1}^{p} (y_iM_i)}{\sum_{i=1}^{p} y_i} \quad (3)$$

*p* = nombre de bandes divisant le chromatogramme,

$y_i$ = hauteur séparant la ligne de base du tracé du chromatogramme sur la bande *i*,

$M_i$ = masse moléculaire sur la bande *i*.

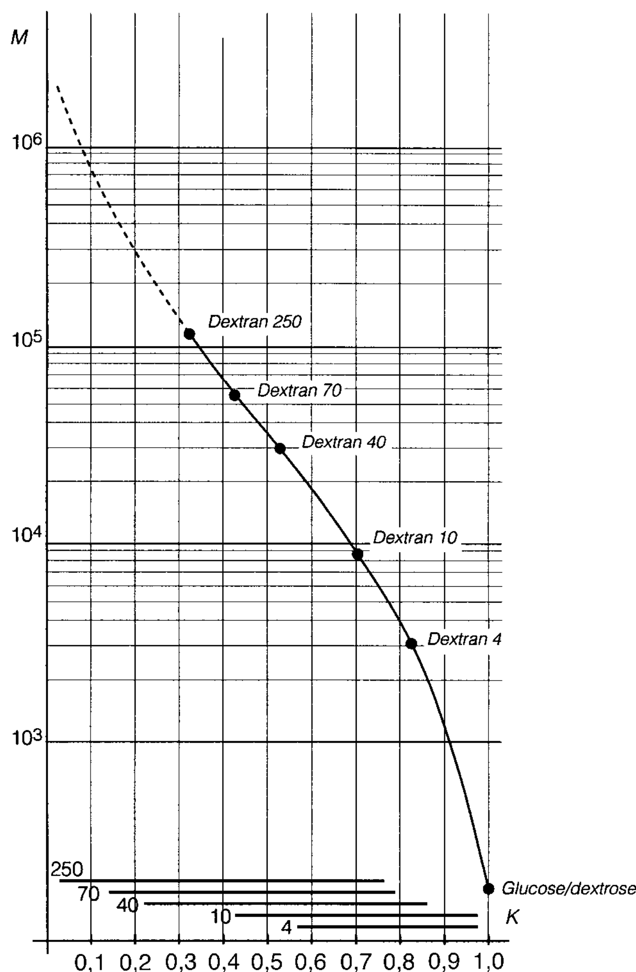



Figure 2.2.39.-1. – *Exemple d'une courbe d'étalonnage. Le trait pointillé représente la partie de la courbe qui doit être extrapolée. Les traits horizontaux dans le bas de la figure représentent la largeur et la position du tracé chromatographique obtenu avec chaque dextran pour étalonnage.*

VALIDATION DU SYSTÈME CHROMATOGRAPHIQUE

Injectez le volume choisi de la solution de validation du système convenant au dextran à analyser.

**Masse moléculaire moyenne totale du dextran pour essai de performance SCR**. Calculez $M_w$ comme indiqué sous Etalonnage du système chromatographique, en utilisant soit la courbe d'étalonnage soit les valeurs obtenues pour $b_1$, $b_2$, $b_3$, $b_4$ et $b_5$.

L'essai n'est valable que si la valeur de $M_w$ est de :

– 41 000 à 47 000 pour le *dextran 40 pour essai de performance SCR*,
– 67 000 à 75 000 pour le *dextran 60/70 pour essai de performance SCR*.

(4) La méthode Gauss-Newton, modifiée par Hartley a été jugée appropriée (voir O. Hartley, Tecnometrics, 3 (1961) et G. Nilsson et K. Nilsson, J. Chromat., 101, 137 (1974). Un programme pour micro-ordinateur destiné à l'ajustement de courbes et capable d'effectuer des régressions non linéaires peut être utilisé.

**Masse moléculaire moyenne de la fraction dextran supérieure (10 pour cent)**. Calculez $M_w$ pour la fraction dextran supérieure (10 pour cent) qui est éluée dans la bande *n*, à l'aide de l'équation :

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i M_i)}{\sum_{i=1}^{n} y_i} \quad (4)$$

*n* étant défini par les expressions (5) et (6) ci-après :

$$\sum_{i=1}^{n} y_i \leq 0,1 \left(\sum_{i=1}^{p} y_i\right) \quad (5)$$

$$\sum_{i=1}^{n+1} y_i > 0,1 \left(\sum_{i=1}^{p} y_i\right) \quad (6)$$

$p$ = nombre de bandes divisant le chromatogramme,

$y_i$ = hauteur séparant la ligne de base du tracé du chromatogramme sur la bande *i*,

$M_i$ = masse moléculaire sur la bande *i*.

L'essai n'est valable que si la valeur de $M_w$ obtenue pour la fraction dextran supérieure (10 pour cent) est de :

– 110 000 à 130 000 pour le *dextran 40 pour essai de performance SCR*,

– 190 000 à 230 000 pour le *dextran 60/70 pour essai de performance SCR*.

**Masse moléculaire moyenne de la fraction dextran inférieure (10 pour cent)**. Calculez $M_w$ pour la fraction dextran inférieure (10 pour cent) qui est éluée dans et après la bande *m*, à l'aide de l'équation :

$$M_w = \frac{\sum_{i=m}^{p}(y_i M_i)}{\sum_{i=m}^{p} y_i} \quad (7)$$

*m* étant défini par les expressions (8) et (9) ci-après :

$$\sum_{i=m}^{p} y_i \leq 0,1 \left(\sum_{i=1}^{p} y_i\right) \quad (8)$$

$$\sum_{i=m-1}^{p} y_i > 0,1 \left(\sum_{i=1}^{p} y_i\right) \quad (9)$$

$p$ = nombre de bandes divisant le chromatogramme,

$y_i$ = hauteur séparant la ligne de base du tracé du chromatogramme sur la bande *i*,

$M_i$ = la masse moléculaire sur la bande *i*.

L'essai n'est valable que si la valeur de $M_w$ obtenue pour la fraction dextran inférieure (10 pour cent) est de :

– 6000 à 8500 pour le *dextran 40 pour essai de performance SCR*,

– 7000 à 11 000 pour le *dextran 60/70 pour essai de performance SCR*.

DISTRIBUTION DE LA MASSE MOLÉCULAIRE DU DEXTRAN À ANALYSER

Injectez le volume choisi de solution à examiner. Calculez les valeurs de $M_w$ correspondant respectivement à la distribution de la masse moléculaire totale, à la fraction dextran supérieure (10 pour cent) et à la fraction dextran inférieure (10 pour cent) selon les indications données sous Validation du système chromatographique.

**01/2008:20240**

## 2.2.40. SPECTROPHOTOMÉTRIE DANS LE PROCHE INFRAROUGE

La spectrophotométrie dans le proche infrarouge (NIRS) est une technique aux applications vastes et variées en analyse pharmaceutique. Les spectres du proche infrarouge se situent dans la région comprise entre environ 780 nm et environ 2500 nm (environ 12 800 $cm^{-1}$ à environ 4000 $cm^{-1}$). Dans certains cas, les informations les plus utiles se trouvent dans la région comprise entre environ 1700 nm et environ 2500 nm (environ 6000 $cm^{-1}$ à environ 4000 $cm^{-1}$). Les spectres du proche infrarouge sont dominés par les bandes de résonances ou les résonances partielles C-H, N-H, O-H et S-H et des combinaisons de modes de vibration fondamentaux, et sont riches en informations si ces informations sont extraites à l'aide d'algorithmes chimiométriques appropriés. Les bandes du proche infrarouge sont beaucoup plus faibles que les vibrations fondamentales du moyen infrarouge dont elles sont issues. Les absorptivités molaires étant faibles dans le proche infrarouge, le rayonnement pénètre en général de plusieurs millimètres dans les matières, y compris les solides. En outre, de nombreuses matières comme le verre sont relativement transparentes dans cette région.

Outre les méthodes d'échantillonnage et essais classiques, les mesures peuvent être faites directement *in situ* sur des échantillons. Les spectres dans le proche infrarouge fournissent des informations physiques et chimiques, aussi bien qualitatives que quantitatives. Cependant, la comparaison directe du spectre obtenu avec la substance examinée avec un spectre de référence d'une substance chimique de référence, comme ceux utilisés en spectrophotométrie dans l'infrarouge, n'est pas appropriée. Un traitement mathématique des données, approprié et validé, est nécessaire.

Les applications de la NIRS sont très variées, que ce soit pour l'analyse chimique ou physique. Ces applications sont par exemple :

*analyse chimique*

– identification de substances actives, d'excipients, de formes pharmaceutiques, d'intermédiaires de fabrication, de matières premières chimiques et de matériaux d'emballage,

– quantification de substances actives et d'excipients, détermination d'indices chimiques comme l'indice d'hydroxyle, l'indice d'iode, l'indice d'acide, détermination de la teneur en eau, détermination du degré d'hydroxylation, contrôle de la teneur en solvants,

– contrôle du procédé.

*analyse physique*

– forme cristalline et cristallinité, polymorphisme, pseudopolymorphisme, taille des particules,

– étude des processus de dissolution et de désintégration, de la dureté,

– examen des propriétés d'un film,

– contrôle des procédés, comme par exemple la surveillance des mélanges et de la granulation.

Les mesures dans la région du proche infrarouge sont influencées par de nombreux facteurs chimiques et physiques comme décrit ci-après ; la reproductibilité et la pertinence des résultats dépendent du contrôle de ces facteurs et les mesures ne sont généralement valables que pour un modèle d'étalonnage défini.

APPAREILLAGE

Les spectrophotomètres dans le proche infrarouge sont utilisés pour enregistrer les spectres dans la région comprise entre environ 780 nm et environ 2500 nm (environ 12 800 $cm^{-1}$ à environ 4000 $cm^{-1}$). Toutes les mesures dans le proche infrarouge sont basées sur le passage de la lumière à travers un échantillon ou à l'intérieur d'un échantillon et la mesure

de l'atténuation du faisceau émergeant (transmis, diffusé ou réfléchi). Les spectrophotomètres adaptés à la mesure dans la région du proche infrarouge sont constitués par une source de lumière appropriée, un monochromateur ou un interféromètre. Les filtres photo-acoustiques modulables (AOTF), les prismes ou les réseaux constituent des monochromateurs courants. Des sources de lumière à haute intensité comme des lampes à quartz ou au tungstène ou des sources semblables sont utilisées. La source de lumière de la lampe au tungstène peut être hautement stabilisée. De nombreux appareils de NIRS sont donc conçus avec un faisceau unique. Le silicium, le sulfure de plomb, l'arséniure d'indium, l'arséniure d'indium-gallium, le tellurure de mercure et cadmium (MCT) et le sulfate de triglycine deutériée sont fréquemment utilisés comme matière constitutive du détecteur. Des porte-échantillons à cuves traditionnels, des sondes à fibres optiques, des cellules de transmission à immersion et des porte-échantillons rotatifs ou de va-et-vient sont quelques-uns des dispositifs courants d'accès à l'échantillon. Le choix doit se fonder sur l'application recherchée, en portant une attention particulière à la compatibilité entre le système d'échantillonnage et le type d'échantillon à analyser. Des unités appropriées de traitement et d'évaluation des données font en général partie de l'appareil.

## MÉTHODES DE MESURE

**Mesure en transmission**. La transmittance (*T*) est une mesure de la décroissance de l'intensité du rayonnement à des longueurs d'onde données après passage du rayonnement à travers l'échantillon. L'échantillon est traversé par le faisceau optique entre la source et le détecteur. La disposition est analogue à celle de nombreux spectrophotomètres conventionnels et le résultat peut être présenté directement en termes de transmittance (*T*) et/ou d'absorbance (*A*).

$T$ = $\frac{I}{I_0}$,

$I_0$ = intensité du rayonnement incident,

$I$ = intensité du rayonnement transmis,

$A$ = $-\log_{10} T = \log_{10}\left(\frac{1}{T}\right) = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right)$.

**Mesure en réflexion diffuse**. La mesure en réflexion diffuse fournit une mesure de la réflectance (*R*), rapport entre l'intensité de la lumière réfléchie par l'échantillon (*I*) et celle réfléchie par une surface réfléchissante de fond ou de référence ($I_r$). Le rayonnement dans le proche infrarouge peut pénétrer à une profondeur substantielle à l'intérieur de l'échantillon, ou il peut être absorbé par des combinaisons de vibrations et les résonances partielles des substances à analyser présentes dans l'échantillon. Le rayonnement non absorbé est réfléchi par l'échantillon vers le détecteur. Les spectres de la réflectance dans le proche infrarouge sont généralement obtenus par le calcul et la transposition graphique du log (1/*R*) en fonction de la longueur d'onde ou des nombres d'onde.

$R$ = $\frac{I}{I_r}$,

$I$ = intensité de la lumière réfléchie de manière diffuse par l'échantillon,

$I_r$ = intensité de la lumière réfléchie par la surface réfléchissante de fond ou de référence,

$A_R$ = $\log_{10}\left(\frac{1}{R}\right) = \log_{10}\left(\frac{I_r}{I}\right)$.

**Mesure en transflexion**. Cette mesure combine la transmittance et la réflectance. Lorsque la transflectance ($T^*$) est mesurée, on utilise un miroir ou une surface de réflectance diffuse pour réfléchir le rayonnement transmis à travers l'échantillon une seconde fois et ainsi doubler le parcours optique. Le rayonnement non absorbé est réfléchi par l'échantillon vers le détecteur.

$T^*$ = $\frac{I}{I_T}$,

$I_T$ = intensité du rayonnement transfléchi, sans échantillon,

$I$ = intensité du rayonnement transmis et réfléchi mesuré dans l'échantillon,

$A^*$ = $\log_{10}\left(\frac{1}{T^*}\right)$.

## PRÉPARATION/PRÉSENTATION DE L'ÉCHANTILLON

**Mesure en transmission**. La mesure de la transmittance (*T*) dépend du spectre de la transmittance de fond, nécessaire à son calcul. La référence de fond peut être l'air, une cellule vide, et un solvant consituant le blanc ou, dans des cas particuliers, un échantillon de référence. La méthode s'applique en général aux liquides, dilués ou non, aux dispersions, aux solutions et aux solides. En ce qui concerne la mesure de la transmittance des solides, un échantillon accessoire approprié doit être utilisé. Les échantillons sont examinés dans une cellule avec un parcours optique approprié (généralement 0,5-4 mm), transparente au rayonnement dans le proche infrarouge, ou par immersion d'une sonde à fibre optique de configuration appropriée, qui produit un spectre situé dans une zone de transmission compatible avec les spécifications de l'appareil et l'utilisation envisagée.

**Mesure en réflexion diffuse**. Cette méthode s'applique généralement aux solides. L'échantillon est examiné dans un dispositif approprié. Il est nécessaire de veiller à ce que les conditions de mesure soient aussi reproductibles que possible d'un échantillon à un autre. Si une sonde à fibre optique est immergée dans l'échantillon, il est nécessaire de positionner minutieusement la sonde pour garantir son immobilité lors de l'acquisition des spectres et de veiller à ce que les conditions de mesure soient aussi reproductibles que possible d'un échantillon à un autre. La radiation réfléchie par une référence de fond est balayée pour obtenir une ligne de base. La réflectance d'un ou de plusieurs échantillons à analyser est ensuite mesurée. Des carreaux de céramique, des polymères perfluorés ou l'or constituent des étalons de réflexion courants. D'autres matières appropriées peuvent être utilisées. Seuls des spectres mesurés par rapport à un fond possédant les mêmes propriétés optiques peuvent être directement comparés les uns aux autres. La taille des particules, l'eau d'hydratation et l'état de solvatation doivent être pris en compte.

**Mesure en transflexion**. Un réflecteur est placé derrière l'échantillon de façon à doubler le parcours optique. Cette configuration peut être adoptée pour partager une même géométrie d'appareillage avec les systèmes de réflectance et de sonde à fibre optique dans lesquels la source et le détecteur sont situés du même côté de l'échantillon. L'échantillon est examiné dans une cellule munie d'un miroir ou d'un réflecteur de diffusion approprié, métallique ou constitué d'une substance inerte (par exemple, du dioxyde de titane) qui n'absorbe pas dans la région du proche infrarouge.

## FACTEURS AFFECTANT LA RÉPONSE SPECTRALE

**Température de l'échantillon**. Ce paramètre est important pour les solutions aqueuses, dans lesquelles une différence de quelques degrés peut entraîner des modifications substantielles du spectre. La température est aussi un paramètre important pour les solides et les poudres contenant de l'eau.

**Humidité et résidus de solvants**. L'humidité et les résidus de solvants présents dans les échantillons sont responsables de bandes d'absorption significatives dans la région du proche infrarouge.

**Epaisseur de l'échantillon**. L'épaisseur de l'échantillon est une source avérée de variabilité du spectre et elle doit être comprise et/ou contrôlée. Par exemple, dans une mesure en réflexion, l'échantillon peut être d'épaisseur « infinie », ou des échantillons plus fins, d'épaisseur constante, doivent être accompagnés d'une matière stable à réflexion diffuse et à réflectivité constante et de préférence élevée.

**Propriétés optiques de l'échantillon**. En ce qui concerne les solides, il doit être tenu compte des propriétés de dispersion de surface et des propriétés de dispersion internes des échantillons. Les spectres d'échantillons présentant une hétérogénéité physique, chimique ou optique peuvent nécessiter l'établissement d'une moyenne en augmentant la taille du faisceau, ou en examinant des échantillons multiples, ou en faisant pivoter la sonde. Certains facteurs, comme un degré variable de compactage ou des tailles variables de particules dans les matières pulvérisées ou la finition de surface peuvent causer des différences significatives entre les spectres.

**Polymorphisme**. Les variations dans la structure cristalline (polymorphisme) influencent les spectres. Ainsi, les différentes formes cristallines et amorphe d'un solide peuvent être distinguées les unes des autres en se basant sur leurs spectres dans le proche infrarouge. Si des formes cristallines multiples sont présentes, il est nécessaire de veiller à ce que les échantillons utilisés pour l'étalonnage présentent une distribution des formes pertinente au vu de l'application envisagée.

**Age des échantillons**. Les propriétés chimiques, physiques ou optiques des échantillons peuvent changer avec le temps. Il est nécessaire de veiller à ce que les échantillons analysés dans le proche infrarouge soient représentatifs des échantillons utilisés pour l'étalonnage. Si des échantillons d'âges différents doivent être analysés, il faut tenir compte des différences potentielles de propriétés.

CONTRÔLE DE LA PERFORMANCE DE L'APPAREIL

Utilisez l'appareillage conformément aux instructions du fabricant et effectuez la vérification prescrite à intervalles réguliers, en fonction de l'utilisation de l'appareillage et des substances à examiner.

**Vérification de l'échelle de longueur d'onde (sauf appareils à filtre)**. Vérifiez l'échelle de longueur d'onde utilisée, située généralement dans la région comprise entre environ 780 nm et environ 2500 nm (environ 12 800 $cm^{-1}$ à environ 4000 $cm^{-1}$) ou dans la gamme de spectres prévue à l'aide d'un ou de plusieurs étalons de longueur d'onde appropriée qui présentent des maximums (minimums) caractéristiques pour les longueurs d'onde de la région concernée. De telles matières de référence appropriées sont, par exemple, le chlorure de méthylène ou un mélange d'oxydes de terres rares. Prenez un spectre ayant la même résolution spectrale que celle utilisée pour obtenir la valeur certifiée, et mesurez la position d'au moins 3 pics répartis sur l'intervalle utilisé. Les tolérances d'acceptabilité sont de ± 1 nm à 1200 nm, ± 1 nm à 1600 nm et ± 1,5 nm à 2000 nm (± 8 $cm^{-1}$ à 8300 $cm^{-1}$, ± 4 $cm^{-1}$ à 6250 $cm^{-1}$ et ± 4 $cm^{-1}$ à 5000 $cm^{-1}$). Pour la matière de référence utilisée, appliquez la tolérance relative à la longueur d'onde la plus proche (nombre d'onde) des valeurs ci-dessus pour chacun des pics utilisés. Pours les appareils à transformée de Fourier, l'étalonnage de l'échelle des nombres d'onde peut être effectué en utilisant une bande de la vapeur d'eau étroite à 7299,86 $cm^{-1}$ ou une bande étroite d'une matière certifiée. En ce qui concerne les oxydes de terres rares, la référence la plus appropriée est le NIST 1920 (a).

*Mesure en transmission*. Du *chlorure de méthylène R* sur un parcours optique de 1,0 mm peut être utilisé. Le chlorure de méthylène présente des bandes caractéristiques nettes à 1155 nm, 1366 nm, 1417 nm, 1690 nm, 1838 nm, 1894 nm, 2068 nm et 2245 nm. Utilisez les bandes à 1155 nm, 1417 nm, 1690 nm et 2245 nm pour l'étalonnage. D'autres étalons appropriés peuvent également être utilisés.

*Mesure en réflexion diffuse (réflectance)*. Un mélange d'oxydes de dysprosium, d'holmium et d'erbium (1+1+1 par masse) ou d'autres matières certifiées peut être utilisé. Cette matière de référence présente des pics caractéristiques à 1261 nm, 1681 nm et 1935 nm. S'il n'est pas possible d'utiliser des étalons solides externes et si les mesures de réflexion diffuse sont effectuées dans des cellules ou si des sondes à fibre optique sont utilisées, une suspension de 1,2 g d'*dioxyde de titane R* dans environ 4 mL de *chlorure de méthylène R*, agitée vigoureusement, est utilisée directement dans la cellule ou la sonde. Après 2 min, le spectre est enregistré. Le dioxyde de titane n'absorbe pas dans le proche infrarouge. Les spectres sont enregistrés avec une largeur de bande nominale maximum de l'appareil de 10 nm à 2500 nm (16 $cm^{-1}$ à 4000 $cm^{-1}$). La position d'au moins 3 pics répartis sur l'intervalle utilisé est mesurée. Les tolérances d'acceptabilité sont fournies dans le paragraphe Vérification de l'échelle de longueur d'onde. Pour la matière de référence utilisée, appliquez la tolérance relative à la longueur d'onde la plus proche (nombre d'onde) des valeurs figurant dans le paragraphe Vérification de l'échelle de longueur d'onde, pour chacun des pics utilisés.

**Vérification de la répétabilité de la longueur d'onde (sauf appareils à filtre)**. Vérifiez la répétabilité de la longueur d'onde à l'aide d'étalons appropriés. L'écart type de la longueur d'onde est conforme aux spécifications du fabricant de l'appareil.

**Vérification de la linéarité photométrique et de la stabilité de la réponse**. La vérification de la linéarité photométrique est démontrée à l'aide d'une série d'étalons de transmission ou de réflexion dont les valeurs en pourcentage de transmittance ou de réflectance sont connues. Pour les mesures de la réflectance, il existe des étalons polymériques dopés au carbone. Au moins 4 étalons de référence dans l'intervalle 10-90 pour cent, comme par exemple 10 pour cent, 20 pour cent, 40 pour cent et 80 pour cent, avec des valeurs d'absorbance respectives de 1,0, 0,7, 0,4 et 0,1 sont utilisés. Si le système est utilisé pour analyser des substances aux absorbances supérieures à 1,0, un étalon à 2 pour cent et/ou à 5 pour cent à la série d'étalons est ajouté. Portez sur un graphique les valeurs d'absorbance observées en fonction des valeurs d'absorbance de référence et analysez la régression linéaire. Les tolérances d'acceptabilité sont de 1,00 ± 0,05 pour la pente et de 0,00 ± 0,05 pour l'ordonnée à l'origine.

Les spectres obtenus à partir des étalons de réflectance peuvent subir des variations dues à la différence entre les conditions expérimentales dans lesquelles ils ont été étalonnés en usine et les conditions dans lesquelles ils sont ultérieurement utilisés. Ainsi, les valeurs de réflectance en pourcentage fournies avec une série d'étalons peuvent ne pas être utiles lors de l'établissement d'un étalonnage « absolu » pour un appareil donné. Cependant, tant que les étalons ne changent pas chimiquement ou physiquement et qu'un fond de référence identique à celui utilisé pour obtenir les valeurs certifiées est utilisé, des mesures ultérieures des mêmes étalons dans des conditions identiques, y compris le positionnement précis de l'échantillon, fournissent des informations concernant la stabilité à long terme de la réponse photométrique. Une tolérance de ± 2 pour cent est acceptable en ce qui concerne la stabilité à long terme ; cette vérification n'est nécessaire que si les spectres sont utilisés sans traitement préalable.

**Vérification du bruit photométrique**. Déterminez le bruit photométrique à l'aide d'un étalon approprié de réflectance, par exemple, des carreaux de céramique blanche ou des résines thermoplastiques réfléchissantes (PTFE, par exemple). Balayez l'étalon de réflexion sur toute la gamme de longueurs d'onde/nombres d'onde conformément aux recommandations du fabricant et calculez le bruit photométrique de pic à pic. La valeur est environ le double de l'écart type. Le bruit photométrique est conforme à la spécification du spectrophotomètre.

IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION (ANALYSE QUALITATIVE)

**Etablissement d'une bibliothèque de référence spectrale**. Enregistrez les spectres d'un nombre approprié de lots de la substance ayant été entièrement testés selon les spécifications établies et qui présentent la variation typique de cette substance (par exemple : fournisseur, format physique, taille des particules). La série de spectres obtenus représente la quantité d'informations relatives à l'identification et à la caractérisation qui définit les limites de similarité pour la substance et représente l'entrée de cette substance dans la bibliothèque spectrale utilisée pour l'identification. Le nombre de substances présentes dans la bibliothèque dépend de l'application spécifique, mais des bibliothèques trop importantes peuvent rendre difficiles la discrimination entre différentes matières et la validation. Tous les spectres dans la bibliothèque ont :

- un intervalle spectral et un nombre de données identiques,
- une même technique de mesure,
- un traitement préalable identique des données.

Si des sous-groupes (bibliothèques) sont créés, les critères ci-dessus doivent s'appliquer indépendamment pour chaque groupe. La collection des spectres présents dans la bibliothèque peut être représentée de plusieurs façons selon la technique mathématique utilisée pour l'identification. Il peut s'agir :

- de tous les spectres individuels représentant la substance,
- du spectre moyen de chaque lot de la substance,
- et, si nécessaire, d'une description de la variabilité parmi les spectres de la substance.

Les données électroniques brutes concernant la préparation de la bibliothèque spectrale doivent être archivées.

**Traitement préalable des données**. Dans de nombreux cas, en particulier pour les spectres des mesures en réflexion, un certain traitement mathématique préalable du spectre peut s'avérer utile avant la mise en place d'un modèle de classification ou d'étalonnage. L'objectif de ce traitement peut être, par exemple, de réduire les variations de la ligne de base, de réduire l'impact de variations connues interférant avec les modèles mathématiques ultérieurs, ou même de comprimer les données avant utilisation. Les méthodes typiques sont la correction multiplicative de dispersion MSC (*Multiplicative Scatter Correction*), les formules de Kubelka-Munk, les techniques de compression spectrale comme le fenêtrage ou la réduction du bruit et le calcul numérique des dérivées première et seconde du spectre. Les dérivées d'ordre supérieur ne sont pas recommandées. Dans certains cas, les spectres peuvent également être normalisés, par exemple en fonction de l'absorbance maximale, de l'absorbance moyenne ou de la surface d'absorbance intégrée sous le spectre.

Les transformations mathématiques doivent être effectuées avec précaution, car des artéfacts peuvent être introduits ou des informations essentielles (importantes pour les méthodes de qualification) perdues. Une compréhension de l'algorithme est exigée et dans tous les cas, la justification de l'utilisation d'une transformée doit être motivée.

**Evaluation des données**. La comparaison directe du spectre de la substance examinée se fait avec les spectres de référence individuels ou moyens de toutes les substances présentes dans la base de données en se fondant sur leur corrélation mathématique ou d'autres algorithmes appropriés. Une série de spectres moyens de référence connus et la variabilité autour de cette moyenne peuvent être utilisées avec un algorithme pour la classification. Il existe différents algorithmes basés sur l'ACP (analyse en composantes principales) combinée à l'analyse de groupement, la modélisation indépendante d'analogie de classe (SIMCA), les fonctions COMPARE utilisant des filtres ou l'UNEQ (*Unequal Dispersed Class*) et d'autres algorithmes utilisés dans le logiciel des appareils de NIRS ou fournis par les logiciels d'une tierce partie. La fiabilité de l'algorithme choisi pour une application particulière doit être validée. Par exemple, le coefficient de corrélation, la somme des carrés résiduels ou la distance par analyse de groupement doivent être conformes aux limites d'acceptabilité définies dans la procédure de validation.

**Validation de la base de données**

*Spécificité*. La sélectivité de la classification utilisant les spectres d'une base de données pour l'identification positive d'une matière donnée et pour la discrimination adéquate par rapport à d'autres matières présentes dans la base de données doit être établie lors de la procédure de validation. Des seuils d'acceptabilité doivent être établis. Des seuils élevés permettent un pouvoir discriminant élevé, mais risquent de causer des erreurs dues à la propre variabilité des matières. L'établissement de seuils moins élevés permet de résoudre ce problème, mais peut produire des résultats ambigus. Les matières d'épreuve potentielles doivent être comparées à la base de données spectrale. Ces matières peuvent être des matières reçues sur site qui sont semblables quant à leur aspect, leur structure chimique ou leur nom aux membres de la base de données. L'identification de ces matières d'épreuve doit être négative. L'analyse d'échantillons indépendants des matières présentes dans la base de données, mais n'ayant pas servi à son élaboration (lots ou mélanges différents) doivent fournir une identification positive.

*Robustesse*. La robustesse de la procédure qualitative doit également faire l'objet d'une épreuve pour tester l'effet de modifications mineures des conditions normales de fonctionnement sur l'analyse. Les paramètres des algorithmes d'étalonnage et de prétraitement ne doivent subir aucune modification. Des épreuves typiques sont :

- l'effet des différences entre les opérateurs sur les variations des conditions environnementales (par exemple, la température et l'humidité),
- l'effet de la température de l'échantillon, du positionnement de l'échantillon dans la fenêtre optique et de la profondeur de la sonde, de la compression/du tassement de la matière,
- les remplacements de composants de l'appareil ou de dispositifs de présentation des échantillons.

ANALYSE QUANTITATIVE

**Etablissement d'une bibliothèque de référence spectrale pour un modèle d'étalonnage**. L'étalonnage est le procédé consistant à construire un modèle mathématique permettant de lier la réponse d'un instrument d'analyse aux propriétés des échantillons. Tout algorithme d'étalonnage pouvant être clairement défini dans une expression mathématique exacte et donnant des résultats appropriés peut être utilisé. Enregistrez les spectres d'un nombre approprié d'échantillons aux teneurs connues à travers l'intervalle à mesurer (par exemple, la teneur en eau). Les longueurs d'onde utilisées dans le modèle d'étalonnage peuvent être comparées aux bandes connues de la substance à analyser et à celles de la matrice pour vérifier que les bandes de la substance à analyser sont utilisées par l'étalonnage. Etablissez le modèle d'étalonnage avec environ 2/3 des échantillons mesurés. Comparez le 1/3 restant des échantillons mesurés avec la base de données. Tous les échantillons doivent fournir des résultats quantitatifs situés dans l'intervalle de précision défini par l'utilisation envisagée de la méthode. Une quantification correcte doit être démontrée en présence de variations dans la matrice comprises dans l'intervalle spécifié. Les étalonnages par régression linéaire à variables multiples (MLR), par régression (PLS) et par régression en composantes principales (PCR) sont communément utilisés. Pour les étalonnages par PLS ou PCR, les coefficients ou les charges peuvent être portés sur un graphique et les régions des coefficients élevés comparées au spectre de la substance à analyser. Les données brutes relatives à la préparation du modèle d'étalonnage doivent être archivées, sans traitement préalable.

**Traitement préalable des données**. Le traitement préalable des données peut être défini comme la transformation mathématique des données des spectres de NIRS pour améliorer

les caractéristiques spectrales et/ou retirer ou réduire les sources indésirables de variation avant le développement du modèle d'étalonnage. Il existe de nombreux algorithmes appropriés relatifs au traitement préalable et à l'étalonnage des données. Le choix est basé sur la compatibilité avec l'utilisation envisagée. Le choix des longueurs d'onde peut permettre d'améliorer l'efficacité des modèles d'étalonnage tels que la MLR (dans la détermination de la taille des particules, par exemple). Dans certains cas, comme par exemple la détermination de l'eau d'hydratation, il est utile de supprimer certains intervalles de longueurs d'onde. La compression des longueurs d'onde peut être appliquée aux données.

**Paramètres de validation**. Les caractéristiques des performances analytiques à considérer pour démontrer la validation des méthodes de NIRS sont semblables à celles exigées pour toute procédure analytique. Les critères d'acceptabilité spécifiques pour chaque paramètre de validation doivent être compatibles avec l'utilisation envisagée de la méthode.

*Spécificité*. Le pouvoir discriminatoire relatif et la sélectivité concernant la détermination quantitative doivent concorder avec les indications figurant sous Analyse qualitative. La portée des essais de spécificité dépend de l'application et des risques à contrôler. Les variations dans les concentrations de la matrice au sein de l'intervalle de fonctionnement de la méthode ne doivent pas affecter la mesure quantitative de façon significative.

*Linéarité*. La validation de la linéarité implique la corrélation des résultats du NIRS calculés à partir des réponses dans le proche infrarouge avec les algorithmes utilisés avec les résultats de la méthode de référence répartis à travers l'intervalle défini du modèle d'étalonnage. Les réponses dans le proche infrarouge peuvent en fait être valides sans être linéaires.

*Intervalle*. L'intervalle des valeurs de référence de la substance à analyser définit l'intervalle de la méthode de NIRS et les limites de quantification de la méthode. Des contrôles doivent être mis en oeuvre pour garantir l'exclusion des résultats situés en dehors de l'intervalle validé.

*Exactitude*. L'exactitude peut être déterminée par comparaison avec la méthode de validation ou avec des échantillons connus (échantillons à blanc et quantités ajoutées de la substance examinée). L'exactitude peut être indiquée par l'erreur standard de prédiction (SEP) de la méthode de NIRS, qui doit être très proche des données de la méthode validée. La SEP est l'écart type des résidus obtenus en comparant les résultats de la NIRS avec les données analytiques de référence relatives aux échantillons spécifiés. L'exactitude est démontrée par la corrélation des résultats de la NIRS avec les données analytiques de référence, par comparaison de la SEP avec la méthode de référence utilisée pour la validation. D'autres méthodes statistiques de comparaison peuvent être utilisées pour comparer les résultats de la NIRS avec les valeurs de référence (test de *t* avec données appariées, évaluation du biais).

*Fidélité*. La fidélité exprime la proximité de concordance dans une série de mesures sous les conditions prescrites. Elle est évaluée par au minimum 6 mesures, effectuées conformément à la méthode analytique mise au point. La fidélité peut être envisagée à 2 niveaux, la répétabilité (mesures répétées d'un même échantillon avec ou sans variation du positionnement de l'échantillon) et la fidélité intermédiaire (mesures répétées par différents analystes, à différents jours de mesures).

*Robustesse*. La robustesse comprend les effets des variations de température et d'humidité, les effets de la manipulation des échantillons et l'influence des changements d'appareil.

*Résultats aberrants*. Des résultats aberrants issus des mesures par NIRS d'un échantillon contenant un élément à analyser se situant en dehors de l'intervalle d'étalonnage indiquent la nécessité d'effectuer des essais supplémentaires. Si les résultats d'essais supplémentaires effectués sur l'échantillon par une méthode analytique appropriée indiquent que le contenu de l'échantillon ne sort pas des spécifications, ces résultats peuvent être acceptés et l'échantillon peut être considéré comme conforme aux spécifications. Par conséquent, un résultat aberrant issu des mesures par NIRS de l'échantillon peut être conforme aux spécifications relatives à l'élément à analyser concerné.

ÉVALUATION CONTINUE DU MODÈLE

Les modèles de NIRS validés pour l'utilisation sont sujets à une évaluation continue des performances et à une surveillance des paramètres de validation. Si des divergences apparaissent, il est nécessaire de prendre des mesures correctives. Le degré de revalidation nécessaire dépend de la nature des modifications. La revalidation d'un modèle qualitatif sera nécessaire si une nouvelle matière est ajoutée à la bibliothèque de référence et pourra être nécessaire si un changement des propriétés physiques de la matière ou de la source d'approvisionnement a lieu. La revalidation d'un modèle quantitatif est nécessaire en cas de changement de la composition du produit fini, du procédé de fabrication ou des sources/qualités de matières premières.

TRANSFERT DES BASES DE DONNÉES

Si des bases de données sont transférées à un autre appareil, l'intervalle spectral, le nombre de données, la résolution spectrale et d'autres paramètres doivent être pris en considération. Des procédures et des critères supplémentaires doivent être appliqués pour démontrer le maintien de la validité du modèle avec la nouvelle base de données ou le nouvel appareil.

CONSERVATION DES DONNÉES

Conservez les spectres électroniques de NIRS, les bibliothèques et les données conformément aux réglementations en cours.

Conservez les spectres de NIRS avec le prétraitement nécessaire des données pour usage spécial (par exemple : l'identification, l'analyse de la taille des particules, la teneur en eau, etc.) conformément aux spécifications en cours.

**01/2008:20241**

## 2.2.41. DICHROÏSME CIRCULAIRE

Le dichroïsme circulaire est la propriété que possèdent les substances optiquement actives d'absorber différemment la lumière polarisée circulaire gauche et la lumière polarisée circulaire droite à une longueur d'onde donnée.

La mesure directe donne une valeur algébrique moyenne :

$$\Delta A = A_L - A_R$$

$\Delta A$ = absorbance circulaire dichroïque,

$A_L$ = absorbance de la lumière polarisée circulaire gauche,

$A_R$ = absorbance de la lumière polarisée circulaire droite.

Le dichroïsme circulaire s'exprime par l'équation :

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = \frac{\Delta A}{c \times l}$$

$\Delta\epsilon$ = dichroïsme circulaire molaire ou absorptivité dichroïque molaire différentielle, en litre·mole$^{-1}$·cm$^{-1}$,

$\epsilon_L$ = absorbance molaire (*2.2.25*) de la lumière polarisée circulaire gauche,

$\epsilon_R$ = absorbance molaire de la lumière polarisée circulaire droite,

$c$ = concentration de la solution à examiner, en mole·litre$^{-1}$,

$l$ = trajet optique de la cellule traversée, en centimètres.

Les unités suivantes sont également utilisées pour caractériser l'absorption dichroïque :

*Facteur de dissymétrie* :

$$g = \frac{\Delta\varepsilon}{\varepsilon}$$

$\epsilon$ = absorbance molaire (*2.2.25*).

*Ellipticité molaire* :

Certains instruments affichent directement la valeur de l'ellipticité Θ, exprimée en degrés. Lorsque ce type d'instrument est utilisé, l'ellipticité molaire [Θ] peut être calculée à l'aide de l'expression :

$$[\Theta] = \frac{\Theta \times M}{c \times l \times 10}$$

[Θ] = ellipticité molaire, exprimée en degrés·$cm^2$·décimole$^{-1}$,

Θ = ellipticité, lue sur l'instrument,

*M* = masse moléculaire relative de la substance à examiner,

*c* = concentration de la solution à examiner en grammes par millilitres,

*l* = trajet optique de la cellule traversée, en centimètres.

L'ellipiticité molaire peut être aussi obtenue à partir du dichroïsme molaire à l'aide de l'expression :

$$[\Theta] = 2,303\Delta\varepsilon\frac{4500}{\pi} \approx 3300\Delta\varepsilon$$

L'ellipticité molaire est habituellement utilisée pour l'analyse des protéines et des acides nucléiques. Dans ce cas, la concentration molaire est exprimée en résidu monomérique qui peut être calculé à l'aide de l'expression :

$$\frac{\text{masse moléculaire}}{\text{nombre d'acides aminés}}$$

La masse moyenne du résidu monomérique est de 100 à 120 (habituellement 115) pour une protéine et de 330 environ pour un mononucléotide sous forme de sel sodique.

**Appareillage**. La source de lumière (S) (figure 2.2.41.-1) est une lampe au xénon ; la lumière passe à travers un double monochromateur (M) équipé de prismes de quartz (P1, P2).

Le faisceau linéaire, issu du premier monochromateur, se divise en 2 composantes polarisées à angle droit, dans le deuxième monochromateur. La fente de sortie du monochromateur élimine le rayon extraordinaire.

La lumière monochromatique polarisée passe alors à travers un modulateur (Cr) biréfringent : le résultat est l'obtention d'une lumière circulaire alternée.

Le rayon lumineux passe alors à travers l'échantillon à analyser (C) et atteint un photomultiplicateur (PM) suivi d'un circuit amplificateur qui produit 2 signaux électriques : l'un est un courant continu $V_c$ et l'autre un courant alternatif à la fréquence de modulation $V_{ac}$ représentatif de l'échantillon à analyser. La phase donne le signe du dichroïsme circulaire. Le rapport $V_{ac}/V_c$ est proportionnel à l'absorption différentielle Δ*A* responsable du signal. La région des longueurs d'onde couvertes par un dichrographe est habituellement de 170 nm à 800 nm.

**Vérification de l'appareillage**

*Précision de l'échelle de dichroïsme circulaire*. Dissolvez 10,0 mg d'*isoandrostérone R* dans du *dioxane R*, et complétez à 10,0 mL avec le même solvant. Enregistrez le spectre du dichroïsme circulaire entre 280 nm et 360 nm. Mesurée au maximum à 304 nm, Δϵ est de + 3,3. La solution d'*acide (1S)-(+)-10-camphorsulfonique R* décrite ci-après peut également être utilisée.

*Linéarité de la modulation*. Dissolvez 10,0 mg d'*acide (1S)-(+)-10-camphorsulfonique R* dans de l'*eau R*, et complétez à 10,0 mL avec le même solvant. Déterminez la concentration exacte de la solution en acide (1*S*)-(+)-10-camphorsulfonique par spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet (*2.2.25*) en prenant 1,49 comme valeur de l'absorbance spécifique à 285 nm. Enregistrez le spectre de dichroïsme circulaire entre 185 nm et 340 nm.

Mesurée au maximum à 290,5 nm, Δϵ est de + 2,2 à + 2,5. Mesurée au maximum à 192,5 nm, Δϵ est de – 4,3 à – 5.

Le *(1S)-(+)* ou le *(1R)-(−)-10-camphorsulfonate d'ammonium R* peuvent également être utilisés.

**01/2010:20242**

## 2.2.42. MASSE VOLUMIQUE D'UN SOLIDE

La masse volumique (improprement appelée densité) d'un solide correspond à sa masse moyenne par unité de volume et est souvent exprimée en grammes par centimètre cube (g/$cm^3$), bien que l'Unité Internationale soit le kilogramme par mètre cube (1 g/$cm^3$ = 1000 kg/$m^3$).

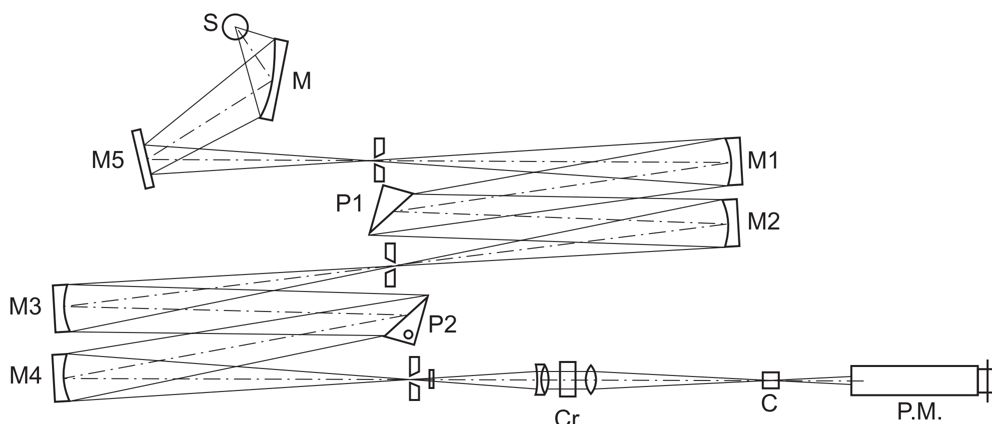



Figure 2.2.41.-1. – *Dispositif optique d'un dichrographe*

Contrairement aux gaz et aux liquides, pour lesquels la masse volumique ne dépend que de la température et de la pression, la masse volumique d'un solide dépend également de l'assemblage et, par conséquent, varie avec la structure cristalline et le degré de cristallinité.

Si un solide est amorphe, ou partiellement amorphe, sa masse volumique peut de plus, dépendre des conditions de sa préparation, des traitements ultérieurs et des conditions de sa conservation.

Par conséquent, à la différence des fluides, 2 solides chimiquement équivalents peuvent avoir une masse volumique différente, et cet écart reflète des différences dans la structure à l'état solide. La masse volumique des particules constituantes est une caractéristique physique importante des poudres pharmaceutiques.

La masse volumique d'une particule solide peut prendre des valeurs différentes selon la méthode utilisée pour mesurer le volume de cette particule. Il est utile de distinguer 3 niveaux d'expression de la masse volumique :

– la *masse volumique vraie*, qui ne prend en compte que la fraction solide du matériau ; dans le cas de matériaux cristallins, la masse volumique vraie est également appelée *masse volumique cristalline*,
– la *masse volumique particulaire*, qui prend également en compte les pores intraparticulaires,
– la *masse volumique vrac* qui prend en compte, de plus, le volume des espaces interparticulaires formés au sein du lit de poudre.

MASSE VOLUMIQUE VRAIE

La masse volumique vraie d'une substance est le rapport de la masse sur le volume de la maille cristalline élémentaire, à l'exclusion de tout vide non constitutionnel de l'arrangement moléculaire. Elle constitue une propriété intrinsèque de la structure cristalline spécifiée de la substance et est normalement, à ce titre, indépendante de la méthode de détermination utilisée. La masse volumique vraie est déterminée par le calcul.

Elle est déterminée à partir des données cristallographiques (volume et composition de la maille cristalline élémentaire), obtenues par exemple par diffraction X, soit sur un monocristal soit par décomposition de la structure cristalline à partir des données de diffraction X sur poudre.

MASSE VOLUMIQUE PARTICULAIRE

La masse volumique particulaire prend à la fois en compte la masse volumique vraie et la porosité intraparticulaire (pores fermés et/ou pores ouverts non-accessibles). Elle dépend par conséquent de la valeur du volume déterminé, qui est lui-même fonction de la méthode de détermination utilisée. La masse volumique particulaire peut être déterminée par l'une des 2 méthodes suivantes.

La *masse volumique par pycnométrie à gaz* est déterminée par mesure du volume occupé par une masse connue de poudre, par équivalence avec le volume de gaz déplacé par la poudre dans un pycnomètre à déplacement de gaz (*2.9.23*). Dans les mesures de la masse volumique par pycnométrie à gaz, le volume déterminé exclut le volume occupé par les pores ouverts mais comprend le volume occupé par les pores fermés ou non accessibles au gaz. En raison de la très grande diffusibilité de l'hélium, qui est le gaz utilisé de préférence, la plupart des pores ouverts sont accessibles au gaz, de sorte que la masse volumique par pycnométrie à gaz d'une poudre finement broyée diffère généralement peu de la masse volumique vraie. Par conséquent, cette masse volumique est la meilleure façon d'apprécier la masse volumique vraie d'un échantillon partiellement cristallin. Cette technique est largement applicable à des échantillons de poudre traitées à des fins pharmaceutiques.

Dans la *masse volumique par porosimétrie au mercure*, également appelée *masse volumique granulaire*, le volume déterminé comprend la contribution des pores fermés et des pores inaccessibles au mercure. Il comprend toutefois le volume des pores ouverts de taille inférieure à une valeur limite. Cette taille limite des pores, ou diamètre minimal d'accès, est fonction de la pression maximale d'intrusion du mercure appliquée au cours de la mesure. Aux pressions de travail normales, le mercure ne pénètre pas dans les pores de très petite taille qui sont accessibles à l'hélium. Pour un même échantillon, plusieurs valeurs de la masse volumique granulaire peuvent être obtenues puisque, pour chaque pression d'intrusion appliquée, une masse volumique qui correspond au diamètre minimal d'accès sous cette pression peut être déterminée.

MASSE VOLUMIQUE VRAC ET MASSE VOLUMIQUE APRÈS TASSEMENT

La masse volumique vrac d'une poudre inclut la contribution des espaces interparticulaires. Elle dépend par conséquent à la fois de la masse volumique des particules et de leur arrangement spatial dans le lit de poudre.

La masse volumique vrac d'une poudre est souvent difficile à mesurer avec une bonne reproductibilité, car la plus légère perturbation du lit peut entraîner une variation de masse volumique. Il est donc essentiel de préciser, avec toute mesure de masse volumique vrac, comment la détermination a été effectuée.

La masse volumique vrac et la masse volumique après tassement sont déterminées tel que mentionné dans le chapitre *2.9.34. Masse volumique vrac et masse volumique après tassement*.

**01/2008:20243**

# 2.2.43. SPECTROMÉTRIE DE MASSE

La spectrométrie de masse est fondée sur la mesure directe du rapport de la masse au nombre de charges élémentaires ($m/z$), positives ou négatives, d'ions en phase gazeuse obtenus à partir de la substance à analyser. Ce rapport est exprimé en unités de masse atomique (1 u.m.a. = le douzième de la masse du $^{12}C$) ou en daltons (1 Da = la masse de l'atome d'hydrogène).

Les ions, formés dans la *source* de l'appareil, sont accélérés, puis séparés par l'*analyseur* avant d'atteindre le *détecteur*. L'ensemble de ces opérations s'effectue dans une enceinte où est maintenu, grâce à un groupe de pompage, un vide de $10^{-3}$ à $10^{-6}$ Pa.

Le spectre obtenu représente l'abondance relative des différentes espèces ioniques présentes, comme une fonction de $m/z$. Le signal correspondant à un ion comporte plusieurs pics correspondant à la distribution statistique des différents isotopes qui le constituent. On parle de *profil isotopique* et, au moins dans le cas des molécules de petite taille, le pic correspondant aux isotopes les plus abondants de chaque atome est appelé *pic monoisotopique*.

Les informations obtenues en spectrométrie de masse sont qualitatives (détermination de la masse moléculaire, informations sur la structure au vu des fragments observés) ou quantitatives (au moyen de références internes ou externes) avec des limites de détection respectives allant de la picomole à la femtomole.

INTRODUCTION DES ÉCHANTILLONS

La toute première étape d'une analyse consiste à introduire l'échantillon dans l'appareil sans trop affecter le vide établi. Dans la méthode la plus classique, appelée *introduction liquide directe*, l'échantillon est déposé à l'extrémité d'une canne cylindrique (dans un creuset en quartz, sur un filament ou encore sur une surface métallique). Cette canne est introduite dans le spectromètre après avoir traversé un sas où est maintenu un vide primaire intermédiaire entre la pression atmosphérique et le vide secondaire de l'appareil.

D'autres systèmes d'introduction permettent d'analyser en ligne les constituants d'un mélange au fur et à mesure qu'ils sont séparés par un appareillage approprié relié au spectromètre de masse :

**Couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse**. L'utilisation de colonnes appropriées (capillaires ou semi-capillaires) permet d'introduire directement l'extrémité de la colonne dans la source de l'appareil sans utiliser de séparateur.

**Couplage chromatographie en phase liquide/spectrométrie de masse**. Ce couplage est particulièrement utile pour l'analyse de composés polaires, insuffisamment volatils ou thermiquement trop instables pour être analysés par couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse. La difficulté dans sa mise en oeuvre réside dans l'obtention d'ions en phase gazeuse à partir d'une phase liquide, ce qui nécessite des interfaces très spécifiques telles que :

– *introduction liquide directe* : la phase mobile est nébulisée, et le solvant est évaporé à l'entrée de la source de l'appareil,

– *interface à faisceau de particules* : la phase mobile, dont le débit peut atteindre 0,6 mL/min, est nébulisée dans une chambre de désolvatation, de façon que seuls les analytes, sous forme neutre, atteignent la source de l'appareil ; cette technique s'applique à des composés relativement peu polaires et de masse moléculaire inférieure à 1000 Da,

– *interface à ruban continu* : la phase mobile, dont le débit peut atteindre 1 mL/min, est déposée à la surface d'une courroie mobile ; après évaporation du solvant, les composés à analyser sont ainsi entraînés successivement dans la source de l'appareil où ils sont ionisés ; cette technique est relativement mal adaptée aux composés très polaires ou thermosensibles.

D'autres types de couplage (l'électrospray, le thermospray et l'ionisation chimique à pression atmosphérique) considérés comme des techniques d'ionisation à part entière, sont décrits sous Modes d'ionisation.

**Couplage chromatographie en phase supercritique/spectrométrie de masse**. La phase mobile, constituée généralement de dioxyde de carbone à l'état supercritique, est volatilisée par passage dans un restricteur chauffé, situé entre la colonne et la source d'ions.

**Couplage électrophorèse capillaire/spectrométrie de masse**. L'éluant est introduit dans la source après addition éventuelle d'un autre solvant permettant d'atteindre des débits de l'ordre de quelques microlitres par minute. Les limitations de cette technique tiennent notamment aux faibles quantités d'échantillon introduites et à l'obligation d'utiliser des tampons volatils.

MODES D'IONISATION

**Impact électronique**. L'échantillon, à l'état gazeux, est ionisé par un faisceau d'électrons dont l'énergie (le plus souvent 70 eV) est supérieure au potentiel d'ionisation de l'échantillon. On observe, en même temps que l'ion moléculaire radicalaire $M^+$, des fragments caractéristiques de sa structure. La principale limitation de cette technique réside dans la nécessité de vaporiser l'échantillon. Aussi est-elle mal adaptée aux composés polaires, thermolabiles, ou de masse moléculaire élevée. L'impact électronique est compatible avec le couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse, et parfois, avec l'utilisation de la chromatographie liquide.

**Ionisation chimique**. L'ionisation fait ici intervenir un gaz réactif tel que le méthane, l'ammoniac, le monoxyde d'azote, le dioxyde d'azote ou l'oxygène. Le spectre se caractérise par des ions de type $(M + H)^+$ ou $(M - H)^-$, ou encore des ions adduits formés entre l'analyte et le gaz utilisé. Il présente des fragments moins abondants qu'avec la technique de l'impact électronique. Dans le cas où le produit est thermolabile, il existe une variante de cette technique : l'échantillon, déposé sur un filament, est vaporisé très rapidement par effet Joule-Thomson (ionisation chimique par désorption).

**Ionisation par bombardement d'atomes rapides (« fast atom bombardment », FAB) ou d'ions rapides (« liquid secondary ion mass spectrometry », LSIMS)**. L'échantillon, dissous dans une matrice visqueuse telle le glycérol, est déposé sur une surface métallique, puis ionisé par un faisceau d'atomes neutres tels que l'argon ou le xénon ou d'ions césium d'énergie cinétique élevée. Il en résulte la formation d'ions de type $(M + H)^+$, $(M - H)^-$ ou encore des adduits provenant de la matrice ou de l'échantillon. Ce mode d'ionisation, bien adapté aux composés polaires et thermolabiles, permet d'atteindre des masses moléculaires jusqu'à 10 000 Da. Il est possible de réaliser le couplage avec la chromatographie liquide en ajoutant 1-2 pour cent de glycérol dans la phase mobile : les débits doivent toutefois rester très faibles (quelques microlitres par minute). Ces techniques d'ionisation permettent également d'analyser des plaques de chromatographie sur couche mince en déposant à leur surface une fine couche de matrice.

**Désorption de champ et ionisation de champ**. L'échantillon est volatilisé au voisinage d'un filament de tungstène revêtu de microaiguilles (*ionisation de champ*) ou déposé sur ce même filament (*désorption de champ*). La tension, d'environ 10 kV, appliquée entre ce filament et une contre-électrode, permet d'ioniser l'échantillon. Ces deux techniques donnent principalement des ions moléculaires radicalaires $M^+$ et de type $(M + H)^+$, et s'appliquent aux composés peu polaires et/ou thermolabiles.

**Ionisation par désorption laser (« matrix-assisted laser desorption ionisation », MALDI)**. L'échantillon, inclus dans une matrice appropriée, et déposé sur un support métallique, est ionisé par un faisceau laser pulsé dont la longueur d'onde peut aller de l'UV à l'IR (impulsions d'une picoseconde à quelques nanosecondes). Ce mode d'ionisation joue un rôle essentiel pour l'analyse de composés de très haute masse moléculaire (au-delà de 100 000 Da) mais il est limité aux analyseurs à temps de vol (voir ci-après).

**Electrospray**. Ce mode d'ionisation se fait à pression atmosphérique. Les échantillons sont introduits dans la source en solution par l'intermédiaire d'un capillaire dont l'extrémité est portée à un potentiel de l'ordre de 5 kV. La nébulisation peut être assistée par un gaz. Il en résulte la formation de microgouttelettes qui conduisent, par désolvatation, à des ions mono- ou polychargés en phase gazeuse. Les débits varient de quelques microlitres par minute à 1 mL/min. Cette technique est adaptée aux composés polaires et à l'étude de biomolécules de masse moléculaire pouvant atteindre 100 000 Da, de même qu'à la mise en oeuvre du couplage avec la chromatographie liquide ou l'électrophorèse capillaire.

**Ionisation chimique à pression atmosphérique (« atmospheric-pressure chemical ionisation », APCI)**. L'ionisation se fait à pression atmosphérique, par l'action d'une électrode portée à un potentiel de plusieurs kilovolts et placée dans le trajet de la phase mobile qui est nébulisée à la fois par effet thermique et par l'utilisation d'un courant d'azote. Les ions obtenus sont monochargés, de type $(M + H)^+$ en mode positif et de type $(M - H)^-$ en mode négatif. Les débits élevés compatibles avec ce mode d'ionisation (jusqu'à 2 mL/min) en font une technique de choix pour la mise en oeuvre du couplage avec la chromatographie liquide.

**Thermospray**. L'échantillon, dissous dans une phase mobile composée d'eau et de modificateurs organiques, et contenant un électrolyte volatil (généralement de l'acétate d'ammonium), est introduit sous forme de nébulisat par passage à travers un capillaire métallique régulé en température. Les débits acceptables sont de l'ordre de 1 mL/min à 2 mL/min. Les ions de l'électrolyte ionisent les composés à analyser. Ce processus d'ionisation peut être remplacé ou assisté par une décharge électrique d'environ 800 volts, notamment dans le cas où

les solvants sont totalement organiques. Cette technique est compatible avec l'utilisation du couplage chromatographie liquide/spectrométrie de masse.

ANALYSEURS

Les différences dans leurs performances respectives tiennent essentiellement à deux paramètres :

– le domaine dans lequel les rapports *m/z* peuvent être mesurés ou *gamme de masse*,
– leur *pouvoir de résolution* caractérisé par la capacité à séparer deux ions d'égale intensité de rapports *m/z* différant de $\Delta M$, qui se recouvrent à un pourcentage donné de la « vallée » : par exemple, un pouvoir de résolution $M/\Delta M$ de 1000, à 10 pour cent de la vallée, permet de séparer les rapports *m/z* 1000 et 1001 avec un retour à 10 pour cent au-dessus de la ligne de base. Cependant, dans certains cas (analyseurs à temps de vol, quadrupôles, pièges à ions) le pouvoir de résolution est parfois défini comme étant le rapport entre la masse moléculaire et la largeur du pic à mi-hauteur (définition à 50 pour cent de la vallée).

**Analyseurs magnétiques et électrostatiques**. Les ions formés dans la source sont accélérés par une tension électrique *V*, puis focalisés vers un analyseur magnétique (champ magnétique *B*) ou un analyseur électrostatique (champ électrostatique *E*), selon la configuration de l'instrument. Ils décrivent une trajectoire de rayon *r* qui obéit à la loi de Laplace :

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2V}$$

Deux types de balayage peuvent être utilisés pour collecter et mesurer l'ensemble des ions formés dans la source : balayage de *B* pour *V* fixe ou balayage de *V* pour *B* constant. L'analyseur magnétique est généralement suivi d'un secteur électrostatique qui joue le rôle d'un filtre en énergie cinétique et permet d'augmenter sensiblement le pouvoir de résolution de l'appareil. Le pouvoir de résolution maximal d'un appareil de ce type, dit à « double secteur » varie de 10 000 à 150 000 et permet dans la plupart des cas de déterminer la valeur des rapports *m/z* avec une précision suffisante pour calculer la composition élémentaire des ions correspondants. La gamme de masse varie entre 2000 Da et 15 000 Da pour des ions monochargés. Certains ions peuvent se décomposer, spontanément (transitions métastables) ou par collision avec un gaz (décompositions bimoléculaires), entre la source et le détecteur dans des régions dites libres de champ. Leur étude se révèle fort intéressante, tant sur le plan structural que pour caractériser un composé particulier au sein d'un mélange, et fait appel à la double spectrométrie de masse. Il existe une multitude de techniques de ce type, selon la région où se produisent ces décompositions :

– *mode fils* (détermination des ions de décomposition d'un ion parent sélectionné) : $B/E$ = constante, *MIKES (« Mass-analysed Ion Kinetic Energy Spectroscopy » ),*
– *mode parent* (détermination de tous les ions qui par décomposition donnent un ion de rapport *m/z* particulier) : $B^2/E$ = constante,
– *mode perte de neutre* (détection de tous les ions qui perdent un fragment identique) :

  $B/E(1 - E/E_0)^{1/2}$ = constante, où $E_0$ est la tension de base du secteur électrostatique.

**Quadrupôles**. L'analyseur est constitué de quatre barreaux métalliques parallèles, de section cylindrique ou hyperbolique, disposés de façon symétrique par rapport à l'axe du trajet des ions, et connectés électriquement deux à deux en diagonale par rapport à l'axe de symétrie des barreaux. Les potentiels appliqués à chaque paire de barreaux sont opposés. Ils sont la résultante d'une composante continue et d'une composante alternative. La transmission et la séparation des ions formés dans la source se fait en faisant varier les tensions appliquées sur les barreaux, de façon que le rapport tension continue/tension alternative reste constant. Les quadrupôles ont généralement une gamme de masse allant de 1 u.m.a. à 2000 u.m.a., mais certains peuvent atteindre 4000 u.m.a. D'un pouvoir de résolution plus faible que les analyseurs à secteur magnétique, ils permettent néanmoins d'obtenir le profil monoisotopique d'ions monochargés dans toute la gamme de masse. Il est possible d'obtenir des spectres en disposant trois quadrupôles en série, $Q_1$, $Q_2$, $Q_3$. $Q_2$ joue ici le rôle de cellule de collision et n'est pas à proprement parler un analyseur. Le gaz de collision le plus couramment utilisé est l'argon.

Les types de balayage les plus couramment utilisés sont les suivants :

– le *mode fils* : $Q_1$ sélectionne un ion *m/z* dont les fragments obtenus par collision dans $Q_2$ sont analysés par $Q_3$,
– le *mode parent* : $Q_3$ ne filtre qu'un rapport *m/z* particulier, tandis que $Q_1$ balaye une gamme de masse déterminée ; seuls les ions se décomposant pour donner l'ion sélectionné par $Q_3$ seront détectés,
– le *mode perte de neutre* : $Q_1$ et $Q_3$ balayent une certaine gamme de masse mais avec un décalage correspondant à la perte d'un fragment caractéristique d'un produit ou d'une famille de composés.

Il est également possible d'obtenir des spectres en combinant des analyseurs quadrupolaires à des appareils à secteur magnétique ou électrostatique ; on parle dans ce cas de *spectromètres de masse hybrides.*

**Analyseur à piège d'ions**. Le principe est le même que pour un quadrupole, les champs électriques étant cette fois appliqués dans les trois directions de l'espace. Ce type d'analyseur permet d'obtenir des spectres de décomposition sur plusieurs générations ($MS^n$).

**Analyseurs à résonance cyclotronique**. Les ions, formés dans une cellule, sont contraints, sous l'action d'un champ magnétique homogène et intense, à décrire un mouvement circulaire dont la fréquence peut être directement corrélée à leur rapport *m/z* par un traitement mathématique par transformée de Fourier. Il s'agit de la résonance cyclotronique. Ce type d'analyseur est constitué d'aimants supraconducteurs et permet d'obtenir des pouvoirs de résolution très élevés (jusqu'à 1000 000 et plus), de même que des spectres $MS^n$. Toutefois, ils nécessitent des pressions très faibles (de l'ordre de $10^{-7}$ Pa).

**Analyseurs à temps de vol**. Les ions formés dans la source sont accélérés sous une tension *V* de 10 kV à 20 kV. Ils traversent l'analyseur, constitué d'un tube de 25 cm à 1,5 m dans lequel ne règne aucun champ électrique, communément appelé *tube de vol.* Le temps (*t*) que mettent les ions pour atteindre le détecteur est proportionnel à la racine carré du rapport *m/z*. En théorie, la gamme de masse d'un tel analyseur est infinie. En pratique, elle est limitée par la méthode d'ionisation ou de désorption associée. Les analyseurs à temps de vol sont surtout utilisés pour les composés de haute masse moléculaire (pouvant atteindre plusieurs centaines de milliers de daltons). Cette technique se révèle très sensible (quelques picomoles de produit suffisent). La précision des mesures et le pouvoir de résolution d'un tel appareillage peuvent être très nettement améliorés au moyen d'un miroir électrostatique (réflectron).

ACQUISITION DU SIGNAL

Il y a essentiellement trois modes d'acquisition possibles.

**Mode spectre complet**. La totalité du signal obtenu dans une gamme de masse choisie est enregistrée. Le spectre représente l'intensité relative des différentes espèces ioniques présentes en fonction de *m/z*. Les résultats sont essentiellement de nature qualitative. L'utilisation de bibliothèques de spectres de référence pour une identification plus rapide est possible.

**Mode fragmentométrique(« single ion monitoring », SIM, ou « multiple ion monitoring », MIM)**. L'acquisition du signal est restreinte à un (SIM) ou plusieurs (MIM) ions caractéristiques de la ou des substances à analyser. Ce mode permet de diminuer sensiblement le seuil de détection. Des études quantitatives ou

semi-quantitatives peuvent être réalisées au moyen de standards internes ou externes (étalons deutériés, etc.). De telles analyses ne peuvent être réalisées avec des analyseurs à temps de vol.

**Mode fragmentométrique en double spectrométrie de masse (« multiple reaction monitoring », MRM)**. Il s'agit dans ce cas de suivre spécifiquement la décomposition unimoléculaire ou bimoléculaire d'un ion précurseur choisi, caractéristique de la substance à analyser. La sélectivité et le caractère hautement spécifique de ce mode d'acquisition permettent d'atteindre d'excellents niveaux de sensibilité et en font la technique la mieux adaptée aux études quantitatives par l'intermédiaire de standards internes appropriés (étalons deutériés, etc.). Ce type d'analyse n'est réalisable qu'à l'aide d'appareils équipés de trois quadrupôles en série, d'analyseurs à piège d'ions ou à résonance cyclotronique.

ÉTALONNAGE

L'étalonnage permet d'attribuer au signal détecté la valeur du rapport *m/z* correspondante. En règle générale, il se fait à l'aide d'un produit de référence. Cet étalonnage peut être externe (fichier d'acquisition distinct de l'analyse) ou interne (le ou les produits de référence sont mélangés au composé à analyser et apparaissent sur le même fichier d'acquisition). Le nombre d'ions ou de points nécessaires pour obtenir un étalonnage fiable dépend du type d'analyseur et de la précision de la mesure que l'on veut obtenir : par exemple, dans le cas d'un analyseur magnétique, où le rapport *m/z* varie de façon exponentielle avec la valeur du champ magnétique, il convient d'avoir le plus de points possible.

DÉTECTION DU SIGNAL ET TRAITEMENT DES DONNÉES

Les ions séparés par l'analyseur, sont convertis par un système de détection tel qu'un photomultiplicateur ou un multiplicateur d'électrons, en signaux électriques, qui sont amplifiés avant d'être à nouveau convertis en signaux numériques, permettant le traitement informatique des données incluant des fonctions aussi diverses que l'étalonnage, la reconstruction des spectres, la quantification automatique, l'archivage, la création ou l'utilisation de banques de données spectrales. Les différents paramètres physiques nécessaires au fonctionnement de l'ensemble de l'appareil sont gérés par ordinateur.

**01/2008:20244**

## 2.2.44. CARBONE ORGANIQUE TOTAL DANS L'EAU POUR USAGE PHARMACEUTIQUE

Le dosage du carbone organique total (COT) est une méthode de mesure indirecte des substances organiques présentes dans l'eau pour usage pharmaceutique. Cette méthode peut également servir à contrôler le déroulement de diverses opérations intervenant dans la préparation des médicaments.

Il existe plusieurs méthodes acceptables pour la détermination du COT. Plutôt que de prescrire une méthode particulière, le présent chapitre général décrit les procédures à suivre pour qualifier la méthode choisie et interpréter les résultats dans le cadre d'un essai limite. Une solution étalon est analysée à intervalles réguliers, déterminés en fonction de la fréquence des mesures. Cette solution est préparée avec une substance présumée facilement oxydable (par exemple, le saccharose), à concentration telle que la réponse instrumentale obtenue corresponde à la limite de teneur en COT fixée. La conformité du système est vérifiée au moyen d'une solution préparée avec une substance présumée difficilement oxydable (par exemple la 1,4-benzoquinone).

Tous les types d'appareils utilisés pour mesurer le COT contenu dans l'eau pour usage pharmaceutique reposent sur le même principe : oxydation complète en dioxyde de carbone des molécules organiques contenues dans l'échantillon d'eau, puis analyse quantitative du dioxyde de carbone produit et, à partir de la valeur obtenue, détermination par le calcul de la teneur en carbone de l'eau.

L'appareil utilisé doit permettre de différencier le carbone organique du carbone inorganique, présent sous forme de carbonate. Deux approches sont possibles : soit mesurer le carbone inorganique et déduire le résultat de la teneur en carbone total, soit éliminer de l'échantillon le carbone inorganique présent avant de procéder à l'oxydation. Certaines molécules organiques peuvent également être entraînées au cours de cette opération, mais l'eau pour usage pharmaceutique ne contient que des quantités négligeables de carbone organique susceptible d'être ainsi co-éliminé.

*Appareillage.* Utilisez un appareil étalonné, installé en ligne ou autonome. A intervalles de temps appropriés, vérifiez la conformité du système comme décrit ci-après. La limite de détection de l'appareil, spécifiée par le fabricant, doit être inférieure ou égale à 0,05 mg de carbone par litre.

*Eau COT.* Utilisez de l'eau hautement purifiée satisfaisant aux spécifications suivantes :

– conductivité : inférieure ou égale à 1,0 $\mu S{\cdot}cm^{-1}$ à 25 °C,
– carbone organique total : teneur inférieure ou égale à 0,1 mg/L.

Selon le type d'appareil utilisé, les teneurs en métaux lourds et en cuivre peuvent être des facteurs critiques. Il convient de se conformer aux instructions du fabricant.

*Préparation de la verrerie.* Nettoyez soigneusement la verrerie par une méthode permettant d'éliminer les matières organiques. Utilisez de l'*eau COT* pour la phase finale de rinçage.

*Solution étalon.* Dissolvez du *saccharose R*, préalablement séché à 105 °C pendant 3 h, dans de l'*eau COT* de façon à obtenir une solution à 1,19 mg de saccharose par litre (0,50 mg de carbone par litre).

*Solution à examiner.* Recueillez l'eau à examiner dans un récipient étanche, en prenant toutes les précautions requises pour éviter une contamination et en laissant un espace de tête aussi réduit que possible. Procédez à l'analyse dès que possible afin de réduire les risques de contamination par le récipient et le dispositif de fermeture.

*Solution de conformité du système.* Dissolvez de la *1,4-benzoquinone R* dans de l'*eau COT* de façon à obtenir une solution à 0,75 mg de 1,4-benzoquinone par litre (0,50 mg de carbone par litre).

*Témoin eau COT.* Utilisez de l'*eau COT* préparée en même temps que celle employée pour préparer la solution étalon et la solution de conformité du système.

*Solutions témoins.* En plus du *témoin eau COT*, préparez des solutions à blanc appropriées ou toutes autres solutions requises pour établir la ligne de base ou procéder à l'étalonnage suivant les instructions du fabricant. Utilisez les blancs appropriés pour régler le zéro de l'appareil.

*Conformité du système.* Examinez les solutions suivantes et notez les réponses respectivement obtenues : *eau COT* ($r_w$), *solution étalon* ($r_s$), *solution de conformité du système* ($r_{ss}$). Calculez l'efficacité du système en pourcentage, à l'aide de l'expression :

$$\frac{r_{ss} - r_w}{r_s - r_w} \times 100$$

Le système n'est conforme que si la valeur obtenue n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la valeur théorique.

*Mode opératoire.* Mesurez la réponse ($r_u$) du système pour la solution à examiner. La solution à examiner satisfait à l'essai si $r_u$ n'est pas supérieur à $r_s - r_w$.

La mesure peut également être réalisée avec un appareil installé en ligne, convenablement étalonné et satisfaisant à l'essai de conformité du système. L'emplacement de l'appareil doit être choisi de telle sorte que les résultats obtenus soient représentatifs de l'eau utilisée.

**01/2008:20245**

# 2.2.45. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE SUPERCRITIQUE

La chromatographie en phase supercritique (CPS) est une technique de séparation chromatographique où la phase mobile est un fluide porté à l'état supercritique ou subcritique. La phase stationnaire, contenue dans une colonne, peut être constituée de particules solides de granulométrie fine (silice ou graphite poreux par exemple), ou être chimiquement modifiée comme les phases utilisées en chromatographie liquide, ou, pour les colonnes capillaires, être constituée d'un film liquide réticulé recouvrant uniformément les parois de la colonne.

La CPS est fondée sur des mécanismes d'adsorption ou de distribution de masse.

## APPAREILLAGE

L'appareillage se compose généralement d'un système de pompage réfrigéré, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique placée dans un four, d'un détecteur, d'un régulateur de pression et d'un système d'acquisition des données (ou d'un intégrateur ou enregistreur).

**Systèmes de pompage**

Les systèmes de pompage doivent fournir la phase mobile à un débit constant. Il convient de limiter autant que possible les fluctuations de pression, par exemple en faisant passer le solvant sous pression à travers un dispositif amortissant les pulsations. Les tubes et raccords doivent pouvoir résister aux pressions développées par la pompe.

Les systèmes pilotés par microprocesseur sont capables de délivrer avec précision une phase mobile dans des conditions constantes ou variables, selon un programme défini. Pour les chromatographies à gradient d'élution, il existe des systèmes de pompage qui délivrent le(s) solvant(s) à partir de plusieurs réservoirs, le mélange pouvant être effectué soit en amont (basse-pression) soit en aval (haute-pression) de la (des) pompe(s).

**Injecteurs**

L'injection peut être effectuée directement en tête de colonne au moyen d'une vanne.

**Phases stationnaires**

Les phases stationnaires sont contenues dans des colonnes de même type que celles décrites dans les chapitres *Chromatographie liquide* (*2.2.29*) (colonnes remplies) et *Chromatographie en phase gazeuse* (*2.2.28*) (colonnes capillaires). Une colonne capillaire a un diamètre intérieur (Ø) maximal de 100 µm.

**Phases mobiles**

La phase mobile est généralement constituée de dioxyde de carbone, éventuellement additionné d'un modifiant polaire tel que le méthanol, le 2-propanol ou l'acétonitrile. La composition, la pression (densité), la température et le débit de la phase mobile indiquée peuvent être maintenus constants pendant toute la durée de l'analyse chromatographique (élution isocratique, isobare, isotherme), ou varier selon un programme défini (gradient d'élution du modifiant, de pression (densité), de température ou de débit).

**Détecteurs**

Les détecteurs les plus utilisés sont les spectrophotomètres dans l'ultraviolet/visible (UV/Vis) et les détecteurs à ionisation de flamme. La détection peut également reposer sur la dispersion de la lumière, la spectrophotométrie d'absorption infrarouge, la conductivité thermique ou d'autres méthodes particulières.

## MODE OPÉRATOIRE

Préparez la (les) solution(s) à examiner et la (les) solution(s) témoin(s) prescrites. Les solutions doivent être exemptes de particules solides.

Des critères de conformité du système sont décrits dans le chapitre *Techniques de séparation chromatographique* (*2.2.46*). Les limites dans lesquelles il est possible de faire varier les différents paramètres, pour satisfaire aux critères de conformité du système, sont également indiquées dans ce chapitre.

**04/2009:20246**

# 2.2.46. TECHNIQUES DE SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

Les techniques de séparation chromatographique sont des méthodes de séparation séquentielle reposant sur la distribution des composants de l'échantillon entre 2 phases, l'une stationnaire et l'autre mobile. La phase stationnaire peut être un solide ou un liquide déposé sur un support solide ou un gel. Elle peut être contenue dans une colonne, étalée en couche, déposée sous forme de film, etc. La phase mobile peut être gazeuse ou liquide ou en phase supercritique. La séparation peut reposer sur des phénomènes tels que l'adsorption, la distribution de masse (partage), l'échange d'ions, etc., ou sur des différences de propriétés physicochimiques moléculaires telles que la taille, la masse, le volume, etc.

Le présent chapitre contient des définitions et des méthodes de calcul des paramètres communs à ces techniques, ainsi que des exigences d'application générale pour la conformité des systèmes chromatographiques. Les principes de séparation, appareillages et modes opératoires sont décrits dans les méthodes générales suivantes :

- chromatographie sur papier (*2.2.26*),
- chromatographie sur couche mince (*2.2.27*),
- chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*),
- chromatographie liquide (*2.2.29*),
- chromatographie d'exclusion (*2.2.30*),
- chromatographie en phase supercritique (*2.2.45*).

## DÉFINITIONS

*Les critères de conformité du système et les critères d'acceptation spécifiés dans les monographies sont établis sur la base des paramètres définis ci-après. Sur certains appareils, des paramètres tels que le rapport signal/bruit et la résolution peuvent être calculés par un logiciel fourni par le constructeur. Il appartient à l'utilisateur de s'assurer que les méthodes de calcul utilisées par le logiciel sont équivalentes aux spécifications de la Pharmacopée Européenne et, si tel n'est pas le cas, d'effectuer les corrections nécessaires.*

**Chromatogramme**

Représentation, graphique ou autre, de la réponse d'un détecteur, de la concentration d'un effluent ou d'une autre grandeur utilisée comme mesure de la concentration d'un effluent en fonction du temps ou du volume. Idéalement, un chromatogramme se présente comme une séquence de pics gaussiens au-dessus d'une ligne de base (figure 2.2.46.-1).

**Pic**

Partie d'un chromatogramme enregistrant la réponse du détecteur lorsqu'un composant (ou plusieurs composants non séparés) sort de la colonne.

Le pic peut être défini par sa surface, ou par sa hauteur $h$ et sa largeur à mi-hauteur $w_h$, ou par sa hauteur $h$ et sa largeur aux points d'inflexion $w_i$ ; dans le cas d'un pic gaussien (figure 2.2.46.-1), il existe une relation de la forme suivante :

$$w_h = 1,18 w_i$$

**Temps de rétention $t_R$**

Temps requis pour l'élution d'un composant (figure 2.2.46.-1, échelle de la ligne de base en minutes).

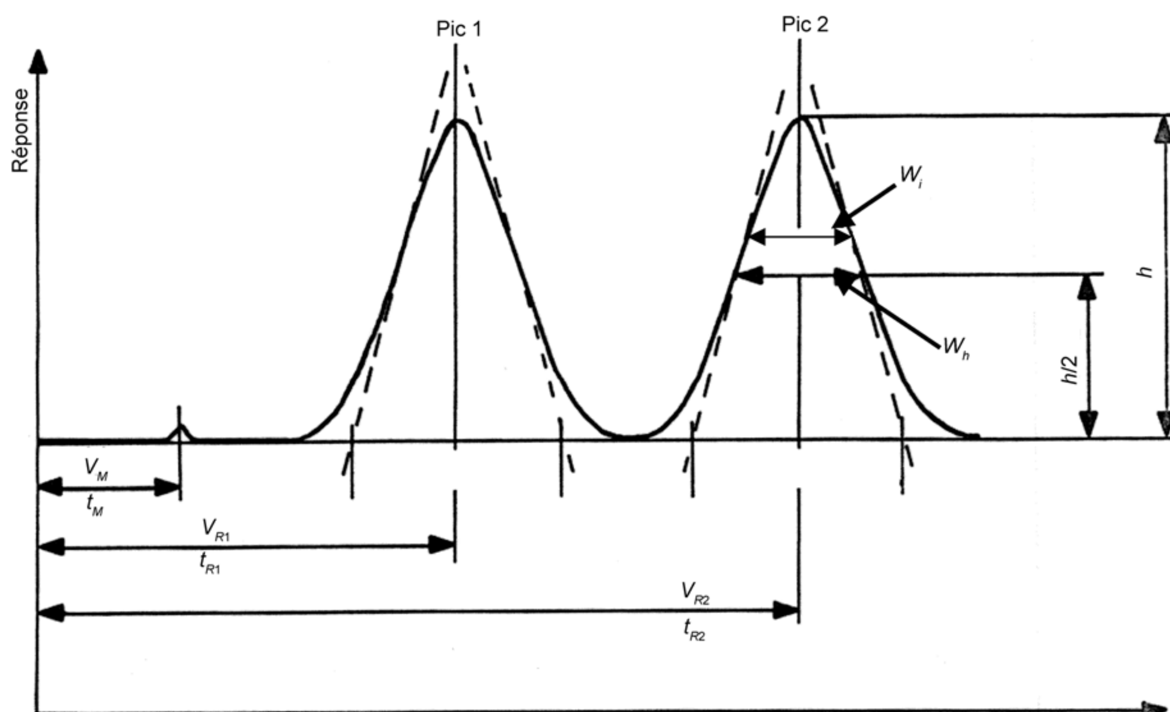



Figure 2.2.46.-1.

**Volume de rétention $V_R$**

Volume de phase mobile requis pour l'élution d'un composant. Il peut être calculé à partir du temps de rétention, et du débit $F$ exprimé en millilitres par minute, à l'aide de l'équation suivante :

$$V_R = t_R \times F$$

**Temps de rétention nulle (« hold-up time ») $t_M$**

Temps requis pour l'élution d'un composant non retenu (figure 2.2.46.-1, échelle de la ligne de base en minutes). En chromatographie d'exclusion, le symbole utilisé est $t_0$ (voir plus loin).

**Volume de rétention nulle (« hold-up volume ») $V_M$**

Volume de phase mobile requis pour l'élution d'un composant non retenu. Il peut être calculé à partir du temps de rétention nulle, et du débit $F$ exprimé en millilitres par minute, à l'aide de l'équation suivante :

$$V_M = t_M \times F$$

En chromatographie d'exclusion, le symbole utilisé est $V_0$ (voir plus loin).

**Facteur de rétention $k$**

Le facteur de rétention (également appelé coefficient de distribution massique $D_m$ ou facteur de capacité $k'$) est défini comme :

$$k = \frac{\text{quantité de composant dans la phase stationnaire}}{\text{quantité de composant dans la phase mobile}} = K_C \frac{V_S}{V_M}$$

$K_C$ = constante de distribution (ou coefficient de distribution à l'équilibre),

$V_S$ = volume de la phase stationnaire,

$V_M$ = volume de la phase mobile.

Le facteur de rétention d'un composant peut être déterminé à partir du chromatogramme, à l'aide de l'équation suivante :

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

**Temps phase mobile total $t_t$**

En chromatographie d'exclusion, temps de rétention d'un composant dont les molécules sont de taille inférieure à celle des plus petits pores du gel (figure 2.2.46.-2).

**Volume phase mobile total $V_t$**

En chromatographie d'exclusion, volume de rétention d'un composant dont les molécules sont de taille inférieure à celle des plus petits pores du gel. Il peut être calculé à partir du temps phase mobile total, et du débit $F$ exprimé en millilitres par minute, à l'aide de l'équation suivante :

$$V_t = t_t \times F$$

**Temps de rétention nulle $t_0$**

En chromatographie d'exclusion, temps de rétention d'un composant dont les molécules sont de taille supérieure à celle des plus grands pores du gel (figure 2.2.46.-2).

**Volume de rétention nulle $V_0$**

En chromatographie d'exclusion, volume de rétention d'un composant dont les molécules sont de taille supérieure à celle des plus grands pores du gel. Il peut être calculé à partir du temps de rétention nulle, et du débit $F$ exprimé en millilitres par minute, à l'aide de l'équation suivante :

$$V_0 = t_0 \times F$$

**Constante de distribution $K_0$**

En chromatographie d'exclusion, les caractéristiques d'élution d'un composant dans une colonne particulière peuvent être décrites par la constante de distribution (ou coefficient de partage), calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$K_0 = \frac{t_R - t_0}{t_t - t_0}$$

Figure 2.2.46.-2.

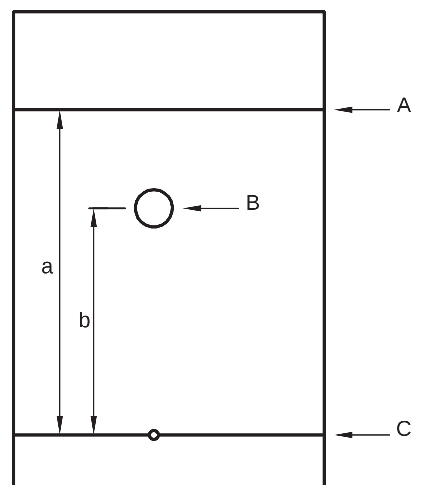
**Facteur de retardement $R_F$**

En chromatographie planaire, le facteur de retardement (ou facteur de rétention $R_f$) est le rapport entre la distance séparant le point de dépôt du centre de la tache et la distance parcourue par le front du solvant à partir du point de dépôt (figure 2.2.46.-3).

$$R_F = \frac{b}{a}$$

*b* = distance de migration du composant considéré,

*a* = distance de migration du front du solvant.




A. front du solvant B. tache C. ligne de dépôt

Figure 2.2.46.-3.

**Nombre de plateaux $N$**

La performance d'une colonne (efficacité apparente) peut être calculée à partir de données obtenues dans des conditions isothermes, isocratiques ou isodenses, selon la technique utilisée, en termes de nombre de plateaux (ou nombre apparent de plateaux théoriques) à l'aide de l'équation suivante, où $t_R$ et $w_h$ sont exprimés dans la même unité :

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2$$

$t_R$ = temps de rétention du pic correspondant au composant considéré,

$w_h$ = largeur du pic à mi-hauteur.

Le nombre de plateaux dépend du composant considéré ainsi que de la colonne, de la température de la colonne, de la phase mobile et du temps de rétention.

**Volume de délai $D$**

En élution à gradient, le volume de délai, ou volume mort entre mélangeur et colonne (« dwell volume »), est le volume compris entre le point de rencontre des éluants et la tête de colonne. Il peut être déterminé comme suit.

*Colonne* : remplacez la colonne chromatographique par un tube capillaire approprié (par exemple 1 m × 0,12 mm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *eau R*,

– *phase mobile B* : solution d'*acétone R* à 0,1 pour cent *V/V*,

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 20 | 100 → 0 | 0 → 100 |
| 20 - 30 | 0 | 100 |

*Débit* : réglé de façon à assurer une contre-pression suffisante (par exemple 2 mL/min).

*Détection* : spectrophotomètre à 265 nm.

Déterminez le temps $t_{0,5}$ (en minutes) où l'absorbance a augmenté de 50 pour cent (figure 2.2.46.-4).

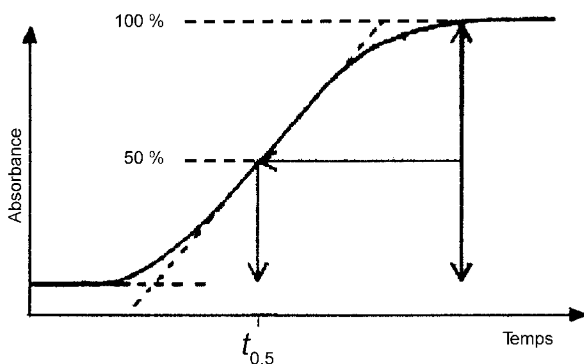



Figure 2.2.46.-4

$$D = t_D \times F$$

$t_D$ = $t_{0,5} - 0,5t_G$ (en minutes),

$t_G$ = durée prédéfinie du gradient (= 20 min),

$F$ = débit (en millilitres par minute).

**Facteur de symétrie $A_s$**

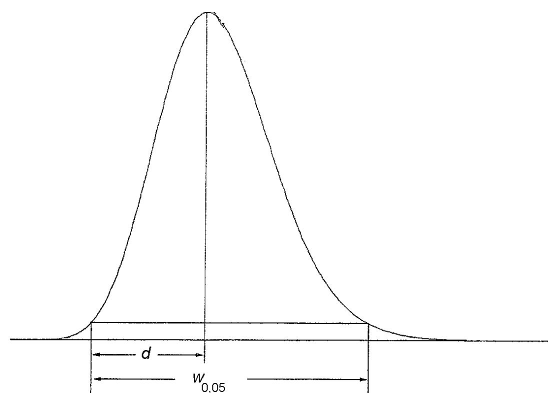



Figure 2.2.46.-5

Le facteur de symétrie d'un pic (figure 2.2.46.-5) est calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ = largeur du pic au vingtième de sa hauteur,

$d$ = distance entre la perpendiculaire abaissée du maximum du pic et le bord d'entrée du pic au vingtième de sa hauteur.

Une valeur $A_s$ de 1,0 indique la symétrie. Si $A_s > 1,0$, le pic présente une traînée. Si $A_s < 1,0$, le pic présente un front diffus.

**Résolution $R_s$**

La résolution entre les pics de 2 composants (figure 2.2.46.-1) peut être calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$R_s = \frac{1,18\,(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

$t_{R2} > t_{R1}$

$t_{R1}$, $t_{R2}$ = temps de rétention des pics,

$w_{h1}$, $w_{h2}$ = largeur des pics à mi-hauteur.

En chromatographie planaire quantitative, avec mesure densitométrique, les distances de migration remplacent les temps de rétention, et la résolution entre les pics de 2 composants peut être calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$R_s = \frac{1,18\,a\,(R_{F2} - R_{F1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

$R_{F1}$, $R_{F2}$ = facteur de retardement des pics,

$w_{h1}$, $w_{h2}$ = largeur des pics à mi-hauteur,

$a$ = distance de migration du front du solvant.

**Rapport pic/vallée $p/v$**

Le rapport pic/vallée peut être utilisé comme critère de conformité du système dans un essai des substances apparentées lorsque la séparation jusqu'à la ligne de base n'est pas réalisée entre 2 pics (figure 2.2.46.-6).

$$p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

$H_p$ = hauteur au-dessus de la ligne de base (extrapolée) du pic mineur,

$H_v$ = hauteur au-dessus de la ligne de base (extrapolée) du point le plus bas du tracé entre le pic mineur et le pic majeur.

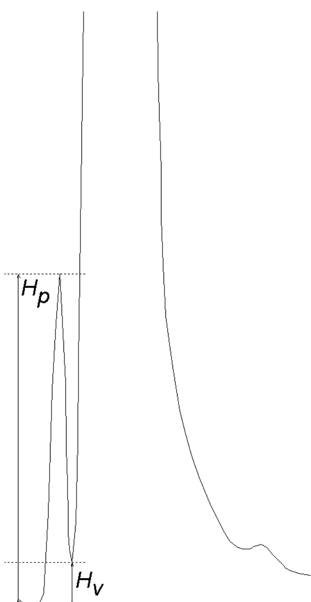



Figure 2.2.46.-6

**Rétention relative (*r*)**

La rétention relative est une estimation calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$r = \frac{t_{Ri} - t_M}{t_{Rst} - t_M}$$

$t_{Ri}$ = temps de rétention du pic considéré,

$t_{Rst}$ = temps de rétention du pic de référence (généralement celui de la substance à examiner),

$t_M$ = temps de rétention nulle.

La rétention relative non ajustée $r_G$ est calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$r_G = \frac{t_{Ri}}{t_{Rst}}$$

Sauf indication contraire, les valeurs de rétention relative indiquées dans les monographies correspondent à la rétention relative non ajustée.

En chromatographie planaire, les facteurs de retardement $R_{Fst}$ et $R_{Fi}$ remplacent $t_{Rst}$ et $t_{Ri}$.

**Rapport signal/bruit *S/N***

Le bruit à court terme affecte la fidélité de la quantification. Le rapport signal/bruit est calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

$H$ = hauteur du pic (figure 2.2.46.-7) correspondant au composant considéré dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin indiquée ; elle est mesurée entre le sommet du pic et la ligne de base extrapolée du signal observé sur une distance au moins égale à 5 fois la largeur du pic à mi-hauteur,

$h$ = amplitude du bruit dans un chromatogramme obtenu après injection ou dépôt d'un blanc, observée sur une distance au moins égale à 5 fois la largeur à mi-hauteur du pic du chromatogramme obtenu avec la solution témoin indiquée, et si possible centrée sur l'emplacement où ce pic serait observé.

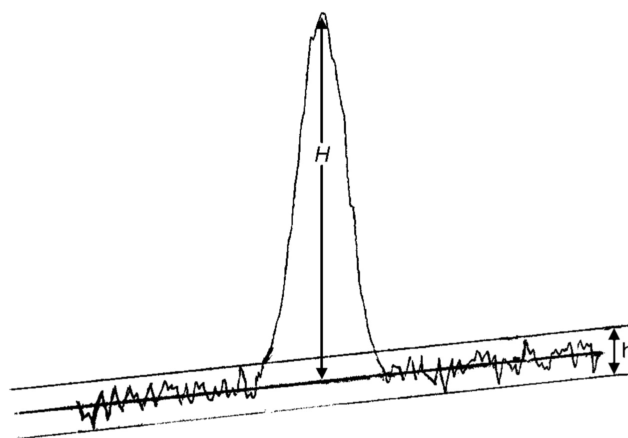



Figure 2.2.46.-7.

**Répétabilité liée au système**

La répétabilité de la réponse est exprimée, en pourcentage, par l'écart type relatif $s_r$(%) estimé à partir des résultats d'une série d'au moins 3 mesures consécutives effectuées par injection ou dépôt d'une solution témoin, et calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$s_r\,(\%) = \frac{100}{\overline{y}}\sqrt{\frac{\sum (y_i - \overline{y})^2}{n-1}}$$

$y_i$ = valeurs individuelles (surfaces ou hauteurs de pic, ou rapports de surfaces pour la méthode de l'étalon interne),

$\overline{y}$ = moyenne des valeurs individuelles,

$n$ = nombre des valeurs individuelles.

CONFORMITÉ DU SYSTÈME

Les différents éléments de l'appareillage doivent être qualifiés et permettre d'atteindre la performance requise pour la réalisation de l'essai ou du dosage considéré.

Les essais de conformité du système font partie intégrante de la méthode et visent à vérifier les performances du système chromatographique. Les paramètres généralement utilisés pour évaluer les performances de la colonne sont l'efficacité apparente, le facteur de rétention (coefficient de distribution massique), la résolution, la rétention relative et le facteur de symétrie. Les facteurs pouvant affecter le comportement chromatographique sont notamment :

– la composition, la force ionique, la température, le pH apparent de la phase mobile,

– le débit, les dimensions de la colonne, la température de la colonne, la pression,

– certaines caractéristiques de la phase stationnaire comme le type de support chromatographique (particulaire ou monolithique) utilisé, la taille des particules ou des macropores, la porosité, la surface spécifique,

– l'utilisation de phases stationnaires en phases inversées ou autres phases stationnaires modifiées en surface, le degré de modification chimique (postgreffage, taux de carbone, etc.).

Sauf indication contraire, les exigences suivantes doivent être satisfaites, de même que toute exigence supplémentaire mentionnée dans la monographie :

– dans un essai des substances apparentées ou un dosage, le facteur de symétrie d'un pic du chromatogramme obtenu avec une solution témoin utilisée pour la quantification est, sauf indication contraire, compris entre 0,8 et 1,5 (bornes incluses),

– dans le dosage d'une substance active, lorsque la teneur théorique en substance pure est de 100 pour cent, l'écart type relatif maximum admis $s_r(\%)_{max}$, pour les limites définies, est calculé à partir d'une série d'injections de la solution témoin, à l'aide de l'équation suivante :

$$s_r\,(\%)_{max} = \frac{KB\sqrt{n}}{t_{90\%,n-1}}$$

| | | |
|---|---|---|
| $K$ | = | constante de valeur 0,349 donnée par l'expression $K = \frac{0,6}{\sqrt{2}} \times \frac{t_{90\%,5}}{\sqrt{6}}$ où $\frac{0,6}{\sqrt{2}}$ représente l'écart type relatif requis, en pourcentage, pour 6 injections et pour $B$ = 1,0, |
| $B$ | = | limite supérieure de teneur spécifiée dans la section Définition de la monographie moins 100 pour cent, |
| $n$ | = | nombre d'injections de la solution témoin ($3 \leq n \leq 6$), |
| $t_{90\%,n-1}$ | = | variable $t$ de Student au niveau de probabilité 90 pour cent (bilatéral), avec $n-1$ degrés de liberté. |

Sauf indication contraire, l'écart type relatif maximum admis n'est pas supérieur à la valeur appropriée du tableau 2.2.46.-1. Cette exigence ne s'applique pas aux essais des substances apparentées.

Tableau 2.2.46.-1. – *Exigences de répétabilité*

| | Nombre d'injections individuelles | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **3** | **4** | **5** | **6** |
| ***B* (pour cent)** | **Ecart type relatif maximum admis** | | | |
| 2,0 | 0,41 | 0,59 | 0,73 | 0,85 |
| 2,5 | 0,52 | 0,74 | 0,92 | 1,06 |
| 3,0 | 0,62 | 0,89 | 1,10 | 1,27 |

– dans un essai des substances apparentées, la limite de quantification (correspondant à un rapport signal/bruit de 10) est inférieure ou égale à la limite d'exclusion.

Le système doit satisfaire aux critères de conformité pendant toute la procédure chromatographique. Il revient à l'analyste de définir, en fonction de facteurs tels que la fréquence d'utilisation de la procédure et son expérience du système chromatographique, un programme de contrôle approprié pour assurer le suivi de la conformité.

## AJUSTEMENT DES CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

Les limites dans lesquelles il est possible de faire varier les différents paramètres d'une procédure chromatographique pour satisfaire aux critères de conformité du système, sans modifier fondamentalement la méthode, sont indiquées ci-après. L'ajustement des conditions chromatographiques est plus critique pour les élutions à gradient que pour les élutions isocratiques, car il peut entraîner un déplacement des pics vers une autre étape du gradient, avec pour conséquences possibles l'identification incorrecte des pics, un masquage de pics ou une élution retardée au-delà de la durée d'enregistrement prescrite. Les ajustements autres que ceux indiqués nécessitent une revalidation de la méthode. Les conditions chromatographiques décrites sont validées lors de l'élaboration des monographies.

Les essais de conformité du système spécifiés ont pour objet de vérifier que la séparation requise pour la réalisation de l'essai ou du dosage est obtenue. Certains ajustements des conditions chromatographiques peuvent toutefois être nécessaires pour que le système réponde aux critères de conformité spécifiés, car les phases stationnaires sont décrites en termes généraux et il en existe dans le commerce un grand nombre, qui peuvent présenter des différences de comportement chromatographique. Dans certains cas, notamment celui des chromatographies liquides en phases inversées, l'ajustement des différents paramètres chromatographiques ne donne pas toujours des résultats satisfaisants. Il peut alors être nécessaire de remplacer la colonne par une autre colonne du même type (par exemple au gel de silice octadécylsilylé) présentant le comportement chromatographique voulu. La base de données Knowledge, consultable sur le site internet de la DEQM, contient habituellement des informations sur la ou les colonnes utilisées lors de l'élaboration de la monographie.

Pour les paramètres critiques, les ajustements permettant d'assurer la conformité du système sont clairement définis dans la monographie.

**Chromatographie sur couche mince et chromatographie sur papier**

*Composition de la phase mobile* : pour la quantité du solvant minoritaire, variation admise de ± 30 pour cent en termes relatifs ou ± 2 pour cent en termes absolus (prendre la valeur la plus élevée des deux) ; dans le cas d'un solvant minoritaire représentant 10 pour cent de la phase mobile, un ajustement de 30 pour cent en termes relatifs permet un intervalle de 7-13 pour cent tandis qu'un ajustement de 2 pour cent en termes absolus permet un intervalle de 8-12 pour cent, et la valeur relative est alors la plus élevée ; dans le cas d'un solvant minoritaire représentant 5 pour cent de la phase mobile, un ajustement de 30 pour cent en termes relatifs permet un intervalle de 3,5-6,5 pour cent tandis qu'un ajustement de 2 pour cent en termes absolus permet un intervalle de 3-7 pour cent, et la valeur absolue est dans ce cas la plus élevée. Pour les autres composants, pas de variation supérieure à 10 pour cent en termes absolus.

*pH du composant aqueux de la phase mobile* : ± 0,2 pH sauf indication contraire, ou ± 1,0 pH pour l'examen de substances non ionisables.

*Concentration des sels du tampon entrant dans la composition d'une phase mobile* : ± 10 pour cent.

*Volume déposé* : 10-20 pour cent du volume prescrit si l'on utilise des plaques de granulométrie fine (2-10 µm).

**Chromatographie liquide : élution isocratique**

*Composition de la phase mobile* : pour la proportion du solvant minoritaire, variation admise de ± 30 pour cent en termes relatifs ou ± 2 pour cent en termes absolus (prendre la valeur la plus élevée des deux) (voir exemple ci-dessus). Pour les autres composants, pas de variation supérieure à 10 pour cent en termes absolus.

*pH du composant aqueux de la phase mobile* : ± 0,2 pH sauf indication contraire, ou ± 1,0 pH pour l'examen de substances non ionisables.

*Concentration des sels du tampon entrant dans la composition d'une phase mobile* : ± 10 pour cent.

*Débit* : ± 50 pour cent. Une plage d'ajustement plus large est acceptable lorsque l'on modifie les dimensions de la colonne (voir formule de calcul ci-après).

*Paramètres de la colonne*

*Phase stationnaire* :

– aucun changement admis quant à l'identité du substituant de la phase stationnaire (par exemple, pas de remplacement de C18 par C8),
– *granulométrie* : réduction maximale de 50 pour cent, aucune augmentation admise.

*Dimensions de la colonne* :

– *longueur* : ± 70 pour cent,
– *diamètre interne* : ± 25 pour cent.

Lorsque les dimensions de la colonne sont modifiées, un ajustement du débit peut, si nécessaire, être effectué à l'aide de l'équation suivante :

$$F_2 = F_1 \frac{l_2 d_2^2}{l_1 d_1^2}$$

$F_1$ = débit indiqué dans la monographie, en millilitres par minute,

$F_2$ = débit ajusté, en millilitres par minute,

$l_1$ = longueur de colonne indiquée dans la monographie, en millimètres,

$l_2$ = longueur de la colonne utilisée, en millimètres,

$d_1$ = diamètre interne de colonne indiqué dans la monographie, en millimètres,

$d_2$ = diamètre interne de la colonne utilisée, en millimètres.

*Température* : ± 10 °C lorsque la température est spécifiée, sauf indication contraire.

*Longueur d'onde de détection* : aucun ajustement admis.

*Volume injecté* : réduction admise à condition d'obtenir une détection et une répétabilité satisfaisantes du (des) pic(s) à déterminer ; aucune augmentation admise.

**Chromatographie liquide : élution à gradient**

L'ajustement des conditions chromatographiques demande davantage de précautions pour les systèmes à gradient que pour les systèmes isocratiques.

*Composition de la phase mobile/gradient d'élution* : des ajustements mineurs de la composition de la phase mobile et du gradient sont acceptables à condition que :

– les critères de conformité du système soient satisfaits,
– le ou les pics principaux soient élués aux temps de rétention indiqués, à ± 15 pour cent près,
– la phase mobile ne présente pas dans sa composition finale un pouvoir d'élution plus faible que dans la composition prescrite.

Lorsqu'il s'avère impossible de satisfaire aux exigences de conformité du système, il est souvent préférable de tenir compte du volume de délai ou de changer de colonne.

*Volume de délai (« dwell volume »).* La configuration de l'appareillage utilisé peut significativement modifier la résolution, le temps de rétention et les rétentions relatives par rapport aux valeurs décrites. Ce phénomène est parfois dû à l'existence d'un volume de délai trop important. Certaines monographies prescrivent, avant le début du gradient, une étape isocratique qui permet d'adapter la programmation du gradient pour pallier la différence de volume de délai entre les systèmes respectivement utilisés lors du développement et dans la pratique. Il appartient à l'utilisateur d'adapter la durée de l'étape isocratique en fonction des caractéristiques de l'appareillage utilisé. Si le volume de délai utilisé lors de l'élaboration de la monographie est indiqué dans le texte, les temps $t$ (en minutes) indiqués dans le programme de gradient peuvent être remplacés par les temps corrigés $t_c$ (en minutes) calculés à l'aide de l'équation suivante :

$$t_c = t - \frac{(D - D_0)}{F}$$

$D$ = volume de délai, en millilitres,

$D_0$ = volume de délai utilisé lors du développement de la méthode, en millilitres,

$F$ = débit, en millilitres par minute.

L'étape isocratique introduite pour cet usage spécifique peut être omise si l'on dispose de données de validation concernant l'application de la méthode sans cette étape.

*pH du composant aqueux de la phase mobile* : aucun ajustement admis.

*Concentration des sels du tampon entrant dans la composition d'une phase mobile* : aucun ajustement admis.

*Débit* : un ajustement est acceptable lorsque l'on modifie les dimensions de la colonne (voir formule de calcul ci-après).

*Paramètres de la colonne*

*Phase stationnaire* :

– aucun changement admis quant à l'identité du substituant de la phase stationnaire (par exemple, pas de remplacement de C18 par C8),
– *granulométrie* : aucun ajustement admis.

*Dimensions de la colonne* :

– *longueur* : ± 70 pour cent,
– *diamètre interne* : ± 25 pour cent.

Lorsque les dimensions de la colonne sont modifiées, un ajustement du débit peut, si nécessaire, être effectué à l'aide de l'équation suivante :

$$F_2 = F_1 \frac{l_2 d_2^2}{l_1 d_1^2}$$

$F_1$ = débit indiqué dans la monographie, en millilitres par minute,

$F_2$ = débit ajusté, en millilitres par minute,

$l_1$ = longueur de colonne indiquée dans la monographie, en millimètres,

$l_2$ = longueur de la colonne utilisée, en millimètres,

$d_1$ = diamètre interne de colonne indiqué dans la monographie, en millimètres,

$d_2$ = diamètre interne de la colonne utilisée, en millimètres.

*Température* : ± 5 °C lorsque la température est spécifiée, sauf indication contraire.

*Longueur d'onde de détection* : aucun ajustement admis.

*Volume injecté* : réduction admise à condition d'obtenir une détection et une répétabilité satisfaisantes du (des) pic(s) à déterminer ; aucune augmentation admise.

**Chromatographie en phase gazeuse**

*Paramètres de la colonne*

*Phase stationnaire* :

– *granulométrie* : réduction maximale de 50 pour cent, aucune augmentation admise (colonnes remplies),
– *épaisseur du film* : – 50 pour cent à + 100 pour cent (colonnes capillaires).

*Dimensions de la colonne* :

– *longueur* : ± 70 pour cent,
– *diamètre interne* : ± 50 pour cent.

*Débit* : ± 50 pour cent.

*Température* : ± 10 pour cent.

*Volume injecté et volume de division* : ajustement admis à condition d'obtenir une détection et une répétabilité satisfaisantes.

**Chromatographie en phase supercritique**

*Composition de la phase mobile* : dans le cas des colonnes remplies, variation admise pour la proportion du solvant minoritaire de ± 30 pour cent en termes relatifs ou ± 2 pour cent en termes absolus (prendre la valeur la plus élevée des deux) ; dans le cas des colonnes capillaires, pas d'ajustement admis.

*Longueur d'onde de détection* : aucun ajustement admis.

*Paramètres de la colonne*

*Phase stationnaire* :

– *granulométrie* : réduction maximale de 50 pour cent, aucune augmentation admise (colonnes remplies).

*Dimensions de la colonne* :

- *longueur* : ± 70 pour cent,
- *diamètre interne* :
  ± 25 pour cent (colonnes remplies),
  ± 50 pour cent (colonnes capillaires).

*Débit* : ± 50 pour cent.

*Température* : ± 5 °C lorsque la température est spécifiée.

*Volume injecté* : réduction admise à condition d'obtenir une détection et une répétabilité satisfaisantes ; aucune augmentation admise.

QUANTIFICATION

Les pics dus aux solvants ou aux réactifs, ou issus de la phase mobile ou de la matrice de l'échantillon, ne sont pas pris en compte dans la quantification.

- *Sensibilité du détecteur*. La sensibilité du détecteur est l'intensité du signal délivré par unité de concentration ou de masse d'une substance dans la phase mobile entrant dans le détecteur. Le facteur de réponse relatif d'un détecteur, communément appelé *facteur de réponse*, exprime la sensibilité de ce détecteur pour une substance donnée, par rapport à une substance de référence. Le *facteur de correction* est l'inverse du facteur de réponse.
- *Méthode de l'étalon externe*. La concentration du (des) composant(s) à analyser est déterminée par comparaison des réponses (pics) respectivement obtenues avec la solution à examiner et avec une solution témoin.
- *Méthode de l'étalon interne*. Un composant (étalon interne) qui est bien séparé de la substance à examiner lors de l'élution est introduit en quantités égales dans la solution à examiner et dans une solution témoin. L'étalon interne choisi ne réagit pas avec la substance à examiner, il est stable et ne contient pas d'impuretés ayant le même temps de rétention que la substance à examiner. La concentration de la substance à examiner est déterminée par comparaison des valeurs respectivement obtenues avec la solution à examiner et avec la solution témoin pour le rapport entre la surface (ou hauteur) des pics de la substance à examiner et de l'étalon interne.
- *Procédé de normalisation*. On détermine la teneur pour cent d'un composant de la substance à examiner en calculant le pourcentage que représente la surface du pic correspondant par rapport à la surface totale des pics, à l'exclusion de ceux dus aux solvants ou aux réactifs, ou issus de la phase mobile ou de la matrice de l'échantillon, et de ceux dont la surface est inférieure ou égale à la limite d'exclusion.
- *Fonction d'étalonnage*. On procède à la détermination de la relation entre le signal $y$ mesuré ou estimé et la quantité $x$ (concentration, masse, etc.) de substance, puis au calcul de la fonction d'étalonnage. La fonction réciproque permet alors de calculer les résultats analytiques à partir du signal mesuré ou évalué pour la substance à analyser.

Lorsque, dans un essai des substances apparentées, on utilise un étalon externe, avec comme base de comparaison une dilution de la solution à examiner, ou le procédé de normalisation, les facteurs de correction éventuellement indiqués dans la monographie sont appliqués (cas où les facteurs de réponse ne sont pas compris dans l'intervalle 0,8-1,2).

Lorsqu'une teneur totale est prescrite pour les impuretés dans un essai des substances apparentées, ou qu'une impureté fait l'objet d'une détermination quantitative, il est important de définir un seuil approprié et des conditions adéquates pour l'intégration de la surface des pics. La *limite d'exclusion*, c'est à dire la surface seuil de prise en compte des pics dans le calcul (tous les pics de surface inférieure ou égale sont négligés), est généralement de 0,05 pour cent. Le seuil d'enregistrement du système est alors réglé sur la moitié au moins de cette limite d'exclusion. L'intégration de la surface du pic d'une impureté, lorsqu'il n'est pas complètement séparé du pic principal, s'effectue de préférence par extrapolation de vallée à vallée (arasement tangentiel).

2. Méthodes analytiques

**01/2010:20247**

# 2.2.47. ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE(5)

PRINCIPES GÉNÉRAUX

L'électrophorèse capillaire est une méthode d'analyse physique reposant sur la migration à l'intérieur d'un capillaire, sous l'effet d'un champ électrique continu, de substances chargées dissoutes dans une solution d'électrolytes.

La vitesse de migration d'un composé, sous l'effet d'un champ électrique d'intensité $E$, est déterminée par la mobilité électrophorétique de ce composé et par la mobilité électro-osmotique du tampon contenu dans le capillaire. La mobilité électrophorétique $\mu_{ep}$ d'un soluté dépend de ses caractéristiques propres (charge électrique, taille et forme moléculaires) et de celles du tampon dans lequel s'opère la migration (nature et force ionique de l'électrolyte, pH, viscosité, additifs). La vitesse de migration électrophorétique $\nu_{ep}$ d'un soluté, supposé de forme sphérique, est donnée par l'équation :

$$\nu_{ep} = \mu_{ep} \times E = \left(\frac{q}{6\pi\eta r}\right) \times \left(\frac{V}{L}\right)$$

$q$ = charge nette du soluté,

$\eta$ = viscosité de la solution d'électrolytes,

$r$ = rayon de Stoke du soluté,

$V$ = tension appliquée,

$L$ = longueur totale du capillaire.

Lorsqu'un champ électrique est appliqué aux extrémités d'un capillaire rempli de tampon, il induit dans ce capillaire la création d'un flux brut de solvant appelé flux d'électro-osmose. La vitesse du flux d'électro-osmose est fonction de la mobilité électro-osmotique $\mu_{eo}$, qui dépend elle-même de la densité des charges sur la paroi interne du capillaire et des caractéristiques du tampon. La vitesse électro-osmotique $\nu_{eo}$ est donnée par l'équation :

$$\nu_{eo} = \mu_{eo} \times E = \left(\frac{\varepsilon\zeta}{\eta}\right) \times \left(\frac{V}{L}\right)$$

$\epsilon$ = constante diélectrique du tampon,

$\zeta$ = potentiel zêta de la surface du capillaire.

La vitesse de migration $\nu$ du soluté est décrite par l'expression :

$$\nu = \nu_{ep} + \nu_{eo}$$

La mobilité électrophorétique et la mobilité électro-osmotique peuvent agir dans le même sens ou en sens opposés, selon la charge du soluté. En électrophorèse capillaire normale, les anions migreront en sens contraire du flux électro-osmotique, et leur vitesse sera inférieure à la vitesse électro-osmotique. Les cations migreront dans le sens du flux électro-osmotique, et leur vitesse sera supérieure à la vitesse électro-osmotique. Dans les conditions où la vitesse électro-osmotique est élevée par rapport à la vitesse électrophorétique des solutés, les cations et les anions peuvent être séparés en une seule opération.

(5) Ce chapitre a fait l'objet du processus d'harmonisation des pharmacopées. Voir chapitre *5.8. Harmonisation des pharmacopées.*

Le temps $t$ mis par le soluté pour parcourir la distance $l$ séparant le point d'injection dans le capillaire du point de détection (longueur efficace du capillaire) est donné par l'expression :

$$t = \frac{l}{\nu_{ep} + \nu_{eo}} = \frac{l \times L}{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) \times V}$$

En règle générale, les capillaires de silice fondue vierges ont une charge négative à pH supérieur à 3, à cause des groupes silanol ionisés présents sur la paroi interne. Le flux d'électro-osmose est donc dirigé de l'anode vers la cathode. Pour une reproductibilité satisfaisante de la vitesse de migration des solutés, ce flux d'électro-osmose doit rester constant d'une analyse à l'autre. Dans certaines applications, il peut être nécessaire de le réduire, voire de le supprimer, en modifiant la paroi interne du capillaire ou en changeant la concentration, la composition et/ou le pH de la solution tampon.

Une fois l'échantillon introduit dans le capillaire, les différents ions composants migrent au sein du milieu (électrolyte) sous forme de zones (bandes) indépendantes, en fonction de leur mobilité électrophorétique. La dispersion des zones, c'est-à-dire l'étalement de chaque bande de soluté, est la résultante de différents phénomènes. Dans les conditions idéales, le seul facteur d'élargissement de la bande d'un soluté est la diffusion moléculaire de ce soluté le long du capillaire (diffusion longitudinale). L'efficacité pour cette bande, exprimée par le nombre de plateaux théoriques $N$, est alors donnée par :

$$N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) \times V \times l}{2 \times D \times L}$$

$D$ = coefficient de diffusion moléculaire du soluté dans le tampon.

En pratique, d'autres phénomènes peuvent toutefois affecter significativement la dispersion des bandes, notamment la dissipation de chaleur, l'adsorption de l'échantillon sur la paroi du capillaire, les différences de conductivité entre échantillon et tampon, la longueur de capillaire occupée par l'échantillon injecté, la taille de la cellule de détection, et un décalage de niveau entre les réservoirs de tampon.

On peut obtenir la séparation de deux bandes (exprimée par la résolution $R_s$) en agissant sur la mobilité électrophorétique des espèces correspondantes, sur la mobilité électro-osmotique induite dans le capillaire, et sur l'efficacité associée à chacune des bandes, selon l'équation :

$$R_s = \frac{\sqrt{N}\,(\mu_{epb} - \mu_{epa})}{4\,(\overline{\mu}_{ep} + \mu_{eo})}$$

$\mu_{epa}$ et $\mu_{epb}$ = mobilité électrophorétique de chacune des 2 espèces,

$\overline{\mu}_{ep}$ = mobilité électrophorétique moyenne des 2 espèces $\overline{\mu}_{ep} = \frac{1}{2}\,(\mu_{epb} + \mu_{epa})$.

## APPAREILLAGE

Un instrument d'électrophorèse capillaire comprend :

- un générateur de courant continu haute tension réglable ;
- 2 réservoirs de tampons, installés de niveau, contenant la solution anodique et la solution cathodique prescrites ;
- 2 électrodes (cathode et anode) plongeant dans les réservoirs de tampons et connectées à la source de courant ;
- un capillaire de séparation (généralement en silice fondue) qui, pour certains types de détection, comporte une fenêtre optique alignée avec le détecteur ; les extrémités du capillaire plongent dans les réservoirs de tampons ; le capillaire est rempli avec la solution prescrite dans la monographie ;
- un système d'injection approprié ;
- un détecteur capable d'évaluer les quantités de constituants qui traversent un segment du capillaire de séparation en un temps donné ; les modes de détection les plus courants sont la spectrophotométrie d'absorption (UV et visible) ou la fluorimétrie, mais la conductimétrie, l'ampérométrie ou la spectrométrie de masse peuvent être utiles pour certaines applications spécifiques ; la détection inverse est également une option possible pour les composés non-fluorescents et n'absorbant pas les UV ;
- un système thermostatique capable d'assurer le maintien d'une température constante à l'intérieur du capillaire ; l'emploi d'un tel système est recommandé pour obtenir une bonne reproductibilité de séparation ;
- un enregistreur et un intégrateur approprié ou un ordinateur.

Le procédé d'injection choisi et son automatisation sont des facteurs critiques pour la précision des analyses quantitatives. Les différents procédés utilisés sont l'injection par gravité, l'injection par application d'une surpression ou d'une dépression, et l'injection électrocinétique ; dans le cas de l'injection électrocinétique, les différents constituants sont introduits dans le capillaire en quantité variable selon leur mobilité électrophorétique, ce qui engendre une certaine discrimination.

La monographie de la substance considérée spécifie les conditions opératoires à utiliser : type de capillaire, solutions tampons, méthode de préconditionnement, solution échantillon, conditions de migration. La solution d'électrolytes est filtrée pour en éliminer les particules, et dégazée pour éviter la formation de bulles risquant d'interférer dans la détection ou d'interrompre le contact électrique dans le capillaire pendant la séparation. Une procédure de rinçage rigoureuse doit être mise au point pour chaque procédure analytique, afin d'assurer l'obtention de temps de migration reproductibles pour les solutés.

## ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE DE ZONE

### *PRINCIPE*

En électrophorèse capillaire de zone, l'analyse s'effectue dans un capillaire contenant uniquement le tampon, sans milieu anti-convectif. La séparation des constituants de l'échantillon résulte du fait qu'ils migrent à des vitesses différentes, en bandes discrètes. La vitesse de migration de chaque bande dépend à la fois de la mobilité électrophorétique du soluté et du flux d'électro-osmose dans le capillaire (voir Principes généraux). Pour améliorer l'efficacité de séparation des substances présentant une tendance à l'adsorption sur les parois de silice fondue, on peut utiliser des capillaires greffés.

L'électrophorèse capillaire de zone permet aussi bien l'analyse de molécules de petite taille ($M_r$ < 2000) que de grande taille (2000 < $M_r$ < 100 000). Grâce à sa grande efficacité, elle permet la séparation de molécules ne présentant que de très faibles différences de rapport charge/masse. En ajoutant des sélecteurs chiraux au tampon de séparation, on peut également l'utiliser pour la séparation de composés chiraux.

### *OPTIMISATION*

L'optimisation de la séparation est un processus complexe faisant intervenir plusieurs facteurs. Les principaux paramètres à considérer lors du développement d'une séparation concernent l'instrumentation et la solution d'électrolytes.

**Paramètres instrumentaux**

*Tension.* Un tracé de la production de chaleur par effet Joule est utile pour optimiser la tension appliquée et la température du capillaire. Le temps de séparation est inversement proportionnel à la tension appliquée, mais l'application d'une tension trop élevée peut entraîner une production excessive de chaleur, qui induit l'apparition de gradients de température et, par conséquent, de gradients de viscosité au sein du tampon contenu dans le capillaire. Cet effet se traduit par un élargissement des bandes et une perte de résolution.

*Polarité.* La polarité des électrodes peut être normale (anode à l'entrée, cathode à la sortie), auquel cas le flux électro-osmotique sera dirigé vers la cathode. Si la polarité des électrodes est inversée, le flux électro-osmotique sera dirigé de la sortie vers

l'entrée, de sorte que ne parviendront à la sortie que les espèces chargées dont la mobilité électrophorétique est supérieure au flux électro-osmotique.

*Température*. La température agit principalement sur la viscosité et la conductivité électrique du tampon, donc sur la vitesse de migration. Dans certains cas, l'augmentation de la température dans le capillaire peut entraîner une modification structurelle de certaines protéines, altérant leur temps de migration et l'efficacité de leur séparation.

*Capillaire*. Les dimensions du capillaire (longueur et diamètre interne) exercent une influence sur le temps d'analyse, l'efficacité de séparation et la capacité du capillaire. L'augmentation de la longueur efficace et totale peut entraîner une diminution de l'intensité du champ électrique (à tension constante) et par conséquent un accroissement du temps de migration. Pour un tampon et un champ électrique donnés, la dissipation de chaleur et donc l'élargissement des bandes dépendent du diamètre interne du capillaire. Ce diamètre affecte aussi la limite de détection, qui est également fonction du volume d'échantillon injecté et du système de détection employé.

Comme l'adsorption des composants de l'échantillon sur la paroi du capillaire limite l'efficacité, il convient lors du développement d'une méthode de séparation d'envisager les différents moyens d'éviter ce type d'interactions. Dans le cas particulier des protéines, plusieurs stratégies ont été mises au point pour éviter l'adsorption sur la paroi. Certaines d'entre elles (emploi de pH extrêmes, ajout au tampon de substances chargées positivement qui seront adsorbées préférentiellement) permettent d'empêcher l'adsorption par simple modification du tampon. D'autres consistent à traiter la paroi interne du capillaire avec un polymère qui se greffe sur la silice par liaison covalente, supprimant ainsi toute possibilité d'interaction entre les protéines et la paroi chargée négativement. Il existe pour cet usage des capillaires prêts à l'emploi, greffés avec des polymères neutres-hydrophiles, cationiques et anioniques.

**Paramètres associés à la solution d'électrolytes**

*Nature et concentration du tampon*. Les tampons pour électrophorèse capillaire doivent posséder un pouvoir tampon approprié dans l'intervalle de pH voulu, ainsi qu'une faible mobilité (pour limiter la génération de courant).

Il est important d'adapter la mobilité des ions du tampon à celle des solutés, dans la mesure du possible, pour limiter la distorsion des bandes. De même, la nature du solvant utilisé pour la préparation de l'échantillon est importante pour permettre la focalisation de ce dernier à l'intérieur du capillaire, et ainsi améliorer l'efficacité de séparation et la détection.

L'augmentation de la concentration du tampon (à un pH donné) entraîne une diminution du flux d'électro-osmose et de la vitesse des solutés.

*pH du tampon*. Le pH du tampon peut influer sur la séparation en modifiant la charge de l'espèce considérée ou des additifs, et en changeant le flux d'électro-osmose. Dans le cas des protéines et des peptides, l'abaissement du pH du tampon jusqu'à une valeur inférieure au point isoélectrique (pI) modifie la charge nette du soluté qui, de négative, devient positive. Une élévation du pH du tampon se traduit généralement par une augmentation du flux d'électro-osmose.

*Solvants organiques*. Dans certains cas, des modifiants organiques (méthanol, acétonitrile, etc.) sont ajoutés au tampon aqueux pour accroître la solubilité du soluté ou d'autres additifs, et/ou pour agir sur le degré d'ionisation des constituants de l'échantillon. L'addition au tampon de tels modifiants organiques entraîne généralement une diminution du flux électro-osmotique.

*Additifs de séparation chirale*. Pour la séparation des isomères optiques, un sélecteur chiral est ajouté au tampon d'analyse. Les sélecteurs chiraux les plus couramment utilisés sont les cyclodextrines, mais les éthers-couronnes, certains polysaccharides et même des protéines sont également employés dans certains cas. Comme la reconnaissance chirale repose sur les différences de comportement du sélecteur vis-à-vis des énantiomères, la résolution obtenue pour les composés chiraux dépendra fortement du type de sélecteur utilisé. Il peut de ce fait être utile, lors du développement d'une séparation, de tester des cyclodextrines ayant des tailles de cavité différentes (α-, β- ou γ-cyclodextrine), ou des cyclodextrines modifiées au moyen de groupes neutres (méthyle, éthyle, hydroxyalkyle, etc.) ou ionisables (aminométhyle, carboxyméthyle, sulfobutyléther, etc.). Lors de l'utilisation de cyclodextrines modifiées, il doit être tenu compte des variations d'un lot à l'autre du degré de substitution des cyclodextrines, car celui-ci influence la sélectivité. Il existe par ailleurs d'autres facteurs affectant la résolution des séparations chirales : la concentration du sélecteur chiral, la composition et le pH du tampon, la température. L'emploi d'additifs organiques tels que le méthanol ou l'urée peut également avoir une influence sur la résolution.

## ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE SUR GEL

### *PRINCIPE*

En électrophorèse capillaire sur gel, la séparation s'effectue à l'intérieur d'un capillaire rempli d'un gel qui se comporte comme un tamis moléculaire. Les molécules présentant des rapports charge/masse voisins sont séparées en fonction de leur taille car les molécules de petite taille se déplacent plus facilement au sein du réseau du gel et migrent donc plus rapidement que les molécules de plus grande taille. L'électrophorèse capillaire sur gel permet ainsi de séparer selon leur masse moléculaire diverses macromolécules biologiques (protéines et fragments d'ADN par exemple) qui possèdent souvent des rapports charge/masse très voisins.

### *CARACTÉRISTIQUES DES GELS*

Les gels utilisés sont de 2 types : gels à greffage permanent et gels à greffage dynamique. Les gels à greffage permanent, tels que le polyacrylamide réticulé, sont préparés dans le capillaire même, par condensation des monomères. Ils se greffent en général sur la paroi de silice fondue et ne peuvent être extraits du capillaire sans destruction de ce dernier. Si les gels sont utilisés pour une analyse protéique sous conditions réductrices, le tampon de séparation contient habituellement du dodécylsulfate de sodium et les échantillons sont dénaturés avant injection, par chauffage dans un mélange de dodécylsulfate de sodium et de 2-mercaptoéthanol ou de dithiothréitol. Lorsque l'on opère sous conditions non réductrices (par exemple pour l'analyse d'un anticorps intact), le 2-mercaptoéthanol et le dithiothréitol ne sont pas utilisés. Il est possible d'optimiser la séparation dans les gels réticulés en modifiant le tampon de séparation (comme indiqué dans la section sur l'électrophorèse capillaire de zone) et en modulant la porosité du gel lors de sa préparation. Dans le cas des gels de polyacrylamide réticulé, on peut agir sur la porosité en modifiant la concentration d'acrylamide et/ou la proportion d'agent de réticulation. En règle générale, une diminution de la porosité du gel conduit à une diminution de la mobilité des solutés. La rigidité de ce type de gels exclut tout mode d'injection autre qu'électrocinétique.

Les gels à greffage dynamique sont constitués de polymères hydrophiles (polyacrylamide linéaire, dérivés de la cellulose, dextran, etc.) pouvant être dissous dans des tampons de séparation aqueux pour donner un milieu de séparation qui agit également comme tamis moléculaire. Ces milieux de séparation sont plus faciles à fabriquer que les polymères réticulés. Ils peuvent être préparés dans un flacon puis introduits par pression dans un capillaire greffé (exempt de flux d'électro-osmose). Le renouvellement du gel avant chaque injection améliore généralement la reproductibilité de la séparation. Il est possible d'augmenter la porosité des gels en utilisant des polymères de masse moléculaire plus élevée (à concentration en polymère constante) ou en réduisant la concentration en polymère (à masse moléculaire constante). Pour un même tampon, une diminution de la porosité du gel se traduit par une diminution de la mobilité du soluté. Comme la

dissolution des polymères dans le tampon produit des solutions de faible viscosité, l'injection peut être hydrodynamique aussi bien qu'électrocinétique.

## ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE À FOCALISATION ISOÉLECTRIQUE

### *PRINCIPE*

En focalisation isoélectrique, les molécules sont soumises à un champ électrique dans un gradient de pH généré par des ampholytes couvrant un large intervalle de pI (acides poly-aminocarboxyliques), dissous dans le tampon de séparation, et migrent tant qu'elles sont chargées.

Les trois étapes fondamentales de la focalisation isoélectrique sont le chargement, la focalisation et la mobilisation.

**Chargement**. Deux méthodes peuvent être utilisées :

– chargement en un temps : l'échantillon est mélangé aux ampholytes et introduit dans le capillaire par pression ou dépression,

– chargement séquentiel : on introduit dans le capillaire un tampon de tête, puis les ampholytes, l'échantillon mélangé aux ampholytes, à nouveau les ampholytes seuls et enfin le tampon de queue. Le volume de l'échantillon doit être assez faible pour ne pas induire de modification du gradient de pH.

**Focalisation**. Lorsque la tension est appliquée, les ampholytes migrent vers la cathode ou vers l'anode, selon leur charge nette, créant ainsi un gradient de pH de l'anode (pH inférieur) vers la cathode (pH supérieur). Au cours de cette étape, les composants à séparer migrent jusqu'au niveau du gradient de pH qui correspond à leur point isoélectrique (pI), et l'intensité du courant devient très faible.

**Mobilisation**. Si la détection nécessite une mobilisation, opérez selon l'une des méthodes suivantes :

– première méthode : la mobilisation est réalisée pendant l'étape de focalisation, sous l'effet du flux d'électro-osmose ; celui-ci doit être suffisamment faible pour ne pas empêcher la focalisation des composants ;

– deuxième méthode : la mobilisation est obtenue par application d'une pression positive après l'étape de focalisation ;

– troisième méthode : la mobilisation est réalisée après l'étape de focalisation, par addition de sels dans le réservoir cathodique ou anodique (selon la direction de mobilisation choisie), de façon à déplacer l'équilibre de pH au sein du capillaire sous tension. Cette modification de pH entraîne une mobilisation des protéines et des ampholytes vers le réservoir où ont été ajoutés les sels, et leur passage par le détecteur.

Le degré de séparation obtenu, exprimé par ΔpI, dépend du gradient de pH ($\mathrm{dpH}/\mathrm{d}x$), du nombre d'ampholytes de pI différents, du coefficient de diffusion moléculaire *D*, de l'intensité *E* du champ électrique et de l'influence du pH sur la mobilité électrophorétique de la substance ($-\mathrm{d}\mu/\mathrm{dpH}$) :

$$\Delta \mathrm{pI} = 3 \times \sqrt{\frac{D\,(\mathrm{dpH}/\mathrm{d}x)}{E\,(-\mathrm{d}\mu/\mathrm{dpH})}}$$

### *OPTIMISATION*

Les principaux paramètres à considérer lors du développement d'une séparation sont les suivants.

**Tension**. Les champs mis en oeuvre lors de l'étape de focalisation sont très élevés (de l'ordre de 300 V/cm à 1000 V/cm).

**Capillaire**. Le flux d'électro-osmose doit être soit réduit soit supprimé, selon la stratégie de mobilisation adoptée (voir ci-dessus). Les capillaires greffés tendent à réduire le flux d'électro-osmose.

**Solutions**. Le réservoir anodique est rempli d'une solution de pH inférieur au pI de l'ampholyte le plus acide, le réservoir cathodique d'une solution de pH supérieur au pI de l'ampholyte le plus basique. Il est courant d'employer de l'acide phosphorique à l'anode et de l'hydroxyde de sodium à la cathode.

L'addition à la solution d'ampholytes d'un polymère tel que la méthylcellulose tend, en augmentant la viscosité, à supprimer les éventuelles forces convectives et le flux d'électro-osmose. Il existe dans le commerce des ampholytes couvrant des intervalles de pH très divers, qu'il est possible de mélanger, au besoin, pour étendre le domaine de pH. On utilise des ampholytes couvrant un large intervalle de pH pour estimer le point isoélectrique, des ampholytes couvrant un intervalle de pH plus étroit pour améliorer l'exactitude. L'étalonnage peut être effectué par corrélation du temps de migration et du point isoélectrique d'une série de marqueurs protéiques.

Au cours de l'étape de focalisation, il est possible d'empêcher la précipitation des protéines à leur point isoélectrique, si nécessaire, en ajoutant au tampon des substances telles que du glycérol, des tensioactifs, de l'urée ou des tampons zwitterioniques. Toutefois, à certaines concentrations, l'urée dénature les protéines.

## CHROMATOGRAPHIE ÉLECTROCINÉTIQUE MICELLAIRE (CECM)

### *PRINCIPE*

En chromatographie électrocinétique micellaire, l'analyse s'effectue dans une solution d'électrolytes contenant un agent tensioactif, à concentration supérieure à la concentration micellaire critique (*cmc*). En fonction du coefficient de partage du soluté, ses molécules se répartissent entre le tampon aqueux et la phase pseudo-stationnaire composée des micelles. Cette technique peut donc être considérée comme hybride de l'électrophorèse et de la chromatographie. Elle permet de séparer les solutés neutres aussi bien que chargés avec l'efficacité, la rapidité et la précision instrumentale qui caractérisent l'électrophorèse capillaire. L'un des tensioactifs les plus couramment utilisés en CECM est le tensioactif anionique dodécylsulfate de sodium, mais d'autres tensioactifs sont également employés, par exemple les tensioactifs cationiques tels que les sels de cétyltriméthylammonium.

Le mécanisme de séparation est le suivant : à pH neutre et alcalin, un puissant flux d'électro-osmose est généré et entraîne vers la cathode les ions du tampon de séparation. En présence de dodécylsulfate de sodium (tensioactif), il se forme des micelles anioniques dont la migration électrophorétique s'effectue en sens inverse, vers l'anode. De ce fait, la vitesse globale de migration des micelles se trouve ralentie par rapport au flux brut de déplacement de la solution d'électrolytes. Dans le cas des solutés neutres, où la substance peut se partager entre la phase micellaire et le tampon aqueux et ne possède pas de mobilité électrophorétique, la vitesse de migration dépend uniquement du coefficient de partage entre la phase micellaire et le tampon aqueux ; dans l'électrophorégramme, les pics correspondant à chacun des solutés non chargés se situent donc toujours entre le pic du marqueur de flux d'électro-osmose et le pic de la phase micellaire (on appelle fenêtre de séparation le temps compris entre ces deux pics). Dans le cas des solutés porteurs d'une charge électrique, la vitesse de migration dépend à la fois du coefficient de partage entre la phase micellaire et le tampon aqueux et de la mobilité électrophorétique du soluté en l'absence de micelles.

En CECM de solutés neutres ou faiblement ionisés, le mécanisme est essentiellement chromatographique ; il est donc possible de décrire la migration du soluté et la résolution en termes de facteur de rétention $k$ du soluté, aussi appelé coefficient de distribution massique $D_m$, c'est-à-dire le rapport entre les nombres de moles de soluté respectivement contenues dans les micelles et dans la phase mobile. Dans le cas d'un composé neutre, $k$ est donné par la formule :

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0 \times \left(1 - \frac{t_R}{t_{mc}}\right)} = K \times \frac{V_S}{V_M}$$

$t_R$ = temps de migration du soluté,

$t_0$ = temps d'analyse d'un soluté non retenu (déterminé par injection d'un marqueur de flux d'électro-osmose, tel que le méthanol, qui ne pénètre jamais dans les micelles),

$t_{mc}$ = temps de migration des micelles (mesuré par injection d'un marqueur micellaire, tel que le rouge Soudan III, qui migre toujours en association avec les micelles),

$K$ = coefficient de partage du soluté,

$V_S$ = volume de la phase micellaire,

$V_M$ = volume de la phase mobile.

De même, la résolution $R_s$ entre deux solutés ayant des temps de migration voisins est donnée par :

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k_b}{k_b + 1} \times \frac{1 - \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right)}{1 + k_a \times \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right)}$$

$N$ = nombre de plateaux théoriques pour l'un des solutés,

$\alpha$ = sélectivité,

$k_a$ et $k_b$ = facteurs de rétention respectifs des 2 solutés ($k_b > k_a$).

Des équations similaires, mais non identiques, donnent les valeurs de $k$ et $R_s$ pour les solutés porteurs d'une charge électrique.

*OPTIMISATION*

Les principaux paramètres à considérer lors du développement d'une séparation par CECM concernent l'instrumentation et la solution d'électrolytes.

**Paramètres instrumentaux**

*Tension*. Le temps de séparation est inversement proportionnel à la tension appliquée. Néanmoins, l'utilisation d'une tension trop élevée peut entraîner une production excessive de chaleur induisant l'apparition de gradients de température et de viscosité au sein du tampon, du centre du capillaire vers la périphérie. Cet effet peut être significatif dans le cas de tampons à conductivité élevée tels que ceux contenant des micelles. Si la dissipation thermique est insuffisante, il se traduit par un élargissement des bandes et une perte de résolution.

*Température*. Les variations de la température du capillaire affectent le coefficient de partage du soluté entre le tampon et les micelles, la concentration micellaire critique et la viscosité du tampon. Ces paramètres agissent sur le temps de migration des solutés. L'emploi d'un bon système de refroidissement améliore la reproductibilité du temps de migration.

*Capillaire*. Comme en électrophorèse capillaire de zone, les dimensions du capillaire (longueur et diamètre interne) exercent une influence sur le temps d'analyse et l'efficacité de séparation. L'augmentation de la longueur efficace et totale peut entraîner une diminution de l'intensité du champ électrique (à tension constante) et par conséquent un allongement du temps de migration et une amélioration de l'efficacité de séparation. Le diamètre interne conditionne la dissipation de chaleur (pour un tampon et un champ électrique donnés), donc la largeur des bandes.

**Paramètres associés à la solution d'électrolytes**

*Nature et concentration de l'agent tensioactif*. La nature de l'agent tensioactif utilisé (comme celle de la phase stationnaire en chromatographie) affecte la résolution en modifiant la sélectivité de séparation. Il existe par ailleurs une relation de proportionnalité directe entre la concentration en tensioactif de la phase mobile et la valeur log $k$ d'un composé neutre. Comme, en CECM, la résolution atteint un maximum lorsque $k$ tend vers la valeur $\sqrt{t_{mc}/t_0}$, toute modification de la teneur en tensioactif de la phase mobile se répercute sur la résolution obtenue.

*pH du tampon*. Bien que le pH n'ait pas d'influence sur le coefficient de partage des solutés non ionisés, il peut modifier le flux d'électro-osmose dans les capillaires non greffés. Un abaissement du pH du tampon entraîne une diminution du flux d'électro-osmose et par conséquent une augmentation de la résolution pour les solutés neutres et un allongement du temps d'analyse.

*Solvants organiques*. Pour améliorer la séparation des composants hydrophobes en CECM, on peut ajouter des modifiants organiques (méthanol, propanol, acétonitrile, etc.) à la solution d'électrolytes. Cette addition entraîne généralement une diminution du temps de migration et de la sélectivité de la séparation. Comme elle affecte la concentration micellaire critique, il faut respecter un certain équilibre entre les teneurs en modifiant organique et en agent tensioactif, sous peine d'inhiber ou d'altérer la micellisation et, par voie de conséquence, d'empêcher la formation des micelles et donc le partage. La dissociation des micelles en présence d'une forte teneur de solvant organique ne signifie pas nécessairement que la séparation soit impossible : dans certains cas, l'interaction hydrophobe entre le tensioactif ionique monomère et les solutés neutres conduit à la formation de complexes solvophobes pouvant être séparés par voie d'électrophorèse.

*Additifs de séparation chirale*. Pour la séparation des isomères optiques en utilisant la CECM, un sélecteur chiral est introduit dans le système micellaire, soit par liaison covalente avec l'agent tensioactif, soit par addition à l'électrolyte de séparation. Les micelles possédant des groupements à propriétés de discrimination chirale sont, notamment, les sels de *N*-dodécanoyl-L-aminoacides, les sels biliaires, etc. La résolution chirale peut également être obtenue par addition de discriminants chiraux, tels que les cyclodextrines, à des solutions d'électrolytes contenant des agents tensioactifs achiraux micellisés.

*Autres additifs*. Il existe plusieurs approches possibles pour modifier la sélectivité par addition de substances chimiques au tampon. L'emploi de différents types de cyclodextrines peut également permettre de réduire les interactions micelles-solutés hydrophobes et ainsi d'accroître la sélectivité pour ce type de substances.

Une autre approche suivie pour améliorer la sélectivité de séparation en CECM est l'addition de substances capables de modifier les interactions soluté-micelle par adsorption sur cette dernière. Ces additifs peuvent être soit un second agent tensioactif (ionique ou non) qui donne naissance à des micelles mixtes, soit des cations métalliques qui se dissolvent dans la micelle et donnent des complexes de coordination avec les solutés.

QUANTIFICATION

Il convient de diviser la surface des pics par le temps de migration correspondant, pour obtenir la surface corrigée et pouvoir ainsi :

- compenser la dérive du temps de migration d'une analyse à l'autre, donc réduire la variabilité de la réponse,
- compenser les différences de réponse entre constituants de l'échantillon possédant des vitesses de migration différentes.

Lorsque l'on emploie un étalon interne, il convient de vérifier qu'aucun des pics de la substance à examiner n'est masqué par celui de cet étalon.

*CALCULS*

A partir des valeurs obtenues, calculez la teneur du (des) composant(s) à analyser. Si la monographie le prescrit, calculez la teneur pour cent d'un ou plusieurs des constituants de l'échantillon en déterminant le pourcentage représenté par la surface corrigée du (des) pic(s) correspondant(s) par rapport à la surface corrigée totale de l'ensemble des pics, à l'exclusion de ceux dus aux solvants ou aux réactifs éventuellement ajoutés (procédé de normalisation). L'utilisation d'un système d'intégration automatique (intégrateur ou système informatique) est recommandée.

CONFORMITÉ DU SYSTÈME

Pour vérifier le comportement du système, on utilise des paramètres de conformité du système dont le choix dépend du type d'électrophorèse capillaire utilisé. Ces paramètres sont : le facteur de rétention $k$ (en chromatographie électrocinétique micellaire uniquement), le nombre apparent de plateaux théoriques $N$, le facteur de symétrie $A_s$ et la résolution $R_s$. Les sections précédentes contiennent des expressions théoriques des paramètres $N$ et $R_s$, mais d'autres équations plus pratiques, données ci-après, permettent de calculer ces paramètres à partir des électrophorégrammes.

*NOMBRE APPARENT DE PLATEAUX THÉORIQUES*

Le nombre apparent de plateaux théoriques $N$ peut être calculé à l'aide de l'expression :

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2$$

$t_R$ = temps de migration ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant au composant considéré,

$w_h$ = largeur du pic à mi-hauteur.

*RÉSOLUTION*

La résolution $R_s$ entre deux pics de hauteur voisine peut être calculée à l'aide de l'expression :

$$R_s = \frac{1,18 \times (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

$$t_{R2} > t_{R1}$$

$t_{R1}$ et $t_{R2}$ = temps de migration ou distances sur la ligne de base entre le point d'injection et les perpendiculaires abaissées des maximums de deux pics adjacents,

$w_{h1}$ et $w_{h2}$ = largeur des pics à mi-hauteur.

Dans des cas appropriés, la résolution peut être calculée par mesure de la hauteur $H_v$ du point le plus bas de la courbe entre deux pics partiellement séparés dans une préparation témoin et de la hauteur $H_p$ du plus petit des deux pics, et en calculant le rapport pic/vallée :

$$\frac{p}{v} = \frac{H_p}{H_v}$$

*FACTEUR DE SYMÉTRIE*

Le facteur de symétrie $A_s$ d'un pic peut être calculé à l'aide de l'expression :

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ = largeur du pic au vingtième de sa hauteur,

$d$ = distance entre la perpendiculaire abaissée du maximum du pic et le bord d'entrée du pic au vingtième de sa hauteur.

Des tests de répétabilité des surfaces (écart type des surfaces ou des rapports surface/temps de migration) et des temps de migration (écart type des temps de migration) sont effectués au titre de paramètres de conformité du système. La répétabilité des temps de migration permet de vérifier l'adéquation des procédures de lavage des capillaires. En électrophorèse capillaire, une autre méthode est également utilisée pour éviter les défauts de répétabilité des temps de migration : l'emploi du temps de migration relatif par rapport à un étalon interne.

Un test de vérification du rapport signal/bruit, effectué sur une préparation témoin, ou la détermination de la limite de quantification peuvent également être utiles pour la détermination des substances apparentées.

*RAPPORT SIGNAL/BRUIT*

La limite de détection et la limite de quantification correspondent respectivement à un rapport signal/bruit de 3 et de 10. Le rapport signal/bruit $S/N$ est calculé à l'aide de l'expression :

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h}$$

$H$ = hauteur du pic correspondant au composant considéré dans l'électrophorégramme obtenu avec la solution témoin indiquée, mesurée entre le sommet du pic et la ligne de base extrapolée du signal observé sur une distance égale à 20 fois la largeur du pic à mi-hauteur,

$h$ = amplitude du bruit de fond dans un électrophorégramme obtenu après injection d'un blanc, observé sur une distance égale à 20 fois la largeur à mi-hauteur du pic de l'électrophorégramme obtenu avec la solution témoin indiquée, et si possible centrée sur l'emplacement où ce pic serait observé.

**01/2008:20248**

## 2.2.48. SPECTROMÉTRIE RAMAN

La spectrométrie Raman est une méthode d'analyse fondée sur la diffusion de la lumière par une substance soumise à un rayonnement lumineux monochromatique de grande intensité (généralement fourni par une source laser) et sur l'analyse des déplacements de fréquence dans le spectre de diffusé (principe de la diffusion lumineuse inélastique).

La spectrométrie Raman est complémentaire de la spectrométrie infrarouge en ce sens que les deux techniques reposent sur l'étude des vibrations moléculaires au sein d'un matériau ; elles diffèrent par contre quant à leur sensibilité relative vis-à-vis des divers groupes fonctionnels. La spectrométrie Raman est une technique particulièrement sensible pour les liaisons non polaires (par exemple les liaisons C-C simples ou multiples), mais moins sensible pour les liaisons polaires. L'eau, qui possède un puissant spectre d'absorption dans l'infrarouge, est un médiocre diffuseur Raman et constitue de ce fait un solvant bien adapté pour cette technique.

*Appareillage.* Les spectromètres utilisés pour enregistrer les spectres Raman comportent typiquement les éléments suivants :

– une source de lumière monochromatique, généralement laser, dont la longueur d'onde peut se situer dans l'ultraviolet, le visible ou le proche infrarouge,
– des éléments d'optique appropriés (lentilles, miroirs ou éléments à fibres optiques) permettant de diriger la lumière incidente et de capter la lumière diffusée par l'échantillon,
– un dispositif optique (monochromateur ou filtre) chargé de transmettre au détecteur le rayonnement de diffusion Raman, décalé en fréquence, en arrêtant l'intense rayonnement de diffusion coïncidant avec la fréquence incidente (diffusion Rayleigh),

– un système dispersif (monochromateur à prisme ou à réseau) combiné à des fentes de sélection de longueur d'onde et à un détecteur (généralement un tube photomultiplicateur),

ou

– un système dispersif (à prisme ou à réseau) combiné à un détecteur multicanal (généralement un détecteur à transfert de charge (CCD)),

ou

– un interféromètre muni d'un détecteur qui enregistre le rayonnement diffusé en termes d'intensité et de temps et un dispositif de traitement des données qui convertit ces données en une fonction de la fréquence ou du nombre d'onde par une transformée de Fourier.

PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Les spectres Raman peuvent être enregistrés à partir de solides, de liquides et de gaz, directement ou dans des récipients ou des tubes de verre, généralement sans préparation ou dilution préalable de l'échantillon.

Une limite majeure de la spectrométrie Raman provient de l'éventuelle présence d'impuretés émettant un rayonnement de fluorescence qui interfère dans la détection du signal Raman, beaucoup plus faible. La fluorescence peut être évitée si l'on choisit une source laser ayant une longueur d'onde plus grande, par exemple dans le proche infrarouge, en tant que faisceau excitateur. Il existe différents moyens d'accroître l'intensité de certains signaux Raman, par exemple les techniques dites du Raman Résonant (RR) et de la Diffusion Raman Exaltée de Surface (DRES).

En raison de l'extrême focalisation du faisceau laser excitateur, le spectre est typiquement enregistré à partir d'échantillons d'un faible volume, de l'ordre du microlitre. A moins d'en augmenter le volume, il est donc nécessaire de tenir compte des inhomogénéités au sein de l'échantillon, en procédant par exemple à des rotations de cet échantillon.

IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION À L'AIDE DE SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Préparez la substance à examiner et la substance de référence par la même procédure, puis enregistrez les spectres dans les mêmes conditions opératoires. Les maxima du spectre obtenu avec la substance à examiner correspondent en position et en intensité relative à ceux du spectre obtenu avec la substance de référence (SCR).

Lorsque les spectres enregistrés à l'état solide présentent des différences quant à la position des maxima, soumettez la substance à examiner et la substance de référence à un traitement identique visant à les recristalliser ou à leur conférer la même forme, ou procédez comme décrit dans la monographie, puis enregistrez à nouveau les spectres.

La loi de Lambert-Beer n'est pas valable pour la spectrométrie Raman, néanmoins l'intensité du signal Raman est directement proportionnelle à la concentration de la substance à l'origine de la diffusion Raman. Comme pour les autres techniques spectroscopiques, une détermination quantitative peut être effectuée par l'emploi de quantités ou de concentrations connues de substances de référence. En raison de la faible résolution spatiale de la technique, un soin particulier est nécessaire pour assurer la représentativité des échantillons d'étalons et de substances à analyser, par exemple en veillant à ce qu'ils soient sous la même forme physique ou en utilisant un étalon interne dans le cas d'échantillons liquides.

IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION À L'AIDE DE SPECTROTHÈQUES ET DE MÉTHODES STATISTIQUES DE CLASSIFICATION ET D'ÉTALONNAGE

*Vérification des performances instrumentales.* Utilisez l'appareil suivant les instructions du fabricant et effectuez à intervalles réguliers les opérations prescrites pour l'étalonnage et la vérification des performances du système, selon l'utilisation de l'appareil et les substances à examiner. Il convient d'apporter les corrections ou de prendre les mesures nécessaires pour compenser la variabilité du nombre d'onde et de l'intensité de la réponse des instruments, tout particulièrement lorsque la spectrométrie Raman est utilisée à des fins d'analyse quantitative ou lorsqu'il s'agit d'établir des bibliothèques de références spectrales (spectrothèques) aux fins d'étalonnage ou de classification (chimiométrique).

*Vérification de l'échelle des nombres d'onde.* Vérifiez l'échelle des nombres d'onde du déplacement Raman (normalement exprimé en $cm^{-1}$) à l'aide d'un étalon approprié présentant des maxima caractéristiques aux nombres d'onde considérés, par exemple une substance organique, une lampe Ne ou les raies du plasma $Ar^+$ d'un laser à ions d'argon.

Lors de la mesure d'étalonnage il est nécessaire de tenir compte de la nature de l'échantillon, c'est-à-dire qu'un échantillon d'étalonnage solide doit être utilisé pour des échantillons d'essai solides et un échantillon d'étalonnage liquide pour les liquides. Choisissez une substance appropriée (par exemple, l'indène, le cyclohexane ou le naphtalène) pour laquelle des déplacements de nombre d'onde exacts ont été établis (voir tableau 2.2.48.-1). Il convient de placer l'indène dans un tube pour RMN, d'y faire le vide, de sceller sous gaz inerte et de conserver au frais et à l'abri de la lumière pour éviter la dégradation de l'échantillon.

Tableau 2.2.48.-1. – *Déplacement de nombre d'onde (et tolérances) du cyclohexane, de l'indène et du naphtalène.*

| cyclohexane [A] | indène [B] | naphtalène [A] |
|---|---|---|
| | | 3056,4 (± 1,5) |
| 2938,3 (± 1,5) | | |
| 2923,8 (± 1,5) | | |
| 2852,9 (± 1,5) | | |
| | 1609,7 (± 1,0) | 1576,6 (± 1,0) |
| 1444,4 (± 1,0) | 1552,6 (± 1,0) | 1464,5 (± 1,0) |
| 1266,4 (± 1,0) | 1205,2 (± 1,0) | 1382,2 (± 1,0) |
| 1157,6 (± 1,0) | | 1147,2 (± 1,0) |
| 1028,3 (± 1,0) | 1018,6 (± 1,0) | 1021,6 (± 1,0) |
| 801,3 (± 1,0) | 730,5 (± 1,0) | 763,8 (± 1,0) |
| | 533,9 (± 1,0) | 513,8 (± 1,0) |

[A] *Standard guide for Raman shift standards for spectrometer calibration* (American Society for Testing and Materials ASTM E 1840).

[B] D. A. Carter, W. R. Thompson, C. E. Taylor and J. E. Pemberton, *Applied Spectroscopy*, 1995, 49 (11), 1561-1576.

*Vérification de l'échelle d'intensité de la réponse.* L'intensité absolue et l'intensité relative des raies Raman dépendent de plusieurs facteurs, dont :

– l'état de polarisation de la lumière excitatrice,
– l'état de polarisation de l'optique de détection,
– l'intensité de la lumière d'irradiation,
– les différences de réponse instrumentale,
– les différences de focalisation et de géométrie du montage,
– dans le cas des échantillons solides, les différences de densité de tassement.

Les critères d'acceptabilité appropriés dépendent de l'application mais une variation au jour le jour de ± 10 pour cent dans les intensités relatives des bandes peut être respectée dans la plupart des cas.

*Etablissement d'une bibliothèque spectrale de référence.* Enregistrez le spectre d'un nombre approprié de substances ayant été soumises à tous les essais requis (par exemple ceux prescrits dans une monographie) et reflétant la variabilité type de la substance à analyser (fabricant, lot, modification cristalline, taille des particules, etc.). L'ensemble des spectres ainsi obtenus constitue le corps de données à partir duquel sont définies les frontières de similarité et ou les limites quantitatives qui pourront être utilisées, par exemple, pour identifier la

substance ou en contrôler la quantité générée au cours d'un processus de production. Le nombre de substances à inclure dans la base de données dépendra de l'application spécifique envisagée. La collection de spectres contenue dans la base de données peut être représentée de différentes façons, définies par la technique mathématique utilisée pour la classification ou la quantification.

La sélectivité de la base de données pour l'identification positive d'une substance donnée et la discrimination vis-à-vis d'autres substances figurant dans la base de données est un aspect à établir au cours de la validation. Il convient de tester cette sélectivité à intervalles réguliers, pour confirmer la validité de la base de données, et tout spécialement en cas de modification majeure concernant une substance (par exemple changement de fournisseur ou modification du procédé de production) ou lors du réglage du spectromètre Raman (par exemple pour vérifier la répétabilité du nombre d'onde et de la réponse).

Cette validation de la base de données ne vaut que pour l'instrument avec lequel elle a été effectuée, ou pour un instrument similaire à condition qu'il soit démontré que le transfert de la base de données n'a pas affecté sa validité.

*Mode opératoire.* Préparez et examinez l'échantillon suivant la même procédure que celle utilisée pour la constitution de la base de données. Une transformation mathématique appropriée du spectre Raman peut être calculée afin de faciliter la comparaison des spectres ou la prédiction quantitative.

La comparaison des spectres ou des transformées spectrales ou la prédiction quantitative de certaines propriétés ou quantités dans la substance examinée peut nécessiter l'utilisation de techniques appropriées d'étalonnage ou de classification chimiométrique ou statistique.

**01/2008:20249**

# 2.2.49. MÉTHODE DU VISCOSIMÈTRE À CHUTE DE BILLE

Sauf indication contraire dans la monographie, la détermination de la viscosité dynamique des liquides newtoniens à l'aide d'un viscosimètre à chute de bille approprié est effectuée à 20 ± 0,1 °C. Déterminez le temps nécessaire à la bille pour parcourir, dans le liquide à examiner, la distance entre les 2 marques. Le résultat n'est valable que si 2 mesures consécutives ne diffèrent pas de plus de 1,5 pour cent, sauf si une limite plus étroite est définie pour l'appareil utilisé.

*Appareil.* Le viscosimètre à chute de bille est constitué par un tube de verre recouvert d'un manchon permettant un contrôle précis de la température et de 6 billes de verre, en alliage nickel-fer ou en acier, de densité et de diamètre différents. Le tube est fixé de sorte que l'axe soit incliné de 10 ± 1° par rapport à la verticale. 2 marques circulaires sur le tube définissent la distance de chute de la bille. L'appareil disponible dans le commerce est fourni avec des tableaux indiquant les constantes, la densité des billes et les billes qu'il convient d'utiliser selon les différents écarts de viscosité voulus.

*Méthode.* Amenez le tube propre et sec du viscosimètre à chute de bille à une température de 20 ± 0,1 °C, puis remplissez-le avec le liquide à examiner sans faire de bulles. Placez y la bille appropriée à la plage de vicosité du liquide de façon à obtenir un temps de chute d'au moins 30 s. Fermez le tube et maintenez le liquide à 20 ± 0,1 °C pendant au moins 15 min. Laissez la bille parcourir la distance entre les 2 marques une première fois sans faire de mesure. Laissez-la parcourir à nouveau le tube et chronométrez au cinquième de seconde près la chute de la bille de la marque supérieure à la marque inférieure. Renouvelez cette dernière opération au moins 3 fois.

Calculez la viscosité dynamique η en millipascals-secondes, d'après l'expression :

$$\eta = k\,(\rho_1 - \rho_2) \times t$$

$k$ = constante, exprimée en millimètres carrés par seconde au carré,

$\rho_1$ = masse volumique de la bille utilisée, exprimée en grammes par centimètre cube,

$\rho_2$ = masse volumique du liquide à examiner, exprimée en grammes par centimètre cube, obtenue en multipliant sa densité $d_{20}^{20}$ par 0,9982,

$t$ = temps de chute de la bille en secondes.

**01/2010:20254**

# 2.2.54. FOCALISATION ISOÉLECTRIQUE[6]

PRINCIPES GÉNÉRAUX

La focalisation isoélectrique (FIE) est une méthode d'électrophorèse qui permet la séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique. La séparation est effectuée en plaque dans un gel de polyacrylamide ou d'agarose contenant un mélange d'électrolytes amphotères (ampholytes). Sous l'effet d'un champ électrique, ces ampholytes migrent dans le gel en créant un gradient de pH. On utilise dans certains cas des gels à gradient de pH immobilisé, obtenus par incorporation d'acides et bases faibles à des régions spécifiques du gel, lors de sa préparation. Lorsque les protéines déposées atteignent la région dont le pH correspond à leur point isoélectrique (pI), leur charge est neutralisée et leur migration s'arrête. Selon le mélange d'ampholytes choisi, il est possible de créer des gradients dans diverses gammes de pH.

ASPECTS THÉORIQUES

Lorsqu'une protéine se trouve à la position qui correspond à son point isoélectrique, sa charge nette est nulle et sa migration dans la matrice gel sous l'effet du champ électrique cesse. Le déplacement par diffusion reste néanmoins possible. Le gradient de pH force la protéine à rester à la position qui correspond à son point isoélectrique, où elle se trouve ainsi concentrée. Cet effet de concentration est appelé « focalisation ». L'augmentation de la tension appliquée ou la réduction de la quantité d'échantillon déposée a pour effet d'améliorer la séparation des bandes. Toutefois, la tension que l'on peut appliquer est limitée par la chaleur générée, qui doit être dissipée. L'emploi de gels minces et d'un système efficace de refroidissement de la plaque, contrôlé par un circulateur thermostatique, évite au gel de brûler tout en permettant une focalisation fine. La séparation est estimée par détermination de la différence ΔpI minimale à laquelle est réalisée la séparation de 2 bandes voisines :

$$\Delta \mathrm{pI} = 3 \times \sqrt{\frac{D\,(\mathrm{dpH}/\mathrm{d}x)}{E\,(-\mathrm{d}\mu/\mathrm{dpH})}}$$

$D$ = coefficient de diffusion de la protéine,

$\frac{\mathrm{dpH}}{\mathrm{d}x}$ = gradient de pH,

$E$ = intensité du champ électrique, en volts par centimètre,

$-\frac{\mathrm{d}\mu}{\mathrm{dpH}}$ = variation de la mobilité du soluté avec le pH dans la région proche du pI.

(6) Ce chapitre a fait l'objet du processus d'harmonisation des pharmacopées. Voir chapitre *5.8. Harmonisation des pharmacopées.*

Comme $D$ et $-\frac{d\mu}{dpH}$ sont invariables pour une protéine donnée, les deux moyens possibles d'améliorer la séparation sont de raccourcir l'intervalle de pH et d'augmenter l'intensité du champ électrique.

La résolution entre les bandes protéiques peut être tout à fait satisfaisante sur un gel de FIE préparé avec des ampholytes vecteurs. On peut encore l'améliorer en utilisant des gradients de pH immobilisée dans lesquels les espèces tampons, analogues aux ampholytes vecteurs, copolymérisent au sein de la matrice gel. Un gel préparé avec des ampholytes vecteurs permettra de séparer des protéines présentant une différence de pI de 0,02 unité pH, tandis que les gradients de pH immobilisés permettront de séparer des protéines dont les pI diffèrent d'environ 0,001 unité pH.

## ASPECTS PRATIQUES

Une attention particulière doit être portée aux caractéristiques et/ou à la préparation de l'échantillon. La présence de sel dans l'échantillon peut poser problème et il est préférable de préparer l'échantillon autant que possible dans de l'eau désionisée ou dans une solution d'ampholytes à 2 pour cent, à l'aide d'une dialyse ou d'une filtration sur gel si nécessaire.

Le temps requis pour réaliser la focalisation sur gel de polyacrylamide en couche mince est déterminé par dépôt d'une protéine colorée (hémoglobine par exemple) en différents points du gel, puis application du champ électrique : l'équilibre est atteint lorsque les profils d'électrophorèse obtenus avec les différents dépôts sont tous identiques. Dans certains protocoles, le point final de focalisation est déterminé en termes de durée fixée, à compter du dépôt des échantillons.

Le gel de FIE peut être utilisé à diverses fins : pour une identification si l'on compare le profil de migration sur le gel à celui d'une préparation étalon appropriée et des protéines d'étalonnage FIE ; pour un essai limite si l'on compare subjectivement la densité d'une bande FIE à la densité des bandes obtenues avec une préparation étalon ; pour un essai quantitatif, sous réserve de validation, si l'on mesure la densité à l'aide d'un densitomètre ou autre instrument semblable pour déterminer la concentration relative en protéine.

## APPAREILLAGE

Un appareillage de FIE comprend :

- un générateur réglable capable de fournir un courant constant en tension, intensité et puissance ; on opère en général sous une tension de 2500 V, considérée comme optimale dans certaines conditions opératoires ; il est recommandé d'opérer à puissance constante pouvant aller jusqu'à 30 W ;
- une cuve de FIE en plastique rigide contenant, comme support de gel, une plaque réfrigérée constituée d'un matériau approprié ;
- un couvercle en matière plastique portant des électrodes de platine qui seront mises en contact avec le gel par l'intermédiaire de mèches de papier de largeur, longueur et épaisseur appropriées, imprégnées des solutions d'électrolytes anodiques et cathodiques.

## FOCALISATION ISOÉLECTRIQUE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE : DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE LA PROCÉDURE

*La méthode décrite ci-après est une procédure de FIE sur gel de polyacrylamide en couche épaisse ; elle est à utiliser sauf indication contraire dans la monographie.*

*PRÉPARATION DES GELS*

**Moule**. Le moule (voir figure 2.2.54.-1) se compose d'une plaque de verre (A), sur laquelle est placé un film de polyester (B) destiné à faciliter la manipulation du gel, d'un ou plusieurs espaceurs (C), d'une seconde plaque de verre (D) et de pinces servant à maintenir ensemble les différents éléments.

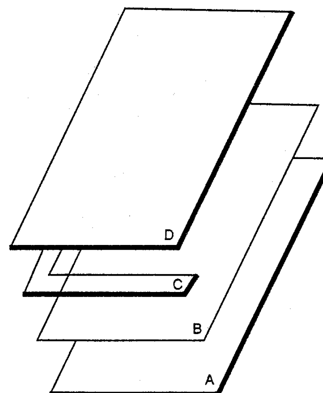



Figure 2.2.54.-1. – *Moule*

**Gel de polyacrylamide à 7,5 pour cent**. Dissolvez 29,1 g d'*acrylamide R* et 0,9 g de *méthylène bisacrylamide R* dans 100 mL d'*eau R*. A 2,5 volumes de cette solution, ajoutez le mélange d'ampholytes spécifié dans la monographie et complétez à 10 volumes avec de l'*eau R*. Mélangez avec précaution et dégazez la solution.

**Préparation du moule**. Etendez le film de polyester sur la plaque de verre inférieure, mettez en place l'espaceur, puis la seconde plaque de verre, et fixez avec les pinces. Avant emploi, placez la solution sur un agitateur magnétique et ajoutez 0,25 volume d'une solution de *persulfate d'ammonium R* à 100 g/L et 0,25 volume de *tétraméthyléthylènediamine R*. Versez immédiatement entre les plaques de verre du moule.

*MODE OPÉRATOIRE*

Démontez le moule et, à l'aide du film de polyester, transférez le gel sur le support réfrigéré, mouillé avec quelques millilitres d'un liquide approprié, en ayant soin d'éviter la formation de bulles d'air. Préparez les solutions à examiner et les solutions témoins comme indiqué dans la monographie. Disposez sur le gel des bandelettes de dépôt en papier, d'environ 10 mm × 5 mm, puis imprégnez-les avec la quantité prescrite de solution à examiner et de solution de référence. Déposez également la quantité prescrite d'une solution contenant différentes protéines de point isoélectrique connu, qui serviront de marqueurs de pH pour étalonner le gel. Certains protocoles prévoient de former dans le gel, au moment de la polymérisation, des puits où seront déposées les solutions, plutôt que sur des bandelettes de papier. Découpez à la longueur du gel 2 mèches de papier et imprégnez-les avec les solutions d'électrolytes (acide pour l'anode et alcaline pour la cathode). La composition des solutions anodique et cathodique est indiquée dans la monographie. Posez ces mèches de papier de chaque côté du gel, à plusieurs millimètres du bord. Mettez le couvercle en place de telle sorte que les électrodes soient en contact avec les mèches (en respectant les pôles anodique et cathodique). Procédez à la focalisation isoélectrique en appliquant les paramètres électriques indiqués dans la monographie. Coupez le courant lorsque la migration du mélange de protéines étalons s'est stabilisée. Utilisez une pince pour détacher du gel les bandelettes de dépôt et les 2 mèches reliées aux électrodes. Immergez le gel dans de la solution de fixation pour focalisation isoélectrique sur gel de polyacrylamide R, et incubez à température ambiante, sous agitation modérée, pendant 30 min. Videz la solution, ajoutez 200 mL de *solution de décoloration R*, et incubez sous agitation pendant 1 h. Egouttez le gel, ajoutez de la *solution de coloration au Coomassie R* et incubez pendant 30 min. Décolorez le gel par diffusion passive dans de la *solution de décoloration R* jusqu'à

ce que les bandes apparaissent nettement sur fond clair. Notez la position et l'intensité des bandes de l'électrophorégramme comme indiqué dans la monographie.

VARIATIONS PAR RAPPORT À LA PROCÉDURE DÉCRITE (SOUS RÉSERVE DE VALIDATION)

Lorsqu'il est fait référence à la méthode générale sur la focalisation isoélectrique, certaines variations de méthodologie ou de procédure sont admises sous réserve de validation. Ces variations comprennent :

- l'emploi de gels en plaques du commerce prêts à l'emploi et de kits de coloration et décoloration du commerce,
- l'emploi de gradients de pH immobilisés,
- l'emploi de gels cylindriques,
- l'emploi de gels en plaques d'autres dimensions, notamment des gels ultra-minces (0,2 mm),
- des variations portant sur la procédure de dépôt des échantillons, notamment les volumes déposés ou l'utilisation de masques de dépôt ou de mèches constituées d'un matériau autre que le papier,
- des variations portant sur les conditions de développement, notamment le champ électrique, en fonction des dimensions du gel et de l'équipement, et l'utilisation de temps de migration fixes de préférence à une interprétation subjective de la stabilité des bandes,
- l'introduction d'une étape de préfocalisation,
- l'emploi d'une instrumentation automatisée,
- l'emploi de gels d'agarose.

VALIDATION DES PROCÉDURES DE FOCALISATION ISOÉLECTRIQUE

Toute méthode alternative utilisée en remplacement de la procédure décrite doit être validée. Les critères suivants peuvent être utilisés pour valider la séparation :

- instauration d'un gradient de pH stable présentant les caractéristiques voulues, évaluées par exemple au moyen de marqueurs colorés de point isoélectrique connu,
- comparaison avec l'électrophorégramme fourni avec la substance chimique de référence correspondant à la préparation à examiner,
- tout autre critère de validation prescrit dans la monographie.

VARIATIONS SPÉCIFIÉES PAR RAPPORT À LA MÉTHODE GÉNÉRALE

Certaines variations par rapport à la méthode générale, nécessaires pour l'analyse de substances spécifiques, sont expressément spécifiées dans la monographie. Ces variations comprennent :

- l'addition d'urée dans le gel (une concentration de 3 M est souvent suffisante pour maintenir la protéine en solution de façon satisfaisante, mais une concentration allant jusqu'à 8 M peut être utilisée), pour certaines protéines qui précipitent à leur point isoélectrique : l'urée contenue dans le gel permet le maintien en solution de la protéine. Si de l'urée est utilisée, seules des solutions fraîchement préparées devraient être utilisées afin d'empêcher la carbamylation de la protéine ;
- l'emploi d'autres méthodes de coloration ;
- l'incorporation au gel d'additifs tels que des détergents non-ioniques (octylglucoside par exemple) ou zwitterioniques (CHAPS ou CHAPSO par exemple), et l'addition d'ampholytes à l'échantillon, pour empêcher l'agrégation ou la précipitation des protéines.

POINTS À CONSIDÉRER

Les échantillons peuvent être déposés sur n'importe quelle zone du gel, mais, pour protéger les protéines d'environnements à pH extrême, les échantillons ne devraient pas être appliqués près de l'une ou l'autre des électrodes. Pendant la mise au point de la méthode, l'analyste peut essayer de déposer la protéine en 3 endroits différents du gel (c'est-à-dire, au centre et aux 2 extrémités) ; le comportement d'une protéine déposée aux extrémités opposées du gel peut varier.

Un phénomène connu sous le nom de dérive cathodique, au cours duquel le gradient de pH se détériore avec le temps, peut survenir si la focalisation dure trop longtemps. Bien que ce phénomène soit encore mal compris, l'électroendosmose et l'absorption du dioxyde de carbone peuvent être des facteurs responsables de la dérive cathodique. La dérive cathodique s'observe au moment où la protéine focalisée migre hors de l'extrémité cathodique du gel. Des gradients de pH immobilisés peuvent être utilisés pour traiter ce problème.

Un refroidissement efficace (environ 4 °C) du lit sur lequel repose le gel pendant la focalisation est important. Le champ électrique élevé auquel est soumis le gel de focalisation en cours de FIE peut entraîner une surchauffe et affecter la qualité de ce dernier.

**01/2010:20255**

## 2.2.55. CARTOGRAPHIE PEPTIDIQUE[(7)]

La cartographie peptidique est une méthode d'identification des protéines, notamment celles obtenues par la méthode dite de l'ADN recombinant (ADNr). Sa mise en oeuvre s'effectue en plusieurs étapes : traitement chimique ou enzymatique de la protéine pour la fractionner en fragments peptidiques, puis séparation et identification de ces fragments par une technique reproductible. Cette méthode puissante permet d'identifier la quasi totalité des modifications ponctuelles de la séquence des acides aminés, qui peuvent résulter d'événements tels que des erreurs de lecture de séquences d'ADN complémentaire (ADNc) ou des mutations ponctuelles. La cartographie peptidique est une méthode comparative puisqu'elle se fonde sur la comparaison des données respectivement obtenues avec la substance à examiner et avec une substance de référence ayant subi le même traitement. Cette comparaison permet de confirmer la structure primaire de la protéine, de détecter d'éventuelles altérations structurelles et de démontrer la reproductibilité du processus de production ainsi que la stabilité génétique. Chaque protéine présente des caractéristiques uniques qu'il est nécessaire de bien appréhender pour pouvoir développer et valider, au travers d'approches scientifique et analytique, une procédure cartographique présentant une spécificité suffisante.

Le présent chapitre constitue un outil détaillé d'aide à l'application et à la validation de la cartographie peptidique pour caractériser la protéine considérée, évaluer la stabilité des vecteurs d'expression des cellules utilisées pour obtenir des produits ADNr, estimer la reproductibilité du processus de production dans son ensemble, évaluer la stabilité de la protéine et vérifier son identité, ou encore détecter la présence de variants protéiques.

La cartographie peptidique n'est pas une méthode à caractère universel dans le sens où le développement d'une carte peptidique est spécifique de chaque protéine. Bien que cette technologie soit en évolution rapide, il existe un certain nombre de méthodes généralement reconnues. Les variantes apportées à ces méthodes seront indiquées, le cas échéant, dans les monographies spécifiques.

La carte peptidique d'une protéine peut être comparée à une empreinte digitale. Elle constitue le résultat final d'un ensemble de processus chimiques et apporte une connaissance fine de la protéine analysée. Le développement d'une procédure cartographique comporte 4 étapes principales : isolation et purification de la protéine si celle-ci est partie composante d'une formulation, clivage sélectif des liaisons peptidiques, séparation chromatographique des peptides obtenus et enfin analyse et identification de ces peptides. Un échantillon de

(7) Ce chapitre a fait l'objet du processus d'harmonisation des pharmacopées. Voir chapitre *5.8. Harmonisation des pharmacopées.*

Tableau 2.2.55.-1. – *Exemples d'agents de clivage*

| Type | Agent | Spécificité |
|---|---|---|
| Enzymatique | Trypsine (EC 3.4.21.4) | Côté *C*-terminal de Arg et Lys |
| | Chymotrypsine (EC 3.4.21.1) | Côté *C*-terminal des résidus hydrophobes (par exemple Leu, Met, Ala, composés aromatiques) |
| | Pepsine (EC 3.4.23.1 et 2) | Hydrolyse non spécifique |
| | Lysyl endopeptidase (Lys-C endopeptidase) (EC 3.4.21.50) | Côté *C*-terminal de Lys |
| | Glutamyl endopeptidase (de la souche V8 de *S. aureus*) (EC 3.4.21.19) | Côté *C*-terminal de Glu et Asp |
| | Peptidyl-Asp métallo-endopeptidase (endoprotéinase Asp-N) | Côté *N*-terminal de Asp |
| | Clostripaïne (EC 3.4.22.8) | Côté *C*-terminal de Arg |
| Chimique | Bromure de cyanogène | Côté *C*-terminal de Met |
| | Acide 2-nitro-5-thio-cyanobenzoïque | Côté *N*-terminal de Cys |
| | Acide *O*-iodosobenzoïque | Côté *C*-terminal de Trp et Tyr |
| | Acide dilué | Asp et Pro |
| | BNPS-skatole | Trp |

la substance est hydrolysé, puis dosé en parallèle avec une substance de référence. Les chances d'obtenir un clivage total des liaisons peptidiques sont plus grandes avec des enzymes de type endoprotéases (par exemple la trypsine) qu'avec des agents de clivage chimiques. Pour être utile, une carte doit comprendre suffisamment de peptides, sans toutefois que les fragments soient trop nombreux : la carte risque alors de perdre de sa spécificité, car un trop grand nombre de protéines présenteront le même profil.

ISOLATION ET PURIFICATION

L'isolation et la purification sont des étapes nécessaires de l'analyse de préparations en vrac ou de formes pharmaceutiques contenant des excipients ou des vecteurs protéiques susceptibles d'interférer dans l'analyse. Ces étapes sont alors décrites dans la monographie de la substance considérée. Le recouvrement quantitatif de la protéine à partir de la forme pharmaceutique doit être validé.

CLIVAGE SÉLÉCTIF DES LIAISONS PEPTIDIQUES

Le choix de l'approche à utiliser pour le clivage des liaisons peptidiques dépendra de la protéine à analyser. Ce choix nécessite de déterminer le type de clivage (enzymatique ou chimique) à mettre en oeuvre et le type d'agent de clivage à choisir dans la catégorie voulue. Plusieurs agents de clivage sont cités dans le tableau 2.2.55.-1, avec leur spécificité d'action. Cette liste n'est pas exhaustive et sera complétée au fur et à mesure que d'autres agents de clivage seront identifiés.

**Prétraitement de l'échantillon**. Selon la taille ou la configuration de la protéine, différentes approches sont possibles pour le prétraitement des échantillons. Si l'on utilise de la trypsine comme agent de clivage pour des protéines de masse moléculaire supérieure à 100 000 Da, il faudra protéger les résidus lysine par citraconylation ou maléylation, afin de ne pas obtenir de trop nombreux peptides.

**Prétraitement de l'agent de clivage**. Il peut être nécessaire de procéder à une prépurification des agents de clivage, notamment ceux de type enzymatique, pour garantir la reproductibilité des cartes obtenues. La trypsine par exemple, sera traitée par la tosyl-L-phénylalanine chlorométhylcétone pour inactiver la chymotrypsine. D'autres méthodes, par exemple la purification de la trypsine par chromatographie liquide haute performance (CLHP) ou l'immobilisation de l'enzyme sur un gel, donnent de bons résultats lorsque l'on ne dispose que de faibles quantités de protéine.

**Prétraitement de la protéine**. Dans certaines conditions, il peut être nécessaire de concentrer l'échantillon ou de séparer la protéine des excipients ou stabilisants entrant dans la formulation du produit, si ceux-ci sont susceptibles d'interférer dans la procédure de cartographie. Divers procédés physiques sont utilisés à cet effet, par exemple l'ultrafiltration, la chromatographie sur colonne et la lyophilisation. D'autres prétraitements peuvent être utilisés pour déployer la chaîne protéique avant la cartographie, par exemple l'addition d'agents chaotropiques tels que l'urée. Pour faciliter l'accès de l'enzyme aux sites de clivage et permettre un déploiement partiel de la protéine, il est souvent nécessaire de réduire et d'alkyler les ponts disulfure avant l'hydrolyse.

L'hydrolyse par la trypsine peut introduire des ambiguïtés dans la carte peptidique obtenue, à cause de réactions secondaires se produisant en cours d'hydrolyse. Ces réactions peuvent être de diverse nature : clivage non spécifique, désamidation, isomérisation disulfure, oxydation des résidus méthionine, formation de groupes pyroglutamiques par désamidation de la glutamine à l'extrémité *N*-terminale d'un peptide. Par ailleurs, il peut apparaître des pics résultant de l'auto-hydrolyse de la trypsine. Leur intensité dépend du rapport de concentration trypsine/protéine. Pour éviter ce phénomène d'auto-hydrolyse, on peut préparer des solutions de protéase à pH non optimal (par exemple pH 5 pour la trypsine) : l'enzyme ne deviendra alors active qu'après dilution avec le tampon d'hydrolyse.

**Définition des conditions optimales d'hydrolyse**. Les facteurs agissant sur le degré d'hydrolyse atteint et l'efficacité de l'hydrolyse des protéines sont les mêmes que ceux qui peuvent affecter toute réaction chimique ou enzymatique.

*pH du milieu réactif*. On détermine empiriquement le pH du mélange réactif pour optimiser l'action de l'agent de clivage considéré. S'il s'agit de bromure de cyanogène, par exemple, un environnement fortement acide est nécessaire (par exemple pH 2, acide formique) ; à l'inverse, dans le cas de la trypsine, l'environnement optimal est légèrement alcalin (pH 8). En règle générale, le pH du milieu réactif ne doit ni altérer l'intégrité chimique de la protéine au cours de l'hydrolyse, ni varier pendant la réaction de fragmentation.

*Température*. Une température de 25-37 °C convient dans la plupart des cas. La température est choisie de façon à limiter autant que possible le risque de réactions chimiques secondaires. La température optimale du milieu réactif dépend du type de protéine considéré, certaines protéines étant davantage susceptibles que d'autres à une dénaturation lorsque la température augmente. Par exemple, l'hydrolyse de la somatropine bovine recombinante est conduite à 4 °C car, à température plus élevée, il se produit une précipitation de la substance en cours d'hydrolyse.

*Temps*. Si l'on dispose d'un échantillon suffisant, il peut être envisagé d'effectuer une étude expérimentale visant à déterminer le temps optimal requis pour obtenir une carte reproductible et éviter une hydrolyse incomplète. La durée

d'hydrolyse peut varier de 2 h à 30 h. On stoppe la réaction par addition d'un acide n'interférant pas dans la cartographie ou par congélation.

*Quantité d'agent de clivage utilisée*. Bien que l'agent de clivage soit utilisé en excès pour permettre une réaction raisonnablement rapide (de l'ordre de 6-20 h), il convient de l'utiliser en quantité la plus faible possible pour éviter qu'il interfère dans l'image chromatographique obtenue. On opère généralement avec un rapport protéine/protéase de 20:1 à 200:1, et il est recommandé d'ajouter l'agent de clivage en 2 temps (ou davantage) pour optimiser le processus. Le volume réactif final doit toutefois rester assez faible pour faciliter l'étape suivante de la cartographie peptidique, celle de la séparation. Pour vérifier l'absence d'artefacts d'hydrolyse susceptibles de perturber la suite de l'analyse, on effectue une détermination à blanc en utilisant un témoin d'hydrolyse contenant tous les réactifs sauf la protéine à analyser.

SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

Il existe de nombreuses techniques de séparation des peptides en vue de la cartographie. Le choix de l'une ou l'autre d'entre elles sera fonction de la protéine considérée. Le tableau 2.2.55.-2 donne un aperçu des techniques ayant fait leurs preuves dans la séparation des peptides. La méthode très couramment utilisée de CLHP en phase inversée qui est décrite dans cette section constitue l'une des procédures de séparation chromatographique possibles.

Tableau 2.2.55.-2. – *Techniques utilisées pour la séparation des peptides*

| |
|---|
| Chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inversée |
| Chromatographie à échange d'ions (CEI) |
| Chromatographie à interaction hydrophobe |
| Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE), conditions non dénaturantes |
| Electrophorèse sur gel de polyacrylamide au dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) |
| Electrophorèse capillaire (EC) |
| Chromatographie sur papier sous haute tension |
| Electrophorèse sur papier sous haute tension |

La pureté des solvants et des phases mobiles est un facteur critique des séparations chromatographiques. L'emploi de solvants et d'eau de qualité CLHP, disponibles dans le commerce, est recommandé pour la CLHP en phase inversée. La présence de gaz dissous constitue un problème dans les systèmes à gradient, car la solubilité du gaz dans un solvant peut être moindre en mélange que dans le solvant seul. Le dégazage sous vide et le traitement aux ultrasons sont des méthodes éprouvées de dégazage. Quant aux particules solides éventuellement contenues dans les solvants, elles peuvent, en passant dans le système chromatographique, altérer l'étanchéité des valves de la pompe ou colmater la tête de la colonne. Une filtration en amont et en aval de la pompe est donc recommandée.

**Colonne chromatographique**. Le choix de la colonne chromatographique est effectué de façon empirique pour chaque protéine. La séparation peut être optimale avec des colonnes remplies de gel de silice ayant un diamètre de pores de 10 nm ou 30 nm. Pour les peptides de petite taille, le *gel de silice octylsilylé pour chromatographie R* (3-10 µm) et le *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (3-10 µm) sont mieux adaptés que le *gel de silice butylsilylé pour chromatographie R* (5-10 µm).

**Solvant**. Le solvant le plus couramment employé est l'eau avec comme modificateur organique de l'acétonitrile additionné d'au maximum 0,1 pour cent d'acide trifluoracétique. On peut si nécessaire ajouter de l'alcool propylique ou isopropylique pour solubiliser les produits d'hydrolyse, à condition qu'il n'en résulte pas d'augmentation excessive de la viscosité de l'hydrolysat.

**Phase mobile**. On utilise des phases mobiles tamponnées au phosphate pour permettre une certaine flexibilité dans la sélection des conditions de pH, car les fluctuations de pH dans l'intervalle 3,0-5,0 favorisent la séparation des peptides qui contiennent des résidus acides (acides glutamique et aspartique par exemple). Le phosphate de sodium ou de potassium, l'acétate d'ammonium, l'acide phosphorique sont également utilisés, à un pH compris entre 2 et 7 (ou plus élevé pour les supports à base de polymères) et avec un gradient en acétonitrile. De l'acétonitrile additionné d'acide trifluoracétique est couramment utilisé.

**Gradient**. Le gradient peut être linéaire, non linéaire, ou par paliers. Un gradient lent est recommandé pour la séparation des mélanges complexes. On procède à une optimisation du gradient de façon à obtenir une bonne résolution pour 1 ou 2 pics, qui deviendront des "marqueurs" pour l'essai.

**Élution isocratique**. Des systèmes de CLHP à élution isocratique, utilisant une seule phase mobile, peuvent être choisis pour leur commodité d'emploi et pour une meilleure réponse du détecteur. Il est parfois difficile de déterminer la composition optimale de la phase mobile pour obtenir une bonne résolution de tous les pics. Il est déconseillé d'utiliser pour les CLHP isocratiques des phases mobiles où de légères variations de la proportion des composants ou du pH affectent significativement les temps de rétentions des pics de la carte peptidique.

**Autres paramètres**. Une régulation de la température de la colonne est généralement nécessaire pour obtenir une reproductibilité satisfaisante. Le débit de la phase mobile est de l'ordre de 0,1-2,0 mL/min, et la détection des peptides est effectuée par un détecteur UV à une longueur d'onde de 200-230 nm. D'autres méthodes de détection sont également utilisées (par exemple la dérivatisation post-colonne), mais elles ne sont ni aussi robustes ni aussi universelles que la détection UV.

**Validation**. Cette section décrit une approche expérimentale visant à mesurer les performances globales de la méthode d'essai. Les critères d'acceptation pour la conformité du système reposent sur l'identification de paramètres critiques affectant l'interprétation et l'acceptation des résultats. Ces paramètres critiques interviennent également dans le suivi des étapes d'hydrolyse et d'analyse des peptides. Pour s'assurer que le point final d'hydrolyse souhaité a été atteint, un indicateur possible est la comparaison avec une substance de référence à laquelle a été appliqué le même traitement qu'à la protéine considérée. L'analyse en parallèle de la protéine à examiner et d'une substance de référence constitue un aspect clé du développement et de l'établissement des limites de conformité du système. Un chromatogramme est en outre fourni avec la substance de référence pour faciliter la comparaison. Il existe d'autre indicateurs possibles : on peut par exemple évaluer visuellement la solubilité de la protéine ou du peptide, vérifier l'absence de protéine intacte, ou mesurer les réponses d'un peptide dépendant de l'hydrolyse. Les paramètres critiques de conformité du système, pour une analyse peptidique, dépendront du mode particulier de séparation et de détection des peptides, ainsi que des exigences en rapport avec l'analyse des données.

Lorsque la cartographie peptidique est utilisée pour une identification, les critères de conformité du système pour les peptides identifiés comprennent la sélectivité et la fidélité. Dans ce cas, de même que pour l'identification de formes variantes, l'identification de la structure primaire des fragments peptidiques de la carte permet aussi bien de confirmer une structure primaire connue que d'identifier les formes variantes d'une protéine, par comparaison à la carte peptidique de la substance de référence correspondant à cette protéine. L'emploi d'une telle substance de référence, ayant subi le même processus d'hydrolyse, est la méthode recommandée pour déterminer la résolution entre les peptides. Pour l'analyse d'une protéine variante, il est possible d'utiliser un mélange caractérisé d'une

variante et d'une substance de référence, notamment si le peptide variant est situé dans une région de la carte où la résolution n'est pas optimale. L'indicateur de reproductibilité du profil peptidique peut être simplement le nombre de peptides majeurs détecté, mais la meilleure représentation qui puisse en être donnée est la résolution des pics peptidiques. Divers paramètres chromatographiques (résolution entre les pics, largeur maximale des pics, surface des pics, facteur de symétrie des pics, efficacité de la colonne) peuvent être utilisés pour définir la résolution des peptides. Selon la nature de la protéine considérée et la méthode de séparation utilisée, il pourra être nécessaire de spécifier des exigences de résolution portant sur un seul ou sur plusieurs peptides.

La répétition de l'analyse de l'hydrolysat obtenu à partir de la substance de référence de la protéine considérée fournit des indications sur la fidélité et le taux de recouvrement. Les études de recouvrement des peptides identifiés sont généralement effectuées au moyen d'étalons peptidiques, internes ou externes. La fidélité est exprimée en termes d'écart type relatif (ETR). Le recouvrement des peptides identifiés et la fidélité sont susceptibles de présenter des différences ; il convient donc d'établir les limites de conformité du système à la fois pour le recouvrement des peptides identifiés et pour la fidélité. Ces limites sont strictement spécifiques de la protéine considérée et seront indiquées dans la monographie de cette protéine.

On procède tout d'abord à une évaluation visuelle des chromatogrammes, sous divers aspects : rétentions relatives, amplitude des réponses (surface ou hauteur des pics), nombre de pics, profil général d'élution. Cet examen est ensuite complété et confirmé par l'analyse mathématique des facteurs de réponse et l'évaluation du profil chromatographique d'un mélange à volumes égaux des hydrolysats de la substance à examiner et de la substance de référence (mélange 1:1 *V/V*). Si tous les pics obtenus avec les 2 hydrolysats ont les mêmes rétentions relatives et les mêmes facteurs de réponse, l'identité de la substance à examiner est confirmée.

En revanche, l'observation d'un pic unique dans le mélange 1:1 là où plusieurs pics élués à des rétentions relatives significativement différentes avaient été initialement observés, indique une certaine variabilité du système. L'obtention de pics séparés avec le mélange 1:1 constitue la preuve de la non équivalence des peptides contenus dans chaque pic. L'observation avec le mélange 1:1 d'un pic significativement plus large que le pic correspondant initialement obtenu avec l'échantillon et la substance de référence peut indiquer la présence de peptides différents. L'emploi de logiciels d'assistance à la reconnaissance de formes pour l'analyse des données de cartographie peptidique a été proposé, et appliqué, mais les problèmes que pose leur validation excluent toute perspective d'utilisation à court terme de ces logiciels dans des essais de pharmacopée. Il existe d'autres approches automatisées utilisant des formules mathématiques, des modèles et la reconnaissance de formes : il s'agit par exemple de l'identification automatique de composés par spectrophotométrie IR ou de l'application à l'analyse des peptides de l'analyse spectrale à barrettes de diodes UV. Ces méthodes présentent toutefois certaines limites, liées à une résolution insuffisante, à la co-élution de fragments ou à des différences absolues de réponse entre les fragments produits par l'hydrolyse de la substance de référence et de la substance à examiner.

La comparaison numérique des temps de rétention, ainsi que de la surface ou la hauteur des pics, peut porter sur un groupe convenablement sélectionné de pics ayant été correctement identifiés dans les cartes peptidiques. L'aire des pics peut être calculée par rapport à 1 pic unique présentant des variations relativement faibles, utilisé comme étalon interne, en n'oubliant pas que l'intégration des pics est sensible aux fluctuations de la ligne de base et qu'elle est susceptible d'introduire une erreur dans les résultats. Une autre possibilité consiste à rapporter la hauteur de chaque pic à la hauteur totale de l'ensemble des pics du chromatogramme obtenu avec la substance à examiner, et à comparer les pourcentages ainsi calculés à ceux obtenus pour les pics correspondants de la substance de référence. L'éventualité d'une auto-hydrolyse de la trypsine est contrôlée au travers d'une carte peptidique établie en traitant une solution à blanc par la trypsine.

L'exigence minimale pour la qualification d'une cartographie peptidique est l'utilisation d'une procédure d'essai approuvée incluant un moyen de contrôle sous forme de critères de conformité du système. En règle générale, aux premiers stades du processus réglementaire, la qualification de la cartographie pour une protéine est suffisante. Au fur et à mesure que progresse le processus réglementaire d'autorisation pour cette protéine, la qualification de l'essai peut être complétée par une validation partielle de la procédure analytique qui vise à apporter l'assurance que la méthode sera à la hauteur des performances prévues lors du développement d'une carte peptidique pour la protéine spécifiée.

## ANALYSE ET IDENTIFICATION DES PEPTIDES

*La section qui suit constitue un guide pour l'utilisation de la cartographie peptidique en cours de développement, comme support aux demandes d'AMM.*

L'emploi de la cartographie peptidique comme outil d'analyse qualitative ne requiert pas la caractérisation complète des pics peptidiques. En revanche, la validation de la cartographie peptidique dans le cadre des demandes d'autorisation de mise sur le marché (AMM) exige une caractérisation rigoureuse de chacun des pics de la carte peptidique. Les méthodes de caractérisation des pics vont du séquençage *N*-terminal de chaque pic peptidique suivi d'une analyse des acides aminés à la spectrométrie de masse (SM).

Dans le cas d'une caractérisation par séquençage *N*-terminal et analyse des acides aminés, la séparation analytique est effectuée à plus grande échelle. Ce changement d'échelle pouvant affecter la résolution des pics peptidiques, il est nécessaire de s'assurer, sur la base de données empiriques, qu'il n'a pas entraîné de perte de résolution. Les éluats correspondant aux différents pics peptidiques sont collectés, concentrés sous vide, puis soumis si nécessaire à une nouvelle chromatographie. L'analyse des fragments peut être limitée par la taille des peptides. Si l'extrémité *N*-terminal est bloquée, il peut être nécessaire de la libérer avant de procéder au séquençage. Le séquençage *C*-terminal des protéines, en combinaison avec l'utilisation de carboxypeptidase et l'analyse par SM de type MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation coupled to Time of Flight) c'est à dire à ionisation par désorption laser avec analyse à temps de vol, peut également être utilisé pour la caractérisation.

Dans le cas d'une caractérisation des fragments peptidiques par SM, on procède à l'analyse de structure soit par introduction directe des peptides isolés soit par couplage en ligne CL-SM. Les différentes techniques de SM mises en oeuvre comprennent l'ionisation par électronébulisation (electrospray), l'ionisation de type MALDI-TOF et l'ionisation par bombardement d'atomes (Fast Atom Bombardment ou FAB). La SM en tandem (SM-SM) est également utilisée pour séquencer une protéine modifiée et déterminer le type de modification intervenu dans la séquence. La comparaison des spectres de masse respectivement obtenus avant et après réduction de l'hydrolysat permet de repérer les ponts disulfures et les peptides à groupes sulfhydryle correspondants.

Si certaines régions de la structure primaire restent mal déterminées sur la carte peptidique, il peut être nécessaire d'établir une carte peptidique secondaire. L'objectif d'une méthode validée de caractérisation d'une protéine par cartographie peptidique est de retrouver et confirmer à au moins 95 pour cent la composition théorique de la protéine.

01/2010:20256

# 2.2.56. ANALYSE DES ACIDES AMINÉS(8)

L'analyse des acides aminés est la méthodologie utilisée pour déterminer la composition ou la teneur en acides aminés de protéines, peptides ou autres préparations pharmaceutiques. Les protéines et les peptides sont des macromolécules composées de résidus acides aminés associés par liaison covalente pour former un polymère linéaire. La séquence des acides aminés composant une protéine ou un peptide détermine les propriétés de la molécule. On appelle communément protéines les molécules de grande taille, qui présentent en général une structure tridimensionnelle de conformation spécifique, tandis que les peptides sont des molécules plus petites ne comprenant parfois que quelques acides aminés. L'analyse des acides aminés peut être utilisée à diverses fins : quantification de protéines ou de peptides, détermination de leur identité sur la base de leur composition en acides aminés, contribution à leur analyse structurelle, évaluation des stratégies de fragmentation pour la cartographie peptidique et détection de la présence éventuelle d'acides aminés atypiques dans des protéines ou peptides. L'analyse d'une protéine/peptide exige son hydrolyse préalable en acides aminés constitutifs. Une fois cette hydrolyse réalisée, la procédure à suivre pour effectuer l'analyse des acides aminés est la même que celle utilisée pour l'analyse des acides aminés libres dans d'autres préparations pharmaceutiques. Pour analyser les acides aminés constituant la préparation à examiner, il est courant de procéder à une dérivatisation.

## APPAREILLAGE

Les méthodes utilisées pour l'analyse des acides aminés reposent généralement sur une séparation chromatographique des acides aminés présents dans la préparation à examiner. Les techniques actuelles bénéficient de l'automatisation des systèmes chromatographiques conçus pour les procédures analytiques. Un appareillage type d'analyse des acides aminés comporte un système de chromatographie liquide (basse ou haute pression) capable de générer des gradients de composition de la phase mobile qui conduisent à une séparation des acides aminés le long de la colonne. Il doit aussi comporter un système de dérivatisation post-colonne, à moins que l'analyse de l'échantillon ne repose sur une dérivatisation précolonne. La détection est généralement réalisée par un détecteur ultraviolet/visible ou un détecteur fluorimétrique, selon la méthode de dérivatisation utilisée. Un système d'enregistrement (intégrateur par exemple) assure la transformation du signal analogique délivré par le détecteur et la quantification. Il est préférable d'utiliser pour l'analyse des acides aminés des appareillages spécialement conçus à cet effet.

## PRÉCAUTIONS GÉNÉRALES

La contamination de fond constitue un souci constant en matière d'analyse des acides aminés. L'emploi de réactifs de haute pureté est nécessaire (de l'acide chlorhydrique de pureté médiocre peut par exemple contribuer à une contamination interne par la glycine). Les réactifs sont à renouveler toutes les quelques semaines, et tous les solvants utilisés sont de qualité chromatographie liquide haute-pression (CLHP). Pour réduire les risques de contamination microbienne et de présence de substances étrangères dans les solvants, ceux-ci sont filtrés avant emploi et conservés en récipients couverts, et on évite d'exposer l'appareillage à la lumière directe du soleil.

Les pratiques de laboratoire peuvent conditionner la qualité de l'analyse. Placez les instruments dans une zone à faible passage. Veillez à maintenir la propreté des installations. Nettoyez et étalonnez les pipettes selon une procédure de maintenance établie. Conservez les pointes distributrices dans une boîte fermée, et évitez de les manipuler à main nue ; on peut porter des gants en latex non poudrés, ou équivalent. Limitez le nombre d'ouvertures et de fermetures des flacons contenant les échantillons, car la poussière peut contribuer à générer des taux élevés de glycine, sérine et alanine.

La bonne maintenance de l'instrumentation est une condition nécessaire à l'obtention de résultats d'analyse acceptables. Si l'instrument est utilisé en routine, il doit faire l'objet de contrôles quotidiens portant sur la détection de fuites, la stabilité du détecteur et des sources lumineuses, et l'aptitude de la colonne à maintenir la résolution entre les acides aminés. Nettoyez ou remplacez régulièrement l'ensemble des filtres et autres éléments de maintenance.

## MATÉRIEL DE RÉFÉRENCE

Il existe dans le commerce, pour l'analyse des acides aminés, des préparations étalons d'acides aminés appropriées qui se composent en général d'un mélange d'acides aminés en solution aqueuse. Par ailleurs, lors de la détermination d'une composition en acides aminés, on analyse en même temps que la préparation à examiner des étalons protéiques ou peptidiques, qui servent de témoins pour démontrer l'intégrité de la procédure dans son ensemble. De la sérum-albumine bovine hautement purifiée est par exemple utilisée à cet effet comme étalon protéique.

## ÉTALONNAGE DE L'APPAREILLAGE

L'étalonnage de l'appareillage destiné à l'analyse des acides aminés s'effectue classiquement par analyse d'une préparation étalon d'acides aminés, constituée d'un mélange d'acides aminés à diverses concentrations, qui permet de déterminer pour chaque acide aminé le facteur de réponse et le domaine de validité de l'analyse. La concentration de chaque acide aminé dans cette préparation est connue. Pour procéder à l'étalonnage, l'analyste prépare plusieurs dilutions de la préparation étalon de façon à obtenir, pour chaque acide aminé, différentes concentrations comprises dans le domaine de linéarité attendu de la technique utilisée. Plusieurs répétitions de l'analyse peuvent alors être effectuées pour chacune de ces concentrations. On établit, pour chaque acide aminé, le graphe de la surface des pics obtenus en fonction de la concentration connue dans les dilutions de la préparation étalon. L'analyste peut ainsi déterminer, pour un acide aminé donné, l'intervalle de concentrations sur lequel la surface des pics est sensiblement proportionnelle à la concentration. Pour assurer l'exactitude et la répétabilité des résultats, il est important de préparer les échantillons à analyser de façon à ce qu'ils se situent dans les limites analytiques de la technique utilisée (par exemple l'intervalle de linéarité).

L'analyse de 4 à 6 niveaux de concentration est nécessaire pour déterminer le facteur de réponse de chaque acide aminé, qui est calculé en termes de surface ou hauteur de pic moyenne par nanomole d'acide aminé présent dans l'échantillon. Une fiche d'étalonnage indiquant le facteur de réponse de chaque acide aminé est alors établie et utilisée pour calculer la concentration de chaque acide aminé présent dans l'échantillon à examiner. Pour effectuer ce calcul, il faut diviser la surface du pic obtenu pour l'acide aminé considéré par le facteur de réponse correspondant, afin d'obtenir la quantité d'acide aminé en nanomoles. Pour les analyses de routine, un étalonnage à un seul point peut être suffisant, mais la fiche d'étalonnage doit être mise à jour fréquemment et sa validité contrôlée par analyse de témoins analytiques.

## RÉPÉTABILITÉ

Pour obtenir de façon régulière des résultats d'analyse de bonne qualité, la répétabilité de la procédure analytique est un facteur important. Le chromatogramme obtenu par séparation chromatographique des acides aminés ou de leurs dérivés présente de nombreux pics correspondant aux différents acides aminés. Du fait du nombre élevé de ces pics, il est nécessaire de disposer d'un système d'analyse qui permette de réaliser, avec une bonne répétabilité, l'identification des pics sur la base du

(8) Ce chapitre a fait l'objet du processus d'harmonisation des pharmacopées. Voir chapitre *5.8. Harmonisation des pharmacopées.*

temps de rétention et leur quantification par intégration des surfaces. Une méthode classique d'évaluation de la répétabilité consiste à préparer une préparation étalon d'acides aminés et à en effectuer l'analyse avec de nombreuses répétitions (par exemple 6 ou davantage). On détermine alors, pour chaque acide aminé, l'écart type relatif (ETR) des temps de rétention et des surfaces de pics obtenus. L'évaluation de la répétabilité nécessite la réalisation d'analyses multiples effectuées à des jours et par des analystes différents. Ces analyses multiples comprennent la préparation de dilutions étalons à partir de la prise d'essai, pour permettre l'étude de la variabilité associée aux manipulations de l'échantillon. L'évaluation de la répétabilité comprend souvent aussi l'analyse de la composition en acides aminés d'une protéine étalon (par exemple de la sérum-albumine bovine). L'évaluation de la variabilité associée aux répétitions (ETR) permet alors d'établir des limites de variation qui apporteront la garantie que les analyses effectuées par le laboratoire sont bien maîtrisées. Il est souhaitable, pour garantir les meilleurs résultats possible, que les limites de variation ainsi établies soient les plus faibles possible. Les aspects critiques à considérer pour réduire la variabilité des analyses d'acides aminés sont la préparation des échantillons, les interférences spectrales (bruit de fond) dues à la qualité des réactifs et/ou aux pratiques de laboratoire, les performances et la maintenance des instruments, l'analyse et l'interprétation des données, la qualité et les habitudes de travail de l'opérateur. Tous les paramètres en jeu font l'objet d'une étude approfondie dans le cadre des travaux de validation.

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

L'obtention de résultats exacts lors d'une analyse des acides aminés exige la purification préalable des échantillons protéiques/peptidiques. Les constituants des tampons (sels, urée, détergents, etc.) peuvent interférer dans l'analyse et sont donc préalablement éliminés. Ces constituants affectent généralement à un moindre degré les méthodes qui reposent sur une dérivatisation post-colonne des acides aminés que celles qui utilisent une dérivatisation précolonne. Il est souhaitable de limiter le nombre de manipulations des échantillons pour réduire les risques de bruit de fond, améliorer le recouvrement des acides aminés et simplifier le travail. Plusieurs techniques sont couramment utilisées pour éliminer les constituants des tampons : (1) injection de l'échantillon protéique dans un système de CLHP à phase inversée, séparation de la protéine avec un solvant volatil contenant un composant organique suffisant et séchage de l'échantillon par centrifugation sous vide ; (2) dialyse contre un tampon volatil ou de l'eau ; (3) ultrafiltration avec centrifugation pour remplacer le tampon par un autre tampon volatil ou de l'eau ; (4) séparation de la protéine et du tampon par précipitation au moyen d'un solvant organique (acétone par exemple) ; (5) filtration sur gel.

ÉTALONS INTERNES

Il est recommandé d'utiliser un étalon interne pour contrôler les déperditions et variations physiques et chimiques au cours de l'analyse. On peut à cet effet ajouter à la solution protéique, avant hydrolyse, une quantité exactement connue d'un étalon interne. Le recouvrement obtenu pour cet étalon interne donne une évaluation générale du recouvrement des acides aminés présents dans la solution protéique. Toutefois, les acides aminés libres n'ont pas le même comportement que les acides aminés constitutifs d'une protéine dont le taux de libération ou de destruction au cours de l'hydrolyse est variable. De ce fait, l'utilisation d'un étalon interne pour évaluer les pertes en cours d'hydrolyse et appliquer les corrections nécessaires ne donnera pas forcément des résultats fiables, et il faudra prendre ce point en considération dans l'interprétation des résultats. On peut également ajouter des étalons internes au mélange d'acides aminés obtenu après hydrolyse, pour évaluer les variations liées au dépôt des échantillons, à la stabilité des réactifs et au débit, et apporter les corrections nécessaires. Dans l'idéal, un étalon interne est un acide aminé primaire n'existant pas à l'état naturel, disponible dans le commerce et de faible coût. Il doit également être stable lors de l'hydrolyse, donner une réponse proportionnelle à la concentration, et être élué à un temps de rétention unique, sans interférence avec les autres aides aminés. Les étalons internes les plus couramment utilisés sont la norleucine, la nitrotyrosine et l'acide α-aminobutyrique.

HYDROLYSE DE LA PROTÉINE OU DU PEPTIDE

L'analyse des échantillons de protéines/peptides exige l'hydrolyse préalable de ces molécules. La verrerie utilisée doit être très propre pour ne pas fausser les résultats. La présence sur les tubes d'hydrolyse d'empreintes digitales ou de traces de poudre provenant des gants peut entraîner une contamination. Pour nettoyer les tubes d'hydrolyse en verre, faites-les bouillir pendant 1 h dans de l'acide chlorhydrique 1 M ou plongez-les dans de l'acide nitrique concentré ou dans un mélange à volumes égaux d'acide chlorhydrique concentré et d'acide nitrique. Rincez ensuite les tubes avec de l'eau de haute pureté, puis avec du méthanol de qualité CLHP, laissez-les sécher à l'étuve pendant toute une nuit, puis stockez-les couverts jusqu'au moment de l'emploi. La décontamination peut également être réalisée par pyrolyse des tubes propres à 500 °C pendant 4 h. On peut aussi utiliser du matériel de laboratoire à usage unique.

L'hydrolyse acide est la méthode d'hydrolyse la plus couramment utilisée dans le cadre des analyses d'acides aminés. Elle constitue toutefois une source potentielle de variabilité en raison de la destruction totale ou partielle de plusieurs acides aminés : destruction du tryptophane, destruction partielle de la sérine et de la thréonine, risque d'oxydation de la méthionine, transformation de la cystéine en cystine (mais le recouvrement de la cystine est en général médiocre du fait de sa destruction partielle ou de sa réduction en cystéine). Il est possible de limiter la destruction oxydative par application d'un vide approprié (moins de 200 µm de mercure ou 26,7 Pa) ou par introduction d'un gaz inerte (argon) dans l'espace de tête du récipient où se déroule la réaction. Le clivage des liaisons peptidiques impliquant l'isoleucine et la valine (Ile-Ile, Val-Val, Ile-Val, Val-Ile) n'est que partiel, et il se produit une désamination de l'asparagine et de la glutamine qui donnent respectivement de l'acide aspartique et de l'acide glutamique. La perte du tryptophane, de l'asparagine et de la glutamine lors d'une hydrolyse acide réduit à 17 le nombre d'acides aminés quantifiables. Plusieurs des autres méthodes d'hydrolyse décrites plus loin visent à éviter ces problèmes. Certaines de ces méthodes (par exemple les méthodes 4 à 11) peuvent toutefois entraîner des modifications touchant d'autres acides aminés. Il convient donc, avant d'adopter une technique d'hydrolyse autre que l'hydrolyse acide, de bien en peser les avantages et les inconvénients, et de la mettre à l'épreuve.

On a souvent recours à une étude temporelle (réalisation d'une analyse des acides aminés après 24 h, 48 h et 72 h d'hydrolyse) pour déterminer la concentration initiale des acides aminés qui subissent une destruction partielle ou dont le clivage est lent. La représentation graphique des concentrations observées pour les acides aminés instables (sérine et thréonine par exemple) en fonction de la durée d'hydrolyse permet, en extrapolant la droite jusqu'à l'origine, de déterminer leur concentration initiale. Dans le cas des acides aminés à clivage lent (isoleucine et valine par exemple), la courbe d'étude temporelle présente un plateau dont l'ordonnée représente la concentration du résidu considéré. Si la durée d'hydrolyse est trop longue, la concentration commence à décroître, ce qui indique une destruction liée aux conditions d'hydrolyse.

Une alternative acceptable à ces études temporelles consiste à soumettre une préparation étalon d'acides aminés aux mêmes conditions d'hydrolyse que l'échantillon à examiner. Le taux de destruction des acides aminés libres en cours d'hydrolyse peut toutefois ne pas être totalement représentatif de celui des mêmes acides aminés constitutifs d'une protéine ou d'un peptide. Ceci se vérifie notamment dans le cas des liaisons peptidiques à clivage lent (liaisons Ile-Val par exemple). Néanmoins, cette technique permet une prise en compte partielle de la

destruction du résidu. L'hydrolyse acide par micro-ondes, également utilisée, est une technique rapide mais exigeant un équipement spécial et des précautions particulières. Les conditions optimales d'hydrolyse doivent être déterminées pour chaque échantillon protéique/peptidique. La durée d'hydrolyse requise est en général de l'ordre de quelques minutes, mais un écart d'une minute peut suffire à fausser les résultats (hydrolyse incomplète ou destruction des acides aminés labiles). On a également parfois recours à une protéolyse totale par un mélange de protéases, mais cette technique peut être compliquée, exige l'emploi de témoins adéquats et se prête en général mieux à l'analyse des peptides qu'à celle des protéines.

Lors de l'analyse initiale d'une protéine inconnue, on procède à une étude expérimentale en faisant varier la durée d'hydrolyse et la température, afin de déterminer les conditions optimales.

*MÉTHODE 1*

L'hydrolyse acide au moyen d'acide chlorhydrique contenant du phénol est la technique la plus couramment utilisée pour l'hydrolyse des protéine/peptides avant analyse des acides aminés. La présence de phénol empêche l'halogénation de la tyrosine.

**Solution d'hydrolyse**. Acide chlorhydrique 6 M contenant 0,1 pour cent à 1,0 pour cent de phénol.

**Mode opératoire**

*Hydrolyse en phase liquide*. Placez l'échantillon protéique/peptidique dans un tube à hydrolyse, puis desséchez (la dessiccation de l'échantillon évite la dilution de l'acide utilisé pour l'hydrolyse par l'eau contenue dans l'échantillon). Ajoutez la solution d'hydrolyse à raison de 200 μL pour 500 μg de protéine lyophilisée. Congelez le tube dans un bain d'acétone-glace sèche, puis scellez à la flamme sous vide. L'hydrolyse des échantillons est généralement effectuée à 110 °C pendant 24 h, sous vide ou sous atmosphère inerte pour empêcher l'oxydation. Si l'on craint une hydrolyse incomplète de la protéine, des études sont effectuées avec des durées d'hydrolyse plus longues (par exemple 48 h et 72 h).

*Hydrolyse en phase vapeur*. Il s'agit de l'une des procédures d'hydrolyse acide les plus utilisées, et elle est souvent utilisée pour les microanalyses lorsque l'échantillon n'est disponible qu'en petite quantité. Elle permet également de réduire les risques de contamination de l'échantillon par le réactif acide. Placez les flacons contenant les échantillons desséchés dans un récipient où a été placée une quantité appropriée de la solution d'hydrolyse. Celle-ci n'entre pas en contact avec l'échantillon. Instaurez une atmosphère inerte ou un vide partiel (moins de 200 μm de mercure ou 26,7 Pa) dans l'espace de tête du récipient, puis chauffez à environ 110 °C pendant 24 h. Les vapeurs acides hydrolysent l'échantillon desséché. La condensation éventuelle de l'acide dans le flacon contenant l'échantillon doit être réduite au minimum. Après hydrolyse, desséchez l'échantillon sous vide pour éliminer les éventuels résidus d'acide.

*MÉTHODE 2*

Pour limiter l'oxydation du tryptophane en cours d'hydrolyse, on utilise de l'acide mercaptoéthanesulfonique comme agent réducteur.

**Solution d'hydrolyse**. Solution d'acide mercaptoéthane-sulfonique 2,5 M.

**Hydrolyse en phase vapeur**. Dans un tube à hydrolyse, desséchez environ 1 μg à 100 μg de la protéine/peptide à analyser. Placez le tube à hydrolyse dans un tube plus grand contenant environ 200 μL de solution d'hydrolyse. Scellez le tube extérieur sous vide (environ 50 μm de mercure ou 6,7 Pa) pour vaporiser la solution d'hydrolyse. Chauffez à 170-185 °C pendant environ 12,5 min. Après hydrolyse, desséchez le tube à hydrolyse sous vide pendant 15 min pour éliminer l'acide résiduel.

*MÉTHODE 3*

Pour limiter l'oxydation du tryptophane en cours d'hydrolyse, on utilise de l'acide thioglycolique (TGA) comme agent réducteur.

**Solution d'hydrolyse**. Acide chlorhydrique 7 M contenant 1 pour cent de phénol, 10 pour cent d'acide trifluoracétique et 20 pour cent d'acide thioglycolique.

**Hydrolyse en phase vapeur**. Dans un tube à échantillon, desséchez environ 10 μg à 50 μg de protéine/peptide à analyser. Placez le tube à échantillon dans un tube plus grand contenant environ 200 μL de solution d'hydrolyse. Scellez le tube extérieur sous vide (environ 50 μm de mercure ou 6,7 Pa) pour vaporiser l'acide. Chauffez à 166 °C pendant environ 15-30 min. Après hydrolyse, desséchez le tube à échantillon sous vide pendant 5 min pour éliminer l'acide résiduel. Le recouvrement du tryptophane par cette méthode peut dépendre de la quantité d'échantillon utilisée.

*MÉTHODE 4*

On procède à une oxydation de la cystéine/cystine et de la méthionine au moyen d'acide performique, avant hydrolyse de la protéine.

**Solution d'oxydation**. Utilisez de l'acide performique récemment préparé par mélange de 1 volume de solution à 30 pour cent de peroxyde d'hydrogène et 9 volumes d'acide formique anhydre, puis incubation à température ambiante pendant 1 h.

**Mode opératoire**. Dissolvez l'échantillon protéique/peptidique dans 20 μL d'acide formique anhydre et chauffez à 50 °C pendant 5 min, puis ajoutez 100 μL de solution d'oxydation. Laissez l'oxydation se dérouler pendant 10-30 min. Cette réaction produit une conversion de la cystéine en acide cystéique et de la méthionine en méthionine-sulfone. Eliminez l'excès de réactif par centrifugation sous vide. La protéine oxydée peut alors être soumise à une hydrolyse acide par la méthode 1 ou la méthode 2. Cette technique peut entraîner une modification des résidus tyrosine en présence d'halogénures.

*MÉTHODE 5*

On procède à une oxydation de la cystéine/cystine au moyen d'azide de sodium en cours d'hydrolyse en phase liquide.

**Solution d'hydrolyse**. A de l'acide chlorhydrique 6 M contenant 0,2 pour cent de phénol, ajoutez de l'azide de sodium jusqu'à une concentration finale de 2 g/L. La présence de phénol empêche l'halogénation de la tyrosine.

**Hydrolyse en phase liquide**. Procédez à l'hydrolyse de l'échantillon protéique/peptidique à environ 110 °C pendant 24 h. Au cours de l'hydrolyse, la cystéine/cystine contenue dans l'échantillon est convertie en acide cystéique par l'azide de sodium présent dans la solution d'hydrolyse. Cette technique donne un meilleur recouvrement de la tyrosine que la méthode 4, mais ne permet pas d'obtenir un recouvrement quantitatif de la méthionine. Celle-ci est convertie en un mélange de méthionine source et de ses 2 produits d'oxydation, la méthionine-sulfoxyde et la méthionine-sulfone.

*MÉTHODE 6*

On procède à une oxydation de la cystéine/cystine au moyen de diméthylsulfoxyde (DMSO).

**Solution d'hydrolyse**. A de l'acide chlorhydrique 6 M contenant 0,1 pour cent à 1,0 pour cent de phénol, ajoutez du diméthylsulfoxyde jusqu'à une concentration finale de 2 pour cent *V/V*.

**Hydrolyse en phase vapeur**. Procédez à l'hydrolyse de l'échantillon protéique/peptidique à environ 110 °C pendant 24 h. Au cours de l'hydrolyse, la cystéine/cystine contenue dans l'échantillon est convertie en acide cystéique par le DMSO présent dans la solution d'hydrolyse. Pour limiter la variabilité et tenir compte de la destruction partielle de l'acide cystéique, l'approche recommandée consiste à évaluer le recouvrement de l'acide cystéique à partir de l'hydrolyse oxydative de protéines étalons contenant 1-8 mol de cystéine. Les facteurs de réponse des hydrolysats protéiques/peptidiques sont typiquement

inférieurs d'environ 30 pour cent à ceux des étalons d'acide cystéique non hydrolysés. L'histidine, la méthionine, la tyrosine et le tryptophane étant également modifiés, cette technique ne permet pas une analyse de composition complète.

*MÉTHODE 7*

On procède à une réduction-alkylation de la cystéine/cystine par pyridyléthylation en phase vapeur.

**Solution réductrice**. Introduisez 83,3 µL de pyridine, 16,7 µL de 4-vinylpyridine, 16,7 µL de tributylphosphine et 83,3 µL d'eau dans un récipient approprié. Mélangez.

**Mode opératoire**. Dans un tube à hydrolyse, introduisez 1 µg à 100 µg de la protéine/peptide à analyser, puis placez ce tube dans un tube plus grand. Transvasez la solution réductrice dans le tube extérieur, scellez-le sous vide (environ 50 µm de mercure ou 6,7 Pa) et chauffez à environ 100 °C pendant 5 min. Sortez le tube à hydrolyse et desséchez dans un dessiccateur sous vide pendant 15 min pour éliminer les réactifs résiduels. L'échantillon pyridyléthylé peut alors être soumis à une hydrolyse acide par l'une des méthodes précédemment décrites. Soumettez simultanément à la réaction de pyridyléthylation une protéine étalon contenant 1-8 mol de cystéine, pour évaluer le recouvrement de la (pyridyléthyl)cystéine. L'utilisation de temps d'incubation plus longs lors de la réaction de pyridyléthylation peut entraîner des modifications du groupement α-amino terminal et du groupement ϵ-amino de la lysine contenue dans la protéine.

*MÉTHODE 8*

On procède à une réduction-alkylation de la cystéine/cystine par pyridyléthylation en phase liquide.

**Solutions mères**. Préparez et filtrez 3 solutions : une solution tampon tris-chlorhydrate pH 8,5 (1 M) contenant 4 mM d'édétate disodique (solution mère A), une solution de chlorhydrate de guanidine 8 M (solution mère B) et une solution à 10 pour cent de 2-mercaptoéthanol (solution mère C).

**Solution réductrice**. Préparez un mélange de 1 volume de solution mère A et de 3 volumes de solution mère B, de façon à obtenir une solution tamponnée de chlorhydrate de guanidine 6 M et de tris-chlorhydrate 0,25 M.

**Mode opératoire**. Dissolvez environ 10 µg de la protéine ou du peptide à analyser dans 50 µL de la solution réductrice, puis ajoutez environ 2,5 µL de la solution mère C. Placez sous atmosphère d'azote ou d'argon pendant 2 h à température ambiante et à l'obscurité. Pour procéder à la pyridyléthylation, ajoutez environ 2 µL de 4-vinylpyridine à la solution protéique, puis incubez pendant encore 2 h à température ambiante et à l'obscurité. Dessalez en séparant la fraction protéique/peptidique par CLHP en phase inversée. L'échantillon recueilli peut être desséché par centrifugation sous vide avant l'hydrolyse acide.

*MÉTHODE 9*

On procède à une réduction-alkylation de la cystéine/cystine par carboxyméthylation en phase liquide.

**Solutions mères**. Préparez les solutions mères comme indiqué dans la méthode 8.

**Solution de carboxyméthylation**. Préparez une solution d'iodoacétamide à 100 g/L dans de l'alcool.

**Solution tampon**. Utilisez la solution réductrice décrite dans la méthode 8.

**Mode opératoire**. Dissolvez l'échantillon protéique/peptidique dans 50 µL de la solution tampon, puis ajoutez environ 2,5 µL de la solution mère C. Placez sous atmosphère d'azote ou d'argon pendant 2 h à température ambiante et à l'obscurité. Ajoutez la solution de carboxyméthylation dans un rapport de 1,5 fois la teneur théorique totale en thiols, puis incubez pendant encore 30 min à température ambiante et à l'obscurité. Si la teneur en groupements thiol de la protéine est inconnue, ajoutez 5 µL d'iodoacétamide 100 mM pour 20 nmol de protéine. Arrêtez la réaction par addition de 2-mercaptoéthanol en excès. Dessalez en séparant la fraction protéique/peptidique par CLHP en phase inversée. L'échantillon recueilli peut être desséché par centrifugation sous vide avant hydrolyse acide. La *S*-(carboxyamidométhyl)cystéine formée sera convertie en *S*-(carboxyméthyl)cystéine au cours de l'hydrolyse acide.

*MÉTHODE 10*

On fait réagir la cystéine/cystine avec de l'acide dithiodiglycolique ou de l'acide dithiodipropionique pour produire des disulfures mixtes. Le choix de l'un ou l'autre des acides dépendra de la résolution requise pour l'analyse des acides aminés.

**Solution réductrice**. Solution d'acide dithiodiglycolique (ou d'acide dithiodipropionique) à 10 g/L dans de l'hydroxyde de sodium 0,2 M.

**Mode opératoire**. Dans un tube à hydrolyse, introduisez environ 20 µg de la protéine/peptide à analyser. Ajoutez 5 µL de la solution réductrice, puis 10 µL d'alcool isopropylique. Eliminez ensuite la totalité de la phase liquide par centrifugation sous vide, puis procédez à l'hydrolyse par la méthode 1. Cette méthode présente l'avantage de ne pas comporter de risque de dérivatisation des autres résidus acides aminés par des réactions secondaires et de ne pas exiger de dessalage de la protéine avant hydrolyse.

*MÉTHODE 11*

L'asparagine et la glutamine sont respectivement converties en acides aspartique et glutamique au cours de l'hydrolyse acide. On additionne les résidus asparagine et acide aspartique sous le terme *Asx*, et les résidus glutamine et acide glutamique sous le terme *Glx*. Il est possible de faire réagir l'échantillon protéique/peptidique avec du bis(1,1-trifluoroacétoxy)iodobenzène (BTI) pour convertir les résidus asparagine et glutamine en résidus acide diaminopropionique et acide diaminobutyrique lors de l'hydrolyse acide. Ces conversions permettent de déterminer la teneur en asparagine et en glutamine d'une protéine ou d'un peptide en présence de résidus acide aspartique et acide glutamique.

**Solutions réductrices**. Préparez et filtrez 3 solutions : une solution d'acide trifluoracétique 10 mM (solution A) ; une solution de chlorhydrate de guanidine 5 M et d'acide trifluoracétique 10 mM (solution B) ; une solution récemment préparée de bis(1,1-trifluoroacétoxy)iodobenzène à 36 mg/mL dans du diméthylformamide (solution C).

**Mode opératoire**. Dans un tube à hydrolyse propre, introduisez environ 200 µg de la protéine/peptide à analyser, puis ajoutez 2 mL de solution A ou de solution B et 2 mL de solution C. Scellez le tube à hydrolyse sous vide. Chauffez à 60 °C pendant 4 h à l'obscurité. Procédez ensuite à une dialyse contre de l'eau pour éliminer l'excès de réactifs, puis effectuez 3 extractions successives avec des volumes égaux d'acétate de butyle et lyophilisez. L'hydrolyse acide peut alors être effectuée par l'une des méthodes précédemment décrites. Les résidus acide α,β-diaminopropionique et acide α,γ-diaminobutyrique ne sont généralement pas séparés des résidus lysine lors des analyses reposant sur une chromatographie par échange d'ions. Par conséquent, lorsque l'on utilise l'échange d'ions comme mode de séparation, la teneur en asparagine et en glutamine s'obtient par calcul de la différence entre les teneurs en acide aspartique et en acide glutamique respectivement obtenues par hydrolyse acide et par hydrolyse acide avec dérivatisation par le BTI. Cette méthode de dérivatisation pouvant affecter les résultats obtenus pour la teneur en thréonine, en méthionine, en cystéine, en tyrosine et en histidine, il sera nécessaire de réaliser une hydrolyse sans BTI si l'on veut déterminer la teneur de ces résidus dans la protéine ou le peptide.

MÉTHODES D'ANALYSE DES ACIDES AMINÉS : PRINCIPES GÉNÉRAUX

Il existe de nombreuses techniques d'analyse des acides aminés, et le choix de l'une ou l'autre d'entre elles dépend souvent de la sensibilité que l'on souhaite obtenir. La moitié à peu près

des techniques d'analyse utilisées reposent sur une séparation des acides aminés libres par chromatographie à échange d'ions, suivie d'une dérivatisation post-colonne (par la ninhydrine ou l'*o*-phtalaldéhyde par exemple). Les techniques faisant appel à une dérivatisation post-colonne peuvent être utilisées sur des échantillons contenant de petites quantités de composants tampons (par exemple sels et urée) et nécessitent généralement de 5 µg à 10 µg d'échantillon protéique par analyse. Les autres techniques d'analyse comprennent en général une dérivatisation précolonne des acides aminés libres (par l'isothiocyanate de phényle, le carbamate de 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyle ou l'*o*-phtalaldéhyde, le chlorure de (diméthylamino)azobenzènesulfonyle, le chloroformate de 9-fluorénylméthyle, le 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole, etc.), suivie d'une CLHP en phase inversée. Les techniques utilisant la dérivatisation précolonne sont très sensibles et ne nécessitent généralement pas plus de 0,5 µg à 1,0 µg d'échantillon protéique par analyse, mais elles peuvent être perturbées par les sels tampons contenus dans l'échantillon. La dérivatisation précolonne peut par ailleurs produire plusieurs dérivés d'un acide aminé donné, ce qui complique l'interprétation des résultats. Les techniques de dérivatisation post-colonne sont généralement moins sensibles aux variations liées à l'exécution de l'essai.

Toutes les méthodes suivantes peuvent être utilisées pour l'analyse des acides aminés. Elles font appel à des instruments et des réactifs disponibles dans le commerce. Elles se prêtent en outre à de nombreuses variantes par rapport aux réactifs, procédures de réaction, systèmes chromatographiques, etc. Certains paramètres spécifiques peuvent varier selon l'équipement et le mode opératoire utilisés. De nombreux laboratoires mettent parallèlement en oeuvre plusieurs techniques d'analyse pour bénéficier des avantages de chacune d'elles. Dans toutes ces méthodes, le signal analogique est visualisé au moyen d'un système d'acquisition des données, et la quantification est réalisée par intégration de la surface des pics.

*MÉTHODE 1 - DÉRIVATISATION POST-COLONNE PAR LA NINHYDRINE*

La chromatographie par échange d'ions avec dérivatisation post-colonne par la ninhydrine est l'une des méthodes les plus couramment utilisées pour l'analyse quantitative des acides aminés. En règle générale, l'analyse d'échantillons physiologiques complexes est réalisée avec des systèmes échangeurs de cations à base de lithium, tandis que les mélanges d'acides aminés plus simples obtenus à partir d'hydrolysats protéiques (typiquement 17 acides aminés composants) sont analysés avec des systèmes échangeurs de cations à base de sodium, plus rapides. La séparation des acides aminés sur colonne échangeuse d'ions s'opère grâce à une combinaison de variations du pH et de la force cationique. Un gradient de température est souvent appliqué pour favoriser la séparation.

Les produits de réaction des acides aminés avec la ninhydrine présentent une coloration pourpre ou jaune caractéristique. A l'exception des imino-acides, les acides aminés donnent une coloration pourpre avec un maximum d'absorption à 570 nm. Les imino-acides tels que la proline donnent une coloration jaune avec un maximum d'absorption à 440 nm. Les produits de la réaction post-colonne entre la ninhydrine et les acides aminés élués sont détectés à 440 nm et 570 nm, et le chromatogramme obtenu est utilisé pour la détermination de la composition en acides aminés.

La limite de détection usuelle est de 10 pmol pour la plupart des dérivés d'acides aminés, mais s'élève à 50 pmol pour le dérivé de la proline. Une réponse linéaire est obtenue sur l'intervalle 20-500 pmol, avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,999. Pour obtenir des résultats d'analyse de composition satisfaisants, il est recommandé d'utiliser des prises d'essai de plus de 1 µg.

*MÉTHODE 2 - DÉRIVATISATION POST-COLONNE PAR L'OPA*

Le *o*-phtalaldéhyde (OPA) réagit avec les amines primaires en présence d'un thiol, pour former des produits isoindole hautement fluorescents. Cette réaction est utilisée pour la dérivatisation post-colonne après séparation des acides aminés par chromatographie à échange d'ions. Le principe de la séparation est identique à celui de la méthode 1.

L'OPA ne réagit pas avec les amines secondaires (imino-acides tels que la proline) pour former des substances fluorescentes. Toutefois, une oxydation par l'hypochlorite de sodium ou la chloramine T permet de rendre cette réaction possible. La procédure repose sur la séparation des acides aminés libres sur une colonne échangeuse de cations fortement acide, suivie d'une oxydation post-colonne par l'hypochlorite de sodium ou la chloramine T et d'une dérivatisation post-colonne par l'OPA en présence d'un thiol tel que la *N*-acétyl-L-cystéine ou le 2-mercaptoéthanol. La dérivatisation des acides aminés primaires n'est pas notablement affectée par l'apport continu d'hypochlorite de sodium ou de la chloramine T.

La séparation des acides aminés sur colonne échangeuse d'ions s'opère grâce à une combinaison de variations du pH et de la force cationique. Après la dérivatisation post-colonne des acides aminés élués, les dérivés OPA-acide aminé passent dans le détecteur fluorimétrique, qui mesure leur intensité d'émission de fluorescence à 450 nm avec excitation à 348 nm.

La limite de détection usuelle est de l'ordre de quelques dizaines de picomoles pour la plupart des dérivés OPA-acide aminé. Une réponse linéaire est obtenue sur un intervalle allant de quelques picomoles à quelques dizaines de nanomoles. Pour obtenir des résultats d'analyse de composition satisfaisants, il est recommandé d'utiliser des prises d'essai initiales (avant hydrolyse) de plus de 500 ng de protéine/peptide.

*MÉTHODE 3 - DÉRIVATISATION PRÉCOLONNE PAR LE PITC*

Le phénylisothiocyanate (PITC) réagit avec les acides aminés pour former des dérivés phénylthiocarbamyle (PTC) qui peuvent être détectés à 254 nm avec une sensibilité élevée. On utilise cette propriété pour l'analyse de la composition en acides aminés, en procédant par dérivatisation précolonne des acides aminés par le PITC, puis séparation par CLHP en phase inversée et détection UV.

Après élimination sous vide du réactif, les acides aminés dérivatisés peuvent être conservés pendant plusieurs semaines à l'état desséché et congelé sans dégradation significative. Si la solution à injecter est maintenue à basse température, il n'apparaît pas de perte significative dans la réponse chromatographique après 3 jours.

La séparation des dérivés PTC-acide aminé par CLHP en phase inversée, sur une colonne octadécylsilylée (ODS), s'opère grâce à une combinaison de variations de la concentration en acétonitrile et de la force ionique du tampon. Les dérivés PTC-acide aminé élués sont détectés à 254 nm en sortie de colonne.

La limite de détection usuelle est de 1 pmol pour la plupart des dérivés PTC-acide aminé. Une réponse linéaire est obtenue sur l'intervalle 20-500 pmol, avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,999. Pour obtenir des résultats d'analyse de composition satisfaisants, il est recommandé d'utiliser des prises d'essai initiales (avant hydrolyse) de plus de 500 ng de protéine/peptide.

*MÉTHODE 4 - DÉRIVATISATION PRÉCOLONNE PAR L'AQC*

On procède par dérivatisation précolonne des acides aminés par le carbamate de 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyle (AQC), puis séparation par CLHP en phase inversée et détection fluorimétrique.

L'AQC réagit avec les acides aminés pour former des dérivés fluorescents asymétriques de l'urée (dérivés AQC-acide aminé) qui sont stables et se prêtent facilement à une analyse par CLHP en phase inversée. On utilise cette propriété pour l'analyse de la

composition en acides aminés, en procédant par dérivatisation précolonne des acides aminés par l'AQC, puis séparation par CLHP en phase inversée et détection fluorimétrique.

La séparation des dérivés AQC-acide aminé par CLHP en phase inversée sur une colonne ODS s'opère grâce à une combinaison de variations de la concentration en acétonitrile et de la force ionique du tampon. La détection fluorimétrique sélective des dérivés, à 395 nm avec excitation à 250 nm, permet l'injection directe du mélange réactif sans interférence significative du principal sous-produit fluorescent du réactif : la 6-aminoquinoline. Le réactif en excès subit une hydrolyse rapide ($t_{1/2}$<15 s) en 6-aminoquinoline, *N*-hydroxysuccinimide et dioxyde de carbone ; et la dérivatisation ne se poursuit plus après 1 min.

Les dérivés AQC-acide aminé peuvent être conservés pendant au moins 1 semaine à température ambiante sans que la surface des pics correspondants ne varie sensiblement. Leur stabilité est donc plus que suffisante pour permettre une analyse chromatographique automatisée durant la nuit.

La limite de détection usuelle est d'environ de 40 fmol à 320 fmol pour tous les acides aminés à l'exception de la cystéine, pour laquelle elle s'élève à environ 800 fmol. Une réponse linéaire est obtenue sur l'intervalle 2,5-200 µM, avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,999. Il est possible d'obtenir des résultats d'analyse de composition satisfaisants à partir d'hydrolysats protéiques dérivatisés issus de seulement 30 ng de protéine/peptide.

*MÉTHODE 5 - DÉRIVATISATION PRÉCOLONNE PAR L'OPA*

On procède par dérivatisation précolonne des acides aminés par le *o*-phtalaldéhyde (OPA), puis séparation par CLHP en phase inversée et détection fluorimétrique. Cette technique ne permet pas la détection des acides aminés qui sont des amines secondaires (proline par exemple).

L'OPA réagit avec les amines primaires en présence d'un thiol, pour former des produits isoindole hautement fluorescents. Le thiol utilisé comme réactif peut être le 2-mercaptoéthanol ou l'acide 3-mercaptopropionique. L'OPA n'est pas lui-même fluorescent et ne donne donc pas de pics interférents. Par ailleurs, sa solubilité et sa stabilité en solution aqueuse, ainsi que sa cinétique de réaction rapide, font qu'il se prête bien à une dérivatisation et une analyse automatisées utilisant un auto-échantillonneur pour mélanger l'échantillon et le réactif. En revanche, l'absence de réactivité avec les acides aminés secondaires constitue le principal inconvénient de la méthode : elle ne permet pas la détection des acides aminés qui sont des amines secondaires (tels que la proline). Pour pallier cet inconvénient, on peut la combiner avec les techniques décrites dans la méthode 7 ou la méthode 8.

La dérivatisation précolonne est suivie d'une séparation par CLHP en phase inversée. En raison de l'instabilité des dérivés OPA-acide aminé, la séparation et l'analyse par CLHP sont effectuées immédiatement après la dérivatisation. Le chromatographe est équipé d'un détecteur fluorimétrique permettant la détection des acides aminés dérivatisés. L'intensité de fluorescence des dérivés OPA-acide aminé est mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 348 nm et une longueur d'onde d'émission de 450 nm.

Il a été fait état de limites de détection fluorimétrique de seulement 50 fmol, bien que la limite pratique d'analyse reste de l'ordre de 1 pmol.

*MÉTHODE 6 - DÉRIVATISATION PRÉCOLONNE PAR LE DABS-Cl*

On procède par dérivatisation précolonne des acides aminés par le chlorure de (diméthylamino)azobenzènesulfonyle (DABS-Cl), puis séparation par CLHP en phase inversée et détection en lumière visible.

Le DABS-Cl est un réactif chromophore utilisé pour le marquage des acides aminés. Les acides aminés marqués au DABS-Cl (dérivés DABS-acide aminé) sont très stables et présentent un maximum d'absorption à 436 nm.

Les dérivés DABS-acide aminé issus de l'ensemble des acides aminés naturels peuvent être séparés par CLHP en phase inversée, sur une colonne ODS, sous l'effet d'un gradient d'élution dans un mélange d'acétonitrile et de tampon aqueux. Les dérivés DABS-acide aminé élués sont détectés en sortie de colonne dans le domaine du visible, à 436 nm.

Cette méthode permet l'analyse des imino-acides tels que la proline et des autres acides aminés avec le même niveau de sensibilité, et la dérivatisation par le DABS-Cl permet la quantification simultanée des résidus tryptophane si l'on procède à l'hydrolyse préalable de la protéine/peptide par des acides sulfoniques tels que l'acide mercaptoéthanesulfonique, l'acide *p*-toluènesulfonique ou l'acide méthanesulfonique comme décrit dans la méthode 2 sous Hydrolyse de la proteine ou du peptide. Les autres résidus instables lors de l'hydrolyse acide, comme l'asparagine et la glutamine, peuvent également être analysés après conversion préalable respectivement en acides diaminopropionique et diaminobutyrique par traitement de la protéine/peptide par le BTI comme décrit dans la méthode 11 sous Hydrolyse de la proteine ou du peptide.

La norleucine, acide aminé non protéinogène, ne peut pas être utilisé comme étalon interne dans le cadre de cette méthode car elle est éluée dans une région du chromatogramme encombrée par les pics d'acides aminés primaires. On peut la remplacer par la nitrotyrosine, qui est éluée dans une région plus dégagée du chromatogramme.

La limite de détection des dérivés DABS-acide aminé est d'environ 1 pmol. Pour un dérivé DABS-acide aminé donné, des quantités de l'ordre de 2-5 pmol peuvent être analysées quantitativement avec fiabilité et il suffit, pour chaque analyse, de disposer de 10-30 ng d'hydrolysat protéique traité au DABS-Cl.

*MÉTHODE 7 - DÉRIVATISATION PRÉCOLONNE PAR LE FMOC-CL*

On procède par dérivatisation précolonne des acides aminés par le chloroformate de 9-fluorénylméthyle (FMOC-Cl), puis séparation par CLHP en phase inversée et détection fluorimétrique.

Le FMOC-Cl réagit avec les acides aminés primaires et secondaires pour former des produits hautement fluorescents. La réaction est effectuée dans des conditions douces en solution aqueuse et elle est complète en 30 s. Les dérivés sont stables ; seule l'histidine est sujette à dégradation. Le FMOC-Cl est lui-même fluorescent, mais il est possible d'éliminer l'excès de réactif et les sous-produits fluorescents sans perdre de dérivés FMOC-acide aminé.

Les dérivés FMOC-acide aminé sont séparés par CLHP en phase inversée, sur une colonne ODS. La séparation s'opère par gradient linéaire d'élution, en partant d'un mélange de 10 volumes d'acétonitrile, 40 volumes de méthanol et 50 volumes d'acide acétique pour arriver à un mélange de 50 volumes d'acétonitrile et de 50 volumes d'acide acétique, ce qui permet de séparer 20 dérivés d'acides aminés en 20 min. Chacun des dérivés élués est analysé en sortie de colonne par un détecteur fluorimétrique réglé sur une longueur d'onde d'excitation de 260 nm et une longueur d'onde d'émission de 313 nm.

La limite de détection est de l'ordre de quelques femtomoles. L'intervalle de linéarité est de 0,1-50 µM pour la plupart des acides aminés.

*MÉTHODE 8 - DÉRIVATISATION PRÉCOLONNE PAR LE NBD-F*

On procède par dérivatisation précolonne des acides aminés par le 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F), puis séparation par CLHP en phase inversée et détection fluorimétrique.

Le NBD-F réagit avec les acides aminés primaires et secondaires pour former des produits hautement fluorescents. La dérivatisation des acides aminés par le NBD-F est effectuée à 60 °C pendant 5 min.

Les dérivés NBD-acide aminé sont séparés par CLHP en phase inversée, sur une colonne ODS, sous l'effet d'un gradient d'élution constitué d'un mélange d'acétonitrile et de tampon aqueux. 17 dérivés d'acides aminés sont ainsi séparés en 35 min. L'acide $\epsilon$-aminocaproïque peut être utilisé comme étalon interne car il est élué dans une région dégagée du chromatogramme. Chacun des dérivés élués est analysé en sortie de colonne par un détecteur fluorimétrique réglé sur une longueur d'onde d'excitation de 480 nm et une longueur d'onde d'émission de 530 nm.

La sensibilité de cette méthode est à peu près équivalente à celle de la méthode de dérivatisation précolonne par l'OPA (méthode 5), sauf pour la proline avec laquelle l'OPA ne réagit pas, ce qui pourrait constituer un avantage en faveur du NBD-F. La limite de détection est d'environ 10 fmol pour chaque acide aminé. Une analyse de profil peut être obtenue avec environ 1,5 mg d'hydrolysat protéique dans le mélange réactif précolonne.

## CALCUL ET ANALYSE DES DONNÉES

Il est à noter que, lors de la détermination de la teneur en acides aminés d'un hydrolysat protéique/peptidique, l'étape d'hydrolyse acide conduit à la destruction du tryptophane et de la cystéine. La sérine et la thréonine sont elles aussi partiellement détruites, tandis que les résidus isoleucine et valine peuvent ne subir qu'un clivage partiel. La méthionine peut être oxydée, et la contamination par certains acides aminés tels que la glycine et la sérine est un phénomène courant. L'application d'un vide approprié (moins de 200 µm de mercure ou 26,7 Pa) ou l'introduction d'un gaz inerte (argon) dans l'espace de tête du récipient lors d'une hydrolyse en phase vapeur permettent de limiter la destruction par oxydation. Néanmoins, les résultats quantitatifs obtenus à partir d'un hydrolysat protéique/peptidique pour la cystéine, le tryptophane, la thréonine, l'isoleucine, la valine, la méthionine, la glycine et la sérine peuvent être variables et nécessiter un examen plus approfondi.

**Pourcentage molaire d'un acide aminé**. Il s'agit du nombre de résidus spécifiques de cet acide aminé pour 100 résidus présents dans la protéine. Le calcul de ce pourcentage peut être utile pour évaluer les résultats d'une analyse des acides aminés lorsque la masse moléculaire de la protéine à analyser n'est pas connue. Cette information peut être utilisée pour confirmer l'identité d'une protéine ou d'un peptide ainsi que pour d'autres applications. Identifiez et intégrez soigneusement les pics des chromatogrammes obtenus comme indiqué pour chacune des méthodes, puis calculez le pourcentage molaire de chacun des acides aminés présents dans l'échantillon, à l'aide de la formule :

$$\frac{100r_U}{r}$$

où $r_U$ est la réponse, en nanomoles, obtenue pour l'acide aminé considéré et $r$ la somme, en nanomoles, des réponses obtenues pour l'ensemble des acides aminés présents dans l'échantillon. La comparaison des pourcentages molaires ainsi obtenus avec les données disponibles sur des protéines connues peut aider à établir ou confirmer l'identité de l'échantillon protéique.

**Échantillons protéiques inconnus**. Cette méthode d'analyse des données expérimentales peut être utilisée pour estimer la concentration en protéine d'un échantillon protéique inconnu. Calculez la masse de chacun des acides aminés recouvrés, en microgrammes, à l'aide de la formule :

$$\frac{mM_r}{1000}$$

où $m$ est la quantité recouvrée de l'acide aminé considéré, en nanomoles, et $M_r$ la masse moléculaire moyenne de cet acide aminé, minorée de la masse de la molécule d'eau éliminée lors de la formation de la liaison peptidique. La somme des masses ainsi obtenues pour les différents acides aminés fournit une estimation de la masse totale de la protéine analysée, après application des corrections nécessaires pour tenir compte de la destruction complète ou partielle de certains acides aminés. Si l'on peut déterminer la masse moléculaire de la protéine inconnue (par SDS-PAGE ou spectroscopie de masse), il sera possible de prédire sa composition en acides aminés. Calculez le nombre de résidus de chaque acide aminé par la formule :

$$\frac{m}{\left(\frac{1000M}{M_{rt}}\right)}$$

où $m$ est la quantité recouvrée de l'acide aminé considéré, en nanomoles, $M$ la masse totale de la protéine, en microgrammes, et $M_{rt}$ la masse moléculaire de la protéine inconnue.

**Echantillons protéiques connus**. Cette méthode d'analyse des données expérimentales peut être utilisée pour vérifier la composition en acides aminés et déterminer la concentration en protéine d'un échantillon protéique de masse moléculaire et de composition en acides aminés connues. Connaissant la composition de la protéine à analyser, on peut utiliser le fait que certains acides aminés ont un bon recouvrement tandis que pour d'autres, le recouvrement peut être affecté par une destruction totale ou partielle (tryptophane, cystéine, thréonine, sérine, méthionine, par exemple), un clivage incomplet des liaisons peptidiques (isoleucine et valine par exemple) ou une contamination par des acides aminés libres (glycine et sérine par exemple).

Comme les acides aminés ayant un bon recouvrement sont davantage représentatifs de la protéine, la quantification sera fondée sur ces acides aminés. Ce sont typiquement l'aspartate/asparagine, le glutamate/glutamine, l'alanine, la leucine, la phénylalanine, la lysine et l'arginine, mais cette liste peut être modifiée à la lumière de l'expérience acquise avec un système d'analyse donné. Divisez la quantité, en nanomoles, de chacun des acides aminés ayant un bon recouvrement par le nombre de résidus attendu pour cet acide aminé pour obtenir la teneur en protéine déterminée sur la base des acides aminés présentant un bon recouvrement. Effectuez la moyenne des teneurs en protéine ainsi calculées. Les teneurs en protéine obtenues à partir de chaque acide aminé présentant un bon recouvrement doivent présenter une distribution uniforme autour de cette moyenne. Rejetez les teneurs individuelles qui présentent un écart à la moyenne non acceptable. On considère généralement comme non acceptable un écart supérieur à 5 pour cent. Recalculez la teneur moyenne en protéine à partir des valeurs restantes, pour obtenir la teneur en protéine de l'échantillon. Divisez la teneur de chaque acide aminé par la teneur moyenne en protéine ainsi calculée pour obtenir une estimation expérimentale de la composition en acides aminés de l'échantillon.

Calculez l'erreur relative de composition, en pourcentage, à l'aide de la formule :

$$\frac{100m}{m_S}$$

où $m$ est la valeur expérimentale obtenue pour la quantité de l'acide aminé considéré, en nanomoles par résidu acide aminé, et $m_S$ la valeur connue du résidu pour cet acide aminé. L'erreur relative moyenne de composition est la moyenne des erreurs relatives individuelles, en valeurs absolues, correspondant aux différents acides aminés à l'exception du tryptophane et de la cystéine qui sont généralement exclus de ce calcul. L'erreur relative moyenne de composition peut fournir d'importantes informations sur la stabilité dans le temps de la procédure d'analyse. Par ailleurs, la comparaison de la composition en acides aminés obtenue pour la protéine à analyser et de la composition en acides aminés connue peut être utilisée pour confirmer l'identité et/ou la pureté de la protéine contenue dans l'échantillon.

**01/2008:20257**

# 2.2.57. SPECTROMÉTRIE D'ÉMISSION ATOMIQUE À PLASMA À COUPLAGE INDUCTIF

## PRINCIPE GÉNÉRAL

La spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif est une méthode de spectrométrie d'émission atomique (SEA) qui utilise comme source d'excitation un plasma à couplage inductif (ICP, *inductively coupled plasma*).

Le plasma à couplage inductif est un gaz inerte (généralement l'argon) porté à un état hautement ionisé, avec un nombre égal d'électrons et d'ions, entretenu par un champ de radiofréquence (RF). Les températures élevées atteintes au coeur du plasma entraînent successivement la désolvatation, la vaporisation, l'excitation - détectée par spectrométrie d'émission atomique (SEA) - et l'ionisation détectée par spectrométrie de masse (SM) - des atomes présents dans l'échantillon. Les limites de détection sont, en général, de l'ordre de quelques nanogrammes (SM-ICP) à quelques microgrammes (SEA-ICP) par litre.

La formation du plasma résulte du passage d'un flux tangentiel de gaz plasmagène à travers une « torche », système composé de 3 tubes de quartz concentriques. Une bobine d'induction en métal, raccordée à un générateur de radiofréquence, entoure l'extrémité de la torche. La puissance (généralement 700-1500 W) appliquée à la bobine génère un champ magnétique oscillant de fréquence imposée par le générateur (généralement 27 MHz, 40 MHz). Le plasma se forme lorsque le gaz plasmagène est rendu conducteur par application d'une décharge électrique qui produit des électrons et ions d'amorçage. Le champ magnétique induit confine les particules chargées (électrons et ions) sur un parcours annulaire fermé. Lorsqu'elles rencontrent des résistances, il se produit un échauffement qui entraîne une ionisation supplémentaire. L'ensemble du processus est quasi instantané et le plasma atteint rapidement son plein développement en puissance et en dimensions. L'oscillation de la puissance de radiofréquence appliquée à la bobine crée dans la zone située à la sortie de la torche des champs électrique et magnétique de radiofréquence. Lorsqu'une étincelle (produite par une bobine de Tesla ou un autre dispositif d'amorçage) est appliquée au flux gazeux traversant la torche, certains électrons sont arrachés aux atomes du gaz, puis capturés et accélérés par le champ magnétique. L'apport d'énergie aux électrons par l'intermédiaire de la bobine est appelé couplage inductif. Ces électrons chargés d'énergie entrent à leur tour en collision avec d'autres atomes du gaz plasmagène, auxquels ils arrachent de nouveaux électrons. L'ionisation par collision se poursuit ainsi par une réaction en chaîne et transforme le gaz en un plasma physique composé d'un mélange d'électrons, d'atomes du gaz plasmagène et d'ions de ce même gaz. Le plasma est alors entretenu, dans la torche et la bobine d'induction, grâce à l'alimentation continue en énergie par la puissance de radiofréquence, selon le processus de couplage inductif.

Le plasma est de forme plumeuse avec un aspect très intense et très brillant. Sa base, de forme toroïdale, est appelée région d'induction (RI), car elle est le lieu du transfert d'énergie inductive de la bobine au plasma. L'échantillon est introduit au coeur du plasma à travers la région d'induction.

## APPAREILLAGE

L'appareillage se compose pour l'essentiel des éléments suivants :

- un système d'introduction des échantillons, constitué d'une pompe péristaltique qui délivre la solution dans un nébuliseur à débit constant,
- un générateur de radiofréquence,
- une torche plasma,
- une optique de transfert qui assure la focalisation de l'image du plasma sur la fente d'entrée du spectromètre. La visée radiale est préférable pour les matrices complexes (alcalines, organiques), la visée axiale donne une plus grande intensité et de meilleures limites de détection dans les matrices simples,
- des systèmes dispersifs de longueurs d'onde constitués de réseaux de diffraction, de prismes, de filtres ou d'interféromètres,
- des détecteurs qui convertissent l'énergie du rayonnement en énergie électrique,
- une unité d'acquisition des données.

## INTERFÉRENCES

On appelle interférence tout phénomène en cause lorsqu'un analyte produit des signaux différents selon qu'il est contenu, à concentration identique, dans un échantillon ou dans une solution étalon. Les interférences chimiques, courantes en spectrométrie d'absorption atomique dans la flamme, sont généralement faibles en SEA-ICP. Dans les rares cas où de telles interférences sont observées, il peut être nécessaire, pour les éliminer, d'augmenter la puissance de radiofréquence ou de réduire le débit du flux gazeux dans le tube interne de la torche. Les interférences rencontrées en SEA-ICP sont soit d'origine spectrale, soit le résultat de la forte concentration de certains éléments ou constituants de la matrice. Les interférences physiques (dues aux différences de viscosité et de tension de surface entre l'échantillon et les solutions étalons) peuvent être réduites par dilution de l'échantillon, ajustement de la matrice, utilisation d'étalons internes ou application de la méthode des ajouts dosés.

Un autre type d'interférence parfois observé en SEA-ICP est l'effet dû aux éléments facilement ionisables, c'est-à-dire les éléments, tels que les métaux alcalins ou les alcalino-terreux, dont le passage à l'état ionisé est particulièrement facile ; leur présence dans l'échantillon à concentration élevée (plus de 0,1 pour cent) peut se traduire par une suppression ou au contraire une amplification des signaux d'émission.

**Interférences spectrales**. Ces interférences peuvent être dues à la présence de raies interférentes ou à des dérives dans l'intensité du bruit de fond. Les raies interférentes peuvent correspondre à l'argon (au-dessus de 300 nm), à des bandes OH dues à la décomposition de l'eau (à environ 300 nm), à des bandes NO dues à l'interaction du plasma avec l'air ambiant (entre 200 nm et 300 nm), ou à d'autres éléments présents dans l'échantillon, surtout à concentration élevée. Les interférences spectrales relèvent de 4 grandes catégories : variation continue du fond, recouvrement partiel, recouvrement total et variation complexe du fond.

**Interférence d'absorption**. Il y a interférence d'absorption lorsqu'une partie de l'émission de l'analyte est absorbée avant d'atteindre le détecteur. Cet effet est notamment observé lorsque la concentration d'un élément fortement émetteur est si élevée que les atomes ou les ions de cet élément qui se trouvent au plus faible niveau d'énergie absorbent une proportion significative du rayonnement émis par les espèces à l'état excité. Cet effet, dit d'auto-absorption, détermine la borne supérieure de l'intervalle de linéarité pour une raie d'émission donnée.

**Analyse spectrale multicomposante**. L'analyse de plusieurs raies d'émission est une technique couramment utilisée pour résoudre le problème des interférences spectrales. Une autre méthode de correction de ces interférences, plus performante et exacte, consiste à soumettre l'information fournie par des systèmes de détection perfectionnés à une technique d'analyse spectrale multicomposante, qui quantifie non seulement l'interférence, mais aussi la contribution de la matrice au rayonnement de fond, et crée ainsi une fonction de correction. Elle met en oeuvre un modèle d'ajustement affine (moindres carrés) multiple reposant sur l'analyse de l'analyte pur, de la matrice et du blanc, et la création d'un modèle mathématique de

correction d'interférence. Ceci permet de déterminer l'émission de l'analyte dans une matrice complexe avec une sensibilité de détection et une exactitude accrues.

MODE OPÉRATOIRE

*PRÉPARATION ET INTRODUCTION DES ÉCHANTILLONS*

La préparation de l'échantillon doit obéir à 2 objectifs fondamentaux : la concentration de l'analyte doit se situer dans la gamme d'analyse de l'instrument (grâce à des opérations de dilution ou de pré-concentration) et la solution échantillon doit pouvoir être nébulisée de façon reproductible.
Certains systèmes d'introduction des échantillons tolèrent des concentrations en acides élevées, mais l'emploi d'acide sulfurique ou phosphorique peut contribuer à l'émission de fond observée sur les spectres ICP. L'emploi d'acide nitrique ou chlorhydrique est donc préférable. Il existe également des systèmes d'introduction des échantillons et des torches (par exemple constitués de polymère alcoxyde perfluoré) qui résistent à l'acide fluorhydrique et permettent donc l'utilisation de cet acide. Différents critères conditionnent la sélection d'une méthode d'introduction de l'échantillon : sensibilité, stabilité, vitesse, taille de l'échantillon, résistance à la corrosion, résistance au colmatage. Les nébuliseurs à flux croisés combinés à une chambre de pulvérisation et une torche répondent à la plupart de ces exigences. Les pompes péristaltiques utilisées en SEA-ICP délivrent généralement les solutions à un débit de l'ordre de 1 mL/min, voire moins.

Si l'on utilise des solvants organiques, il y a lieu d'envisager l'introduction d'oxygène pour éviter la formation de phases organiques.

*CHOIX DES CONDITIONS OPÉRATOIRES*

Il convient d'opérer dans les conditions normales prescrites par le fabricant. En règle générale, elles sont différentes pour les solutions aqueuses et pour les solvants organiques. Les paramètres opératoires doivent être convenablement choisis :

- sélection des longueurs d'onde,
- débits du gaz plasmagène (tubes externe, médian et interne de la torche),
- puissance de radiofréquence,
- position de visée (radiale ou axiale),
- vitesse de la pompe,
- conditions applicables au détecteur (gain/tension pour les détecteurs à photomultiplicateurs, autres conditions pour les détecteurs « état solide »,
- durée d'intégration (durée fixée de la mesure de l'intensité d'émission à chaque longueur d'onde).

CONTRÔLE DES PERFORMANCES DE L'INSTRUMENTATION

**Conformité du système**

Les essais suivants, effectués avec une solution témoin multi-élémentaire, permettent de vérifier l'acceptabilité des performances du système SEA-ICP :

- transfert d'énergie (générateur, torche, plasma) : utilisation par exemple de la mesure du rapport Mg II (280,270 nm)/Mg I (285,213 nm),
- transfert de l'échantillon : vérification de l'efficacité et de la stabilité de nébulisation,
- résolution (système optique) : mesure de la largeur des pics à mi-hauteur, par exemple pour As (189,042 nm), Mn (257,610 nm), Cu (324,754 nm) ou Ba (455,403 nm),
- performances analytiques : calcul de la limite de détection de plusieurs éléments sélectionnés, sur l'ensemble de la gamme de longueur d'onde.

VALIDATION DE LA MÉTHODE

Les performances des méthodes prescrites dans les monographies sont vérifiées à intervalles de temps appropriés.

*LINÉARITÉ*

Préparez et analysez au moins 4 solutions de référence couvrant l'intervalle d'étalonnage, plus une solution à blanc, avec au minimum 5 réplications.

Calculez la courbe d'étalonnage par la méthode des moindres carrés à partir de l'ensemble des valeurs mesurées. Représentez graphiquement la courbe de régression, les moyennes, les valeurs mesurées et l'intervalle de confiance de la courbe d'étalonnage. Le mode opératoire est valable si :

- le coefficient de corrélation est supérieur ou égal à 0,99,
- les résidus obtenus pour chaque concentration d'étalonnage présentent une distribution aléatoire autour de la courbe d'étalonnage.

Calculez la moyenne et l'écart type relatif pour la concentration la plus faible et la plus élevée de la gamme d'étalonnage.

Si le rapport des écarts types estimés pour la plus faible et la plus élevée des concentrations d'étalonnage est inférieur à 0,5 ou supérieur à 2,0, une estimation plus précise de la courbe d'étalonnage peut être obtenue par régression linéaire pondérée. Des fonctions de pondération du 1er et du 2nd degré sont appliquées aux données pour déterminer la fonction de pondération la plus appropriée.

Si les moyennes présentent un écart de linéarité par rapport à la courbe d'étalonnage, une régression linéaire bidimensionnelle est utilisée.

*EXACTITUDE*

Vérifiez l'exactitude en utilisant de préférence un matériel de référence certifié (CRM, *certified raw material*). En cas d'impossibilité, effectuez un essai de recouvrement.

**Recouvrement**. Pour les dosages, un recouvrement de 90 pour cent à 110 pour cent doit être obtenu. Pour d'autres déterminations, par exemple le dosage d'éléments traces, l'essai n'est valable que si le recouvrement se situe dans l'intervalle allant de 80 pour cent à 120 pour cent de la valeur théorique. Le recouvrement peut être déterminé sur une solution de référence appropriée (matrice) dopée avec une quantité connue de l'élément à analyser (intervalle de concentration approprié à l'échantillon à analyser).

*RÉPÉTABILITÉ*

La répétabilité est au maximum de 3 pour cent pour un dosage et de 5 pour cent pour un essai de pureté.

*LIMITE DE QUANTIFICATION*

Vérifiez que la limite de quantification (déterminée par exemple par l'approche dite 10 $\sigma$) est inférieure à la valeur à mesurer.

**01/2008:20258**

# 2.2.58. SPECTROMÉTRIE DE MASSE À PLASMA À COUPLAGE INDUCTIF

PRINCIPE GÉNÉRAL

La spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif est une méthode de spectrométrie de masse (SM) qui utilise comme source d'ionisation un plasma à couplage inductif (ICP, *inductively coupled plasma*). Le principe général de la formation d'un ICP est décrit dans le chapitre sur la spectrométrie d'émission atomique avec source plasma à couplage inductif (SEA-ICP) (*2.2.57*).

En spectrométrie de masse, l'ICP est utilisé pour sa capacité à générer, à partir des espèces élémentaires présentes dans un échantillon, des ions chargés qui sont ensuite dirigés vers un spectromètre de masse qui se comporte comme un filtre de masse en séparant les ions en fonction de leur rapport masse/charge (*m*/z). La plupart des spectromètres de masse utilisent un système quadripolaire ou un secteur magnétique. A partir du plasma, les ions sont transportés à travers une interface constituée de 2 cônes (dits échantillonneur et écorceur) vers

une optique ionique composée d'une lentille électrostatique, qui dirige les ions d'une zone à pression atmosphérique vers la zone sous vide du filtre de masse, où une pompe turbo-moléculaire entretient une pression inférieure ou égale à $10^{-8}$ Pa. Après filtration, les ions possédant le rapport masse/charge voulu sont dirigés vers le détecteur (galette multicanaux, cage de Faraday, multiplicateur à dynodes), qui convertit les courants ioniques en signaux électriques. Leur quantification s'effectue sur la base du nombre d'ions qui parviennent au détecteur et génèrent des impulsions électriques, par unité de temps.

Le système d'introduction des échantillons et les techniques de traitement des données utilisés en SEA-ICP sont également utilisés en SM-ICP.

APPAREILLAGE

L'appareillage se compose pour l'essentiel des éléments suivants :

- un système d'introduction des échantillons constitué d'une pompe péristaltique délivrant la solution à débit constant à un nébuliseur,
- un générateur de radiofréquence (RF),
- une torche plasma,
- une zone d'interface constituée de cônes qui assurent le transport des ions vers l'optique ionique,
- un spectromètre de masse,
- un détecteur,
- une unité d'acquisition des données.

INTERFÉRENCES

Le problème majeur rencontré en SM-ICP est l'interférence de masse, due par exemple à des espèces isobares qui se superposent au signal des ions étudiés et perturbent significativement la mesure, notamment dans la région centrale de l'intervalle de masse (40-80 u.m.a). La combinaison de plusieurs ions atomiques produit des interférences polyatomiques ou moléculaires (par exemple, $^{40}Ar^{16}O$ avec $^{56}Fe$ ou $^{40}Ar^{40}Ar$ avec $^{80}Se$). Des interférences matricielles interviennent également pour certains analytes et la composition des échantillons peut affecter la formation des gouttelettes ou la température d'ionisation dans le plasma. Ces phénomènes peuvent aller jusqu'à la suppression des signaux dus à l'analyte. Il est possible d'éviter les interférences physiques en utilisant un étalon interne ou la méthode des ajouts dosés. L'élément utilisé comme étalon interne sera fonction de l'élément à doser ; les éléments $^{59}Co$ et $^{115}In$, par exemple, peuvent être employés comme étalons internes.

Le principal atout des instruments de SM-ICP est leur résolution, c'est-à-dire l'efficacité de séparation de 2 masses voisines. Les analyseurs quadripolaires sont, à cet égard, inférieurs aux analyseurs à secteur magnétique.

MODE OPÉRATOIRE

*PRÉPARATION ET INTRODUCTION DES ÉCHANTILLONS*

La préparation de l'échantillon normalement contient une étape de digestion de la matrice par un procédé approprié, par exemple dans un four à micro ondes. En plus, il est important que la concentration de l'analyte se situe dans la gamme d'analyse de l'instrument (grâce à des opérations de dilution ou de pré-concentration) et la solution échantillon peut être nébulisée de façon reproductible.

Certains systèmes d'introduction des échantillons tolèrent des concentrations en acides élevées, mais l'emploi d'acide sulfurique ou phosphorique peut contribuer au bruit de fond. L'emploi d'acide nitrique ou chlorhydrique est donc préférable. Il existe également des systèmes d'introduction des échantillons et des torches (par exemple constitués de polymère alcoxyde perfluoré) qui résistent à l'acide fluorhydrique et permettent donc l'utilisation de cet acide. Différents critères conditionnent la sélection d'une méthode d'introduction de l'échantillon : sensibilité, stabilité, vitesse, taille de l'échantillon, résistance à la corrosion, résistance au colmatage. Les nébuliseurs à flux croisé combinés à une chambre de pulvérisation et une torche répondent à la plupart de ces exigences. Les pompes péristaltiques délivrent généralement les solutions à un débit de 20-1000 µL/min.

Si l'on utilise des solvants organiques, il y a lieu d'envisager l'introduction d'oxygène pour éviter la formation de phases organiques.

*CHOIX DES CONDITIONS OPÉRATOIRES*

Il convient d'opérer dans les conditions normales prescrites par le fabricant. En règle générale, elles sont différentes pour les solutions aqueuses et pour les solvants organiques. Les paramètres opératoires doivent être convenablement choisis :

- sélection des cônes (matériau constitutif de l'échantillonneur et de l'écorceur),
- débits du gaz plasmagène (tubes externe, médian et interne de la torche),
- puissance haute fréquence,
- vitesse de la pompe,
- sélection d'un ou plusieurs isotope(s) de l'élément à mesurer (masse).

SÉLECTION DES ISOTOPES

La sélection des isotopes s'effectue sur la base de plusieurs critères. L'isotope le plus abondant d'un élément donné peut être choisi pour obtenir une sensibilité maximale, mais il est également important de choisir l'isotope qui présente le moins d'interférence avec d'autres espèces présentes dans la matrice de l'échantillon ou le gaz plasmagène. Des informations sur les interférences isobares et les interférences dues à des ions polyatomiques de divers types (hydrures, oxydes, chlorures, etc.) sont généralement fournies par les fabricants dans les logiciels équipant les instruments de SM-ICP.

CONTRÔLE DES PERFORMANCES DE L'INSTRUMENTATION

**Conformité du système**

- Le réglage de l'instrument permet de vérifier et d'ajuster la mesure avant l'analyse des échantillons. L'exactitude en masse de la SM-ICP est vérifiée à l'aide d'une solution contenant plusieurs isotopes qui couvrent l'ensemble de la gamme de masse, par exemple $^{9}Be$, $^{59}Co$, $^{89}Y$, $^{115}In$, $^{140}Ce$ et $^{209}Bi$.
- La sensibilité ainsi que la stabilité à court et long terme sont établies. Il faut optimiser les paramètres instrumentaux (plasma, lentilles ioniques et quadripôle) de façon à obtenir le nombre d'impulsions le plus élevé possible.
- Le réglage de la résolution et de l'axe des masses est effectué avec une solution de Li, Y et Tl, l'objectif étant d'assurer l'obtention d'une réponse acceptable sur un large intervalle de masse.
- L'efficacité du plasma à décomposer les oxydes est évaluée afin de limiter ces interférences. Le rapport Ce/CeO et/ou Ba/BaO constitue un bon indicateur ; une valeur inférieure à environ 3 pour cent est requise.
- Les réglages permettant de limiter la formation d'ions doublement chargés sont effectués au moyen de Ba ou de Ce, l'objectif étant d'obtenir entre l'ion doublement chargé et l'élément visé un rapport inférieur à 2 pour cent.
- La stabilité à long terme est évaluée par analyse d'un étalon avant et après la série de mesures portant sur l'échantillon, l'objectif étant de vérifier que les dépôts de sels sur les cônes n'entraînent pas une réduction progressive du signal.

VALIDATION DE LA MÉTHODE

Les performances des méthodes prescrites dans les monographies sont vérifiées à intervalles de temps appropriés.

*LINÉARITÉ*

Préparez et analysez au moins 4 solutions de référence couvrant l'intervalle d'étalonnage, plus une solution à blanc, avec au minimum 5 réplications.

Calculez la courbe d'étalonnage par la méthode des moindres carrés à partir de l'ensemble des valeurs mesurées. Représentez graphiquement la courbe de régression, les moyennes, les valeurs mesurées et l'intervalle de confiance de la courbe d'étalonnage. Le mode opératoire est valable si :

- le coefficient de corrélation est supérieur ou égal à 0,99,
- les résidus obtenus pour chaque concentration d'étalonnage présentent une distribution aléatoire autour de la courbe d'étalonnage.

Calculez la moyenne et l'écart type relatif pour la concentration la plus faible et la plus élevée de la gamme d'étalonnage.

Si le rapport des écarts types estimés pour la plus faible et la plus élevée des concentrations d'étalonnage est inférieur à 0,5 ou supérieur à 2,0, une estimation plus précise de la courbe d'étalonnage peut être obtenue par régression linéaire pondérée. Des fonctions de pondération du 1er et du 2nd degré sont appliquées aux données pour déterminer la fonction de pondération la plus appropriée.

Si les moyennes présentent un écart de linéarité par rapport à la courbe d'étalonnage, une régression linéaire bidimensionnelle est utilisée.

*EXACTITUDE*

Vérifiez l'exactitude en utilisant de préférence un matériel de référence certifié (CRM, *certified raw material*). En cas d'impossibilité, effectuez un essai de recouvrement.

**Recouvrement**. Pour les dosages, un recouvrement de 90 pour cent à 110 pour cent doit être obtenu. Pour d'autres déterminations, par exemple le dosage d'éléments traces, l'essai n'est valable que si le recouvrement se situe dans l'intervalle allant de 80 pour cent à 120 pour cent de la valeur théorique. Le recouvrement peut être déterminé sur une solution de référence appropriée (matrice) dopée avec une quantité connue de l'élément à analyser (intervalle de concentration approprié à l'échantillon à analyser).

*RÉPÉTABILITÉ*

La répétabilité est au maximum de 3 pour cent pour un dosage et de 5 pour cent pour un essai de pureté.

*LIMITE DE QUANTIFICATION*

Vérifiez que la limite de quantification (déterminée par exemple par l'approche dite 10 $\sigma$) est inférieure à la valeur à mesurer.

**01/2011:20259**

# 2.2.59. ANALYSE GLYCANIQUE DES GLYCOPROTÉINES

## 1. INTRODUCTION

L'analyse glycanique est l'analyse des fractions glucidiques des glycoprotéines. L'essai peut porter sur :

- l'analyse de la glycoprotéine entière,
- la séparation et la détection de différentes glycoformes de la protéine,
- l'analyse des glycopeptides obtenus après traitement enzymatique de la glycoprotéine,
- l'analyse des glycanes libérés par traitement chimique ou enzymatique de la glycoprotéine.

Une analyse des monosaccharides peut compléter les données issues de l'analyse glycanique.

La glycosylation peut jouer un rôle décisif dans la détermination des propriétés de fonctionnalité, de pharmacocinétique, de pharmacodynamie, de stabilité et d'immunogénicité des produits biothérapeutiques. Contrairement à la transcription, la glycosylation est un processus de modification enzymatique non dirigé par une matrice, qui entraîne une hétérogénéité glycanique. Le processus de fabrication peut également avoir une influence sur l'hétérogénéité glycanique. L'analyse glycanique des glycoprotéines peut donc être d'une grande utilité pour identifier les variations du profil de glycosylation d'une glycoprotéine et/ou surveiller la reproductibilité du profil de glycosylation en cours de production.

L'analyse glycanique peut être une procédure comparative, car la comparaison des données respectivement obtenues avec la substance à examiner et avec une substance de référence ayant subi le même traitement permet de confirmer l'homogénéité du produit.

Le présent chapitre décrit les approches utilisées en analyse glycanique et les exigences à respecter pour l'application et la validation des méthodes.

L'analyse glycanique n'est pas une méthode à caractère universel dans le sens où elle implique, pour chaque glycoprotéine, la mise en oeuvre de procédures et le développement de cartes glycaniques spécifiques. Ces procédures spécifiques sont par conséquent décrites dans les monographies des glycoprotéines concernées.

### 1-1. *GLYCOSYLATION DES PROTÉINES*

On distingue 3 principaux types de glycosylation enzymatique des protéines :

- la *N*-glycosylation, qui met en jeu l'addition d'oligosaccharides sur l'azote du groupement amide terminal de l'asparagine,
- la *O*-glycosylation, qui met en jeu l'addition d'oligosaccharides sur les groupements hydroxyle de la sérine, de la thréonine et/ou de l'hydroxyproline,
- la *C*-glycosylation, qui met en jeu l'addition d'un $\alpha$-mannopyranose sur le carbone C2 du cycle indole du tryptophane.

Des additions non enzymatiques - phénomène appelé glycation - peuvent intervenir lorsque les protéines sont incubées en présence de sucres réducteurs.

Le présent chapitre décrit les méthodes analytiques applicables dans le cas des *N*- et *O*-glycosylations, qui constituent les types de glycosylation les plus fréquemment rencontrés dans les glycoprotéines utilisées à des fins thérapeutiques.

### 1-2. *HÉTÉROGÉNÉITÉ DE LA GLYCOSYLATION DES PROTÉINES*

Différents niveaux d'hétérogénéité de la glycosylation peuvent se manifester lors de la production des glycoprotéines. Ils peuvent résulter de variations affectant :

- le degré d'occupation des sites (occupation totale, partielle ou nulle),
- le type de glycosylation (*N*- ou *O*-glycosylation),
- la structure des oligosaccharides (extensions, ramifications, liaisons).

Cette hétérogénéité se traduit par l'existence, pour toute glycoprotéine spécifique, d'un ensemble de glycoformes. Elle résulte de ce que, à la différence de la transcription et de la traduction, la glycosylation est un processus de modification post-traductionnelle non dirigé par une matrice. Le mode de glycosylation en un site donné dépend de multiples facteurs, dont la disponibilité de glycosyltransférases et d'exoglycosidases contenues dans l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique, cette disponibilité étant spécifique de la cellule et/ou fonction de la croissance. La glycosylation des protéines est également influencée par la structure protéique, le procédé de production, le système d'expression hôte-vecteur et les conditions de culture cellulaire.

## 2. PROCÉDURES D'ANALYSE GLYCANIQUE

Il existe 4 approches, distinctes et complémentaires, permettant d'étudier l'hétérogénéité glycanique :

- l'analyse de la glycoprotéine intacte,
- l'analyse des glycopeptides,
- l'analyse des glycanes libérés par clivage,
- l'analyse des monosaccharides.

Cette section décrit les méthodes et exigences générales applicables à l'analyse glycanique des glycoprotéines présentant des *N*-glycanes et des *O*-glycanes.

L'analyse glycanique est généralement un processus multi-étapes, qui peut faire intervenir de nombreuses méthodologies. Cette diversité est le reflet de la variété et de la complexité des structures glycaniques, des technologies et systèmes de détection disponibles, et du large éventail d'approches envisageables selon le niveau d'information requis.

La figure 2.2.59-1 donne une vue d'ensemble des procédures d'analyse glycanique pouvant être utilisées dans le cadre de la stratégie choisie. De nombreuses variantes des techniques et conditions opératoires appliquées existent, en fonction de la structure et de l'origine des glycanes.

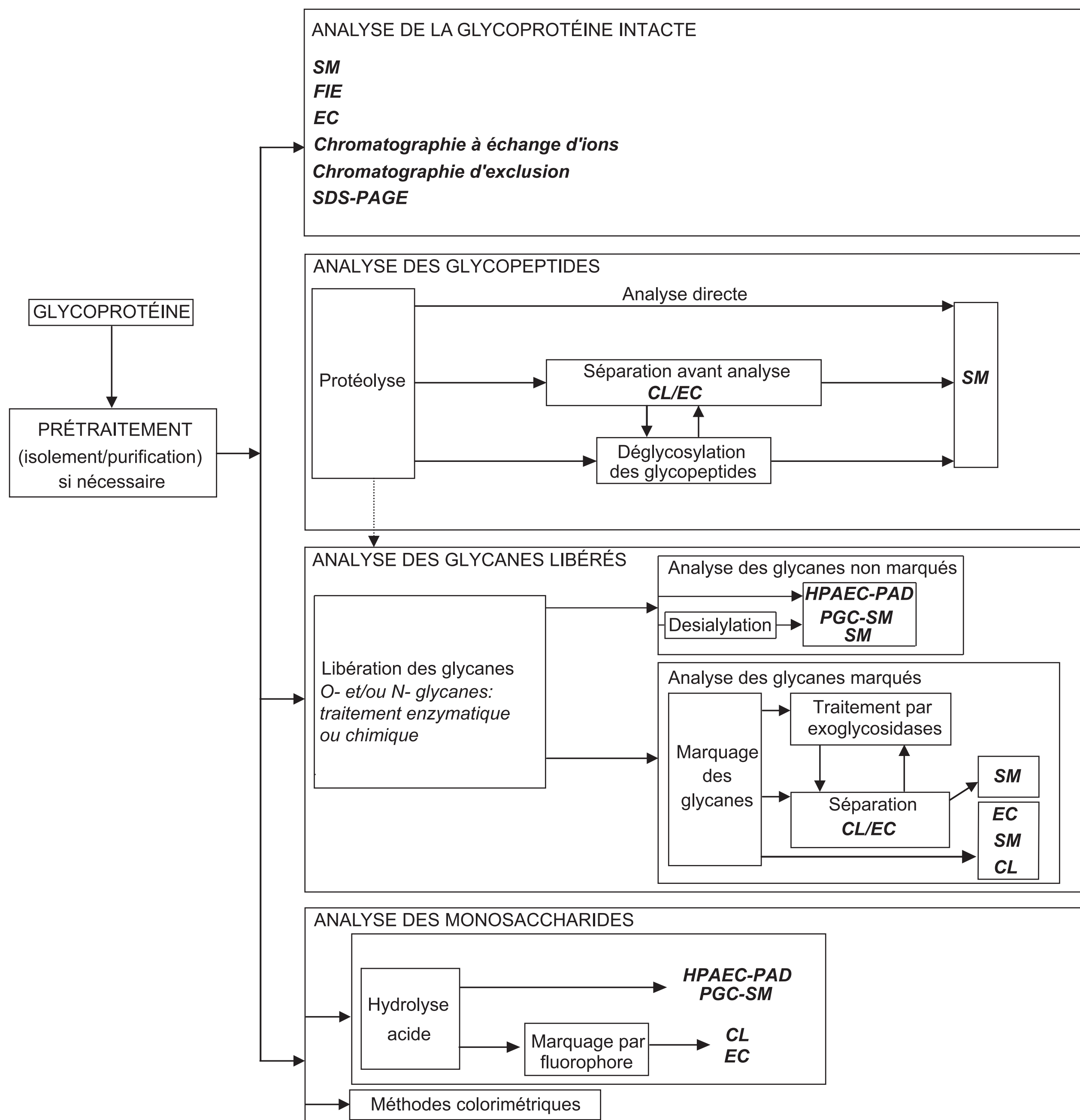
**Isolement et purification**. Des étapes d'isolement et de purification peuvent être nécessaires lorsque l'analyse porte sur la substance en vrac ou sur des formes pharmaceutiques contenant des excipients susceptibles d'interférer dans l'analyse. Ces étapes sont alors décrites dans la monographie de la substance considérée.

2-1. *ANALYSE DE LA GLYCOPROTÉINE INTACTE*

L'analyse de la glycoprotéine intacte apporte des informations sur son profil général de glycosylation.

Cette approche est toutefois d'un intérêt limité lorsque la molécule est de grande taille et comporte de multiples sites de glycosylation.

Elle peut faire intervenir des méthodes telles que l'électrophorèse capillaire (EC) (*2.2.47*) et la spectrométrie de masse (SM) (*2.2.43*). Des techniques fondées sur la taille des molécules, comme la chromatographie d'exclusion (*2.2.30*) et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence




Légende :
CL : Chromatographie liquide
EC : Electrophorèse capillaire
FIE : Focalisation isoélectrique
HPAEC-PAD : Chromatographie à échange anionique haut pH avec détection ampérométrique à champ pulsé
PGC : Chromatographie à carbone graphite poreux
SDS-PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
SM : Spectrométrie de masse

Figure 2.2.59.-1. – *Vue d'ensemble des procédures d'analyse glycanique*

de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) (*2.2.31*), peuvent apporter des informations sur l'état de glycosylation d'une protéine. Si le degré de sialylation contribue significativement à l'activité biologique de la glycoprotéine, on peut recourir à la chromatographie à échange d'ions (*2.2.46*), à la focalisation isoélectrique (FIE) (*2.2.54*), ou à l'EC (*2.2.47*) pour contrôler la sialylation. La technique utilisée sera choisie sur la base de sa capacité à fournir une corrélation fiable entre le degré de sialylation et la bioactivité du produit.

2-2. *ANALYSE DES GLYCOPEPTIDES*

L'analyse des glycopeptides apporte des informations sur les propriétés de glycosylation site par site, le degré d'occupation et les structures oligosaccharidiques. Elle fait intervenir une protéolyse de la glycoprotéine. Des approches permettant un clivage sélectif (à des sites spécifiques) du squelette protéique sont décrites dans le chapitre général *2.2.55. Cartographie peptidique*.

Après la protéolyse de la glycoprotéine, différentes approches sont possibles.

*Analyse directe par SM (2.2.43).* Il faut veiller à ce que le signal dû aux glycopeptides ne soit pas masqué par la présence d'autres peptides, si les glycopeptides représentent une fraction minoritaire d'un mélange de peptides et s'ils produisent des signaux d'intensité plus faible que celle des signaux dus aux peptides non glycosylés.

*Analyse par SM après séparation*. L'étape de séparation permet d'éviter les problèmes évoqués ci-dessus. Des techniques d'enrichissement ou de fractionnement peuvent être utilisées comme complément, soit en parallèle soit en série, de l'analyse directe. Des méthodes de séparation comme la chromatographie liquide (CL) (*2.2.29*) et l'EC (*2.2.47*) conviennent à cet usage. Elles peuvent être couplées à la SM pour permettre des analyses SM en ligne.

*Déglycosylation des glycopeptides*. L'identification des différents sites de glycosylation d'une glycoprotéine est possible par comparaison des cartes peptidiques respectivement obtenues par protéolyse de la glycoprotéine intacte et à partir de la glycoprotéine ayant subi une déglycosylation avant ou après la protéolyse. La masse des peptides livre des informations sur les sites de glycosylation et, en calculant la différence de masse entre les glycopeptides intacts et les glycopeptides déglycosylés, on peut obtenir des informations (composition et hétérogénéité) sur les glycanes portés par la structure. Les stratégies de déglycosylation du squelette protéique font l'objet de la section 2-3-1. Une étape de séparation peut intervenir avant ou après la déglycosylation.

2-3. *ANALYSE DES GLYCANES LIBÉRÉS*

L'analyse des glycanes libérés constitue un moyen pratique d'obtenir des informations sur les différentes populations de glycanes portées par la protéine (glycanes bi-, tri- ou tétra-antennaires). Le degré de sialylation peut également être étudié à ce stade. Selon la méthode choisie, une étape préalable de dérivatisation/marquage peut être nécessaire pour permettre la détection des glycanes.

L'analyse des glycanes après clivage comprend généralement la libération et la purification des glycanes à partir du mélange réactif, suivies si nécessaire d'une étape de marquage/dérivatisation des glycanes, puis de l'établissement du profil glycanique (fractionnement ou séparation).

2-3-1. **Libération des glycanes**

Le choix de la stratégie utilisée pour libérer les glycanes dépend de la glycoprotéine à analyser. L'agent de clivage utilisé est choisi en fonction du type de clivage et du niveau d'information requis. Le clivage peut être effectué par traitement enzymatique ou chimique. Le tableau 2.2.59.-1 donne une liste, non exhaustive, des agents de clivage enzymatique et de leur spécificité d'action.

L'efficacité du processus de libération dépend généralement de l'accessibilité des glycanes sur le squelette protéique ; on peut donc procéder à une dénaturation de la protéine pour améliorer l'exposition des sites de glycosylation, à moins que l'on ne veuille distinguer les glycanes de surface des glycanes « profonds ».

Tableau 2.2.59.-1. – *Exemples d'agents de clivage enzymatique*

| Agents | Spécificité |
|---|---|
| **Libération des *N*-glycanes** | |
| **Peptide-*N*⁴-(*N*-acétyl-β-glucosaminyl) asparagine amidase (EC 3.5.1.52)** | **Hydrolyse d'un résidu *N*⁴-(acétyl-β-D-glucosaminyl)asparagine, avec glycosylation supplémentaire éventuelle du résidu glucosamine, donnant une *N*-acétyl-β-D-glucosaminylamine (substituée) et un peptide contenant un résidu aspartate** |
| - Peptide *N*-glycosidase F (PNGase F) | Libération des chaînes *N*-glycaniques, sauf celles à (α1,3)-fucose appartenant au noyau central |
| - Peptide *N*-glycosidase A (PNGase A) | Libération des chaînes *N*-glycaniques à (α1,3)-fucose appartenant au noyau central |
| **Mannosyl-glycoprotéine endo-β-*N*-acétylglucosaminidase (EC 3.2.1.96)** | **Endohydrolyse de l'unité *N,N'*-diacétylchitobiosyl dans les glycopeptides/glycoprotéines de type oligomannosidique contenant la structure -[Man(GlcNAc)$_2$]Asn** |
| - Endo-β-*N*-acétylglucosaminidase F (endo F) | Libération des oligosaccharides de type oligomannosidique, *N*-lactosaminique ou hybride |
| - Endo-β-*N*-acétylglucosaminidase H (endo H) | Libération des oligosaccharides de type oligomannosidique ou hybride |
| **Libération des *O*-glycanes** | |
| **Glycopeptide α-*N*-acétylgalactosaminidase (EC 3.2.1.97)*** | **Hydrolyse des résidus D-galactosyl-*N*-acétyl-α-D-galactosaminidiques terminaux** |
| * Cette enzyme est d'un usage limité, en raison de sa grande spécificité de substrat. | |

Des agents de clivage chimique peuvent également être utilisés (par exemple de l'hydrazine ou des borohydrures alcalins, qui opèrent par β-élimination).

2-3-2. **Analyse des glycanes**

L'analyse des glycanes libérés ou l'étude de leur profil sont effectuées par des techniques de chromatographie, d'électrophorèse ou de spectrométrie de masse, généralement utilisées en combinaison. Le choix de la méthode à utiliser est fonction de la nature des glycanes et du niveau d'information requis.

L'analyse des glycanes apporte des informations sur les différentes populations de glycanes portées par la protéine (type oligomannosidique, *N*-lactosaminique ou hybride). L'analyse des glycanes désialylés livre des informations sur les quantités relatives de structures ramifiées.

Une étape de séparation peut être nécessaire. Elle fait intervenir, comme techniques intermédiaires, la CL (*2.2.29*) et l'EC (*2.2.47*). Il est possible d'utiliser la CL (*2.2.29*) comme technique préparative, en collectant chaque fraction (un marquage est généralement nécessaire), ou de la coupler directement à la SM (*2.2.43*).

2-3-2-1. *Analyse des glycanes non marqués*

Les glycanes non marqués peuvent être analysés par chromatographie à échange anionique haut pH avec détection ampérométrique en champ pulsé (HPAEC-PAD), par chromatographie à carbone graphite poreux (PGC) et par SM (*2.2.43*).

L'HPAEC-PAD possède une haute sensibilité et la capacité de séparer également les isomères de liaison. Les facteurs de réponse associés aux signaux des différentes stuctures oligosaccharidiques ne sont pas identiques. La quantification absolue du glycane est impossible à moins de pouvoir se référer à une bibliothèque d'oligosaccharides de référence. On peut, pour procéder à la quantification, comparer la substance

examinée à un étalon de référence correspondant bien caractérisé, ou rapporter la surface du pic de chaque glycane à la surface totale des pics de la carte glycanique.

La PGC peut aussi séparer les glycanes non marqués, du fait de sa haute sélectivité par rapport aux colonnes non polaires conventionnelles. On peut recourir à une approche PGC-ionisation par electrospray-SM pour l'analyse glycanique directe.

2-3-2-2. *Analyse des glycanes marqués*

*Marquage des glycanes*

Le type de dérivatisation effectuée dépendra de la méthode utilisée pour détecter les glycanes : UV ou fluorescence.

La dérivatisation avec des marqueurs fluorescents est la technique la plus couramment utilisée pour marquer les glycanes à leur extrémité réductrice, par amination réductrice. Un marqueur peut être fixé à chaque mono- et oligosaccharide, ce qui permet la détermination en quantités molaires. Le tableau 2.2.59.-2 dresse une liste, non exhaustive, des marqueurs fluorescents courants et des techniques analytiques associées.

Tableau 2.2.59.-2. – *Exemples de marqueurs fluorescents et de techniques appropriées*

| Nom | Acronyme | Techniques analytiques |
|---|---|---|
| Acide 2-aminobenzoïque | 2-AA | CL (*2.2.29*), SM (*2.2.43*) |
| 2-Aminobenzamide | 2-AB | CL (*2.2.29*), SM (*2.2.43*) |
| 2-Aminopyridine | 2-AP | CL (*2.2.29*), SM (*2.2.43*) |
| 2-Amino-9(10*H*)-acridinone | AMAC | Electrophorèse sur gel (*2.2.23*) |
| Acide 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonique trisodique | APTS | EC (*2.2.47*) |

La perméthylation des glycanes – qui repose sur la méthylation des oligosaccharides – est également une approche possible lorsque la spectrométrie de masse (*2.2.43*) est utilisée seule pour la détection.

*Analyse des glycanes marqués*

L'analyse des glycanes marqués peut être effectuée au moyen de techniques analytiques telles que la CL (*2.2.29*), l'EC (*2.2.47*) et la SM (*2.2.43*).

Selon leur comportement séparatif, on peut faire appel pour caractériser et quantifier les glycanes à divers systèmes de CL (*2.2.29*), en utilisant un marqueur approprié : CL en phase inversée (séparation en fonction des propriétés hydrophobes), en phase normale (séparation en fonction de la taille) et à échange d'anions (séparation en fonction de la charge).

2-4. *ANALYSE DES MONOSACCHARIDES*

L'analyse des monosaccharides apporte des informations sur la composition monosaccharidique des glycoprotéines.

Elle peut être réalisée par des méthodes colorimétriques ou séparatives.

2-4-1. **Méthodes colorimétriques**

Les méthodes colorimétriques, qui reposent sur une coloration chimique, apportent des informations quantitatives sur des classes de sucres spécifiques telles que acides sialiques, sucres neutres, hexosamines.

2-4-2. **Méthodes séparatives**

Les méthodes séparatives fournissent des informations quantitatives sur la composition générale en monosaccharides. Elles nécessitent, préalablement à l'analyse, une hydrolyse acide des chaînes oligosaccharidiques de la glycoprotéine intacte ou des glycanes libérés. La libération des acides sialiques est effectuée dans des conditions d'hydrolyse acide douce ou par traitement enzymatique. Cette étape est une importante source de variabilité, et peut nécessiter d'être validée pour chaque produit.

Les méthodes de séparation et de quantification des monosaccharides comprennent :

– l'HPAEC-PAD et la PGC-SM, qui permettent de déterminer des quantités molaires de monosaccharides non marqués (acides sialiques, sucres neutres, polyols),
– le marquage des monosaccharides par des fluorophores, suivi d'une analyse séparative, par exemple par chromatographie en phase inversée ou à échange d'ions, ou par EC.

3. ÉVALUATION ET ANALYSE DES DONNÉES

Les données générées par l'analyse glycanique peuvent être analysées et évaluées au regard de 3 types d'objectifs :

– confirmation de l'identité de structures individuelles ou de familles de structures,
– confirmation de la conformité de la substance examinée à des spécifications qualitatives,
– confirmation de la conformité de la substance examinée à des spécifications quantitatives.

Les aspects spécifiques concernant les étalons de référence associés aux différents niveaux d'analyse et le développement des méthodes sont respectivement traités dans les sections 4 et 5.

3-1. *CONFIRMATION DE L'IDENTITÉ DE STRUCTURES INDIVIDUELLES OU DE FAMILLES DE STRUCTURES*

La cible d'une méthode d'analyse glycanique peut être un monosaccharide particulier (acide sialique, fucose, etc), une structure oligosaccharidique donnée (glycane tétra-sialylé, tétra-antennaire, etc.) ou une famille de structures partageant une certaine caractéristique analytique (glycanes tétra-sialylés, glycanes tri-antennaires, isoformes de même charge de la glycoprotéine, etc.). La confirmation de l'identité de cette cible analytique est une étape essentielle de l'analyse et de l'évaluation des données. Elle peut être réalisée de façon absolue par vérification de la structure moléculaire, ou de façon relative par comparaison à un étalon de référence approprié.

3-1-1. **Confirmation absolue de l'identité**

La confirmation absolue de l'identité des structures glycaniques est généralement réalisée lors du développement du produit, et par conséquent ne constitue pas nécessairement un des objectifs des analyses de routine. L'identité de la cible analytique sera établie par référence à une propriété connue de la molécule. Cette identification absolue de structures individuelles peut nécessiter des approches multi-étapes, mettant en oeuvre des réactions enzymatiques et chimiques, des techniques de séparation et des méthodes de détection en ligne et hors ligne ; elle repose très souvent sur la détermination du rapport charge/masse d'un ion moléculaire, par une méthode de spectrométrie de masse appropriée qui constitue la base finale de la caractérisation structurale.

3-1-2. **Confirmation comparative de l'identité**

Lors de l'application en routine de la méthode, l'identité de la cible analytique peut être confirmée par comparaison à des étalons de référence issus du processus de fabrication ou à des étalons de référence utilisés pour vérifier la conformité du système. Ces étalons peuvent provenir d'un lot bien caractérisé du produit à examiner, établi comme étalon de référence. Ils peuvent également être obtenus à partir de glycoprotéines connues, bien caractérisées, pouvant appartenir à la même classe générale que le produit à examiner (par exemple la fétuine pour les glycoprotéines *N*-glycosylées complexes). Les remarques suivantes concernent la confirmation comparative de l'identité structurale :

– lorsque la reproductibilité des temps de rétention est élevée, et validée, les temps de rétention absolus peuvent être utilisés pour confirmer l'identité ;
– on peut également injecter un marqueur glycanique en début et en fin de la séquence d'analyse, et vérifier l'absence de dérive du temps de rétention ; ces enregistrements de référence permettront d'identifier les glycanes présents dans la préparation à examiner ;

– lorsque l'on ne dispose pas d'un étalon de référence permettant d'identifier tous les pics des glycanes présents dans l'échantillon à examiner, il est possible d'utiliser les temps de rétention absolus ou relatifs pour suivre et marquer les pics non identifiés.

3-2. *CONFIRMATION DE LA CONFORMITÉ DE LA SUBSTANCE EXAMINÉE À DES SPÉCIFICATIONS QUALITATIVES*

Dans ce contexte, les résultats analytiques obtenus avec le produit à examiner font l'objet d'une évaluation visant à démontrer la conformité à des spécifications. Cette évaluation s'effectue généralement par comparaison à des données obtenues en parallèle avec un étalon de référence de la substance à examiner. Il faut, lors de l'évaluation des données :

– établir que le résultat analytique obtenu avec l'étalon de référence est comparable au résultat attendu, afin de vérifier la conformité du système ; on peut par exemple procéder, dans une analyse par cartographie glycanique, en comparant la « carte » obtenue avec l'étalon de référence à une carte type - fournie - obtenue lors de l'établissement de cet étalon, et en vérifiant que tous les critères de conformité du système spécifiés sont satisfaits,

– démontrer la similarité des cartes obtenues avec l'étalon de référence et la substance à examiner, sur la base de critères de conformité spécifiques indiqués dans la monographie de la substance.

3-3. *CONFIRMATION DE LA CONFORMITÉ DE LA SUBSTANCE EXAMINÉE À DES SPÉCIFICATIONS QUANTITATIVES*

3-3-1. **Mesure quantitative des teneurs en analytes et expression des résultats**

Dans certains cas, par exemple lors de la mesure de la teneur en acide sialique ou autres monosaccharides, les données peuvent être exprimées en termes de rapport molaire acide sialique/glycoprotéine. Le calcul doit être effectué à l'aide d'un étalon de référence pour l'acide sialique et à une méthode validée pour la teneur en protéine. On peut avoir recours soit à la méthode de l'étalon interne soit à celle de l'étalon externe (voir chapitre *2.2.46. Techniques de séparation chromatographique*).

3-3-2. **Expressions quantitatives du profil de séparation**

Il existe différents moyens d'exprimer numériquement les profils ou modes de distribution, notamment le procédé de normalisation : on détermine la teneur pour cent de chaque cible analytique, par exemple une entité glycanique, en calculant le pourcentage que représente la réponse due à l'entité glycanique par rapport à la réponse totale due à l'ensemble des entités, à l'exclusion des réponses dues aux solvants et aux réactifs éventuellement ajoutés, et des réponses inférieures à la limite d'exclusion. Par ailleurs, des expressions numériques du profil de séparation, telles que le nombre *Z*, qui sont spécifiques de chaque méthode et de chaque produit et qui sont définies dans les monographies individuelles peuvent être utilisées.

## 4. ÉTALONS DE RÉFÉRENCE

Les étalons de référence utilisés en analyse glycanique ont 2 usages : vérification de la conformité du système et confirmation de la conformité de la glycoprotéine examinée aux exigences spécifiées.

Les matériels de référence qui servent à vérifier la conformité du système peuvent être :

– un étalon de référence de la substance à examiner,

– des entités glycaniques libérées à partir d'un étalon de référence totalement caractérisé de la substance à examiner,

– des entités glycaniques bien caractérisées libérées à partir de glycoprotéines telles que la fétuine ou l'IgG,

– des marqueurs glycaniques caractérisés du point de vue de leur identité et de leur pureté.

Les étalons de référence qui servent à vérifier la conformité des glycoprotéines aux spécifications sont des préparations de référence des substances à examiner. Il est à noter que les procédures d'analyse glycanique décrites dans les monographies prescrivent l'emploi d'étalons qui sont des préparations de référence de la glycoprotéine à examiner pour lesquelles la procédure d'analyse glycanique a été validée.

## 5. POINTS À CONSIDÉRER LORS DU DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE

Cette section décrit une approche visant à mesurer les performances globales de la méthode lors de son développement. La procédure analytique et le degré de validation requis sont choisis en fonction de leur adéquation à chaque produit. Selon l'approche adoptée, l'analyse glycanique fera intervenir différentes étapes, par exemple :

– isolement et purification (ou dessalage) de la glycoprotéine,

– traitement enzymatique (ou chimique) de la glycoprotéine en vue de la libération sélective des *N*-glycanes ou des *O*-glycanes par clivage à partir du squelette protéique,

– isolement et purification des glycanes libérés,

– vérification des acides sialiques et des résidus monosaccharidiques libérés,

– marquage des glycanes libérés, au moyen de chromophores,

– séparation des glycanes (non marqués ou après marquage fluorescent),

– identification et quantification des glycanes (par exemple, détermination du nombre *Z*),

– détermination du taux d'occupation des sites sur la base des quantités relatives de peptides glycosylés et non glycosylés.

**Isolement et purification de la protéine**. Il peut être nécessaire d'isoler et purifier la glycoprotéine, à partir de la matrice, pour éliminer tous les facteurs d'interférence (par exemple excipients, sels) ; cela est alors spécifié dans la monographie spécifique. Ces opérations doivent être réalisées de manière reproductible, pour assurer un recouvrement quantitatif de la protéine.

**Libération et isolement des oligosaccharides**. L'approche adoptée pour la libération des glycanes dépendra de la protéine considérée, et sera fondée sur les type des glycosylation en jeu (*N*- glycosylation ou *O*- glycosylation). Les stratégies de libération des glycanes non décrites dans la Pharmacopée Européenne doivent être optimisées de façon à assurer une caractérisation quantitative de toutes les entités glycaniques. Cette optimisation doit porter sur les différents facteurs ayant un impact sur l'efficacité du clivage, comme le rapport des concentrations enzyme/protéine, la température, les temps de réaction et la dénaturation de la protéine avant hydrolyse.

Il est important de souligner que la réaction enzymatique/chimique ne doit pas modifier la composition glycanique, par exemple en détruisant les résidus sialiques. Lorsqu'il existe plusieurs sites de glycosylation, le traitement enzymatique doit entraîner la libération proportionnelle de tous les oligosaccharides portés par la protéine, indépendamment de leur structure et de leur position au sein de cette dernière. Il faut confirmer que le recouvrement de toutes les entités glycaniques à partir du mélange réactif est satisfaisant et reproductible.

**Dérivatisation des glycanes libérés**. La dérivatisation est généralement effectuée selon des protocoles non décrits dans la Pharmacopée Européenne. Il faut donc vérifier que la dérivatisation de toutes les entités glycaniques est satisfaisante et reproductible. On peut réaliser cette condition en optimisant les paramètres opératoires tels que la quantité de réactif de dérivatisation utilisée, la température et la durée de réaction. La réaction de dérivatisation ne doit pas modifier la composition glycanique, par exemple en détruisant les résidus sialiques.

**Séparation, identification et conformité du système**. Les méthodes utilisées pour l'analyse glycanique doivent être capables de détecter et séparer les différentes entités glycaniques, de façon à assurer la fiabilité de leur identification et de leur quantification.

Les critères de conformité du système, qui couvrent également le clivage, le recouvrement et l'analyse des glycanes, dépendent des paramètres d'essai critiques susceptibles d'affecter les résultats.

La comparaison des cartes glycaniques de la substance à examiner et d'une substance de référence, traitée de la même façon, peut servir d'indicateur pour évaluer les performances de la procédure analytique. Pour confirmation des résultats obtenus, les analyses peuvent être répétées selon un modèle orthogonal. L'emploi d'un étalon de référence (par exemple étalon de référence de la substance à examiner, ou marqueur glycanique de conformité du système) est essentiel pour l'établissement des paramètres de conformité du système et la validation de la procédure analytique.

La reproductibilité de l'expression quantitative (nombre *Z* par exemple) des profils glycaniques doit être vérifiée.

**Détermination du taux d'occupation des sites sur la base des quantités relatives de peptides glycosylés et non glycosylés**. Lorsque le taux d'occupation des sites est estimé par comparaison de la proportion de peptides glycosylés et non glycosylés obtenus par clivage enzymatique de la glycoprotéine, il faut démontrer que le clivage des 2 formes du peptide est satisfaisant et reproductible.

## 6. ARBRE D'AIDE À LA DÉCISION EN ANALYSE GLYCANIQUE

Cet arbre d'aide à la décision est publié dans la Pharmacopée Européenne pour information et n'est pas d'application obligatoire.

Le choix des procédures à utiliser pour l'analyse glycanique est effectué en fonction du niveau d'information requis pour assurer la qualité de la glycoprotéine. Ce choix est effectué lors de la phase de développement du produit.

La figure 2.2.59.-2 fournit des recommandations pour le choix des méthodes à utiliser lorsqu'une analyse glycanique est requise.

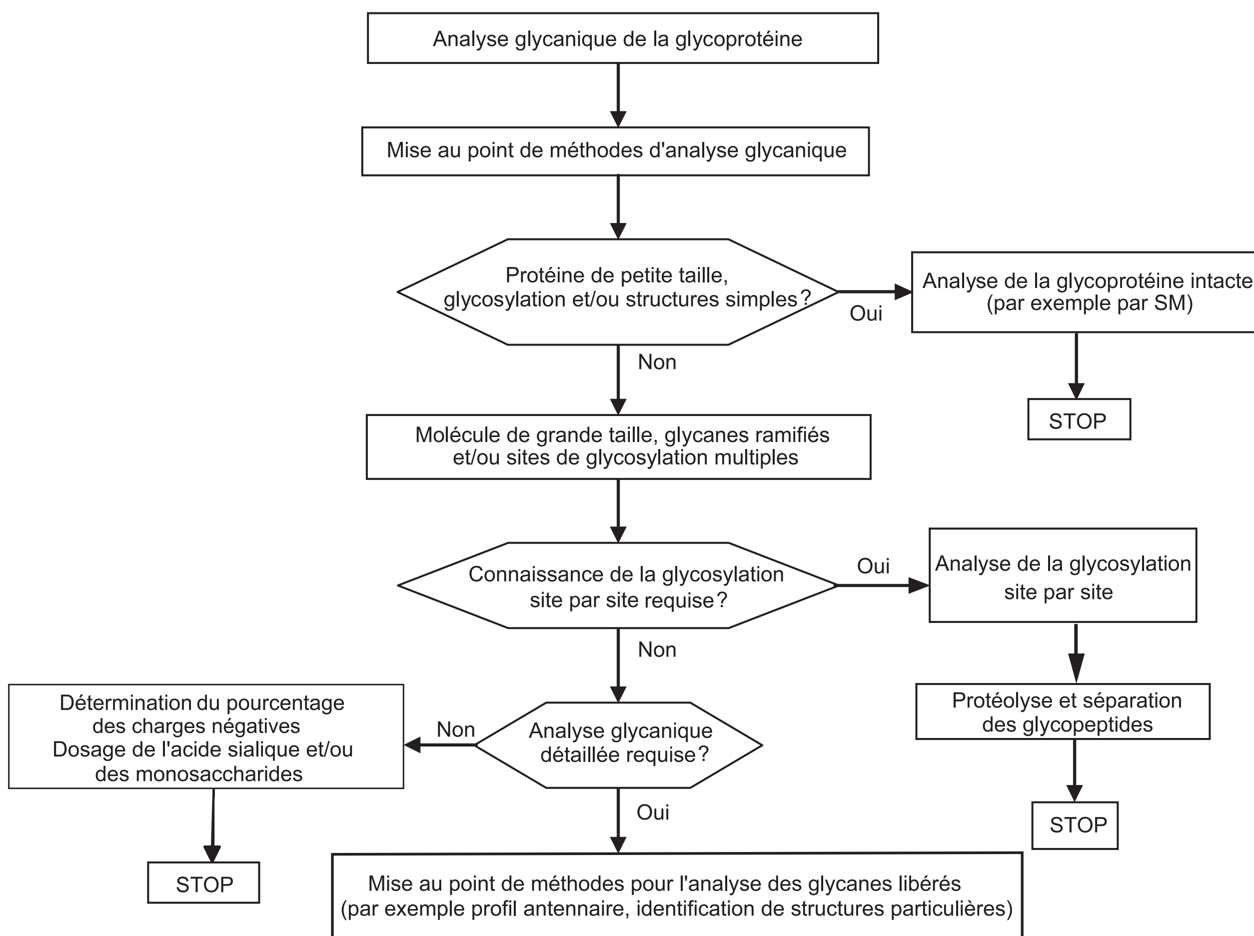



Figure 2.2.59.-2. – *Choix des méthodes à utiliser pour une analyse glycanique*

**04/2008:20260**

# 2.2.60. POINT DE FUSION - MÉTHODE INSTRUMENTALE

Ce chapitre décrit la mesure du point de fusion par la méthode au tube capillaire avec détermination instrumentale.

APPAREILLAGE

Il existe 2 modes d'observation automatique selon la configuration choisie :

– mode A : par transmission de la lumière à travers le tube capillaire rempli d'échantillon,

– mode B : par réflexion de la lumière sur l'échantillon contenu dans le tube capillaire.

Pour les 2 modes, le tube capillaire est placé dans une cavité d'un bloc métallique chauffé électriquement et contrôlé par une sonde de température située dans une autre cavité du bloc.
Le bloc chauffant peut être maintenu avec exactitude à une température prédéfinie (± 0,1 °C) par l'élément de chauffage ou être réchauffé à une vitesse lente et régulière de 1 °C/min, après une période initiale isotherme.

Dans le mode A, un faisceau lumineux traverse une fente horizontale puis est détecté par un capteur opposé après son passage à travers le tube capillaire.

Dans le mode B, un faisceau lumineux illumine frontalement le tube capillaire et la sonde enregistre l'image.

Certains appareillages permettent une détermination visuelle du point de fusion.

La température à laquelle le signal émis par le capteur change par rapport à sa valeur initiale est définie comme étant le début de la fusion, et la température à laquelle le signal émis par le capteur atteint sa valeur finale est définie comme la fin de la fusion ou point de fusion.

Utilisez des tubes capillaires en verre, ouverts à une extrémité, d'environ 100 mm de longueur, d'un diamètre externe de 1,3-1,5 mm et d'un diamètre interne de 0,8-1,3 mm. L'épaisseur des parois du tube est de 0,1-0,3 mm.

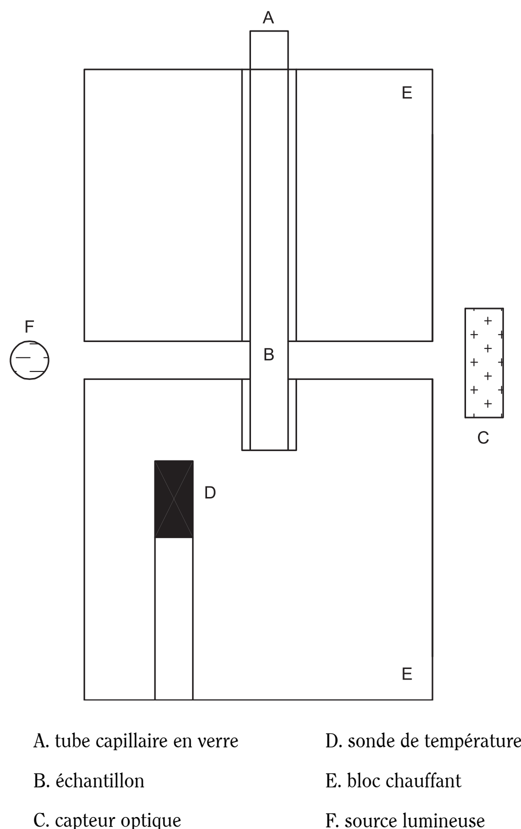
Certains appareillages permettent la détermination du point de fusion sur plusieurs tubes capillaires.

PROCÉDÉ

Introduisez dans le tube capillaire une quantité suffisante de substance à examiner, préalablement traitée selon les prescriptions de la monographie, pour former dans chaque tube une colonne compacte d'environ 4 mm de hauteur et laissez les tubes reposer à la température prescrite pendant une durée appropriée.

Procédez comme indiqué ci-après ou selon les instructions du fabricant. Chauffez le bloc chauffant jusqu'à ce que la température soit inférieure d'environ 5 °C au point de fusion supposé de la substance à examiner.

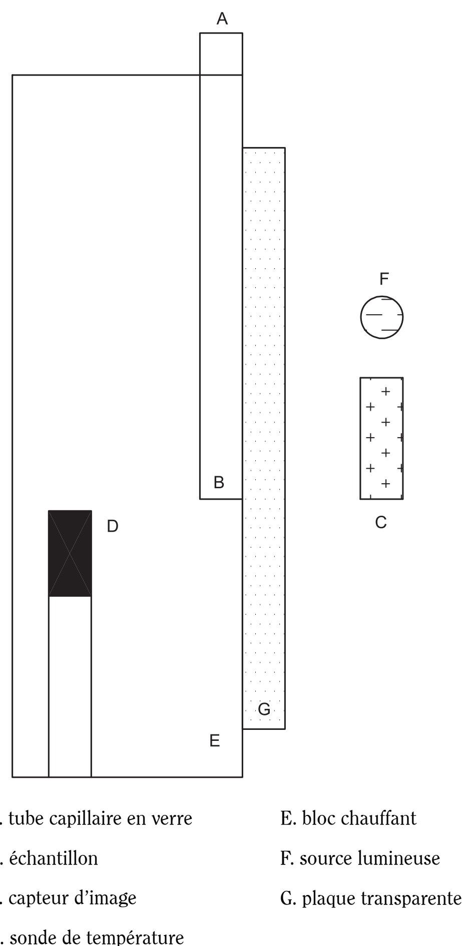
Placez le tube capillaire dans le bloc chauffant, l'extrémité fermée du tube dirigée vers le bas. Lancez le programme de température. Quand la substance commence à fondre, son aspect change dans le tube capillaire. Il en résulte l'enregistrement automatique de la température du bloc chauffant suite aux variations du signal émis par le capteur optique recevant la lumière transmise (mode A, figure 2.2.60.-1) ou suite à un traitement de l'image (mode B, figure 2.2.60.-2).




A. tube capillaire en verre
B. échantillon
C. capteur optique
D. sonde de température
E. bloc chauffant
F. source lumineuse

Figure 2.2.60.-1. – *Mode A : transmission*

Effectuez la détermination sur 2 autres échantillons et calculez la moyenne des 3 résultats.




A. tube capillaire en verre
B. échantillon
C. capteur d'image
D. sonde de température
E. bloc chauffant
F. source lumineuse
G. plaque transparente

Figure 2.2.60.-2. – *Mode B : réflexion*

ÉTALONNAGE

Il est nécessaire de vérifier périodiquement l'échelle des températures de l'appareillage en mesurant le point de fusion de matériaux de référence certifiés. Utilisez des tubes capillaires ayant les mêmes dimensions que ceux utilisés pour la détermination du point de fusion (voir Appareillage).

Préparez 3 tubes capillaires pour chacun des matériaux de référence certifiés (au moins 2 matériaux sont utilisés). Effectuez la détermination et calculez la moyenne des 3 résultats, pour chaque matériau.

CONFORMITÉ DU SYSTÈME

Outre la calibration, effectuez une vérification, avant les mesures, à l'aide d'un matériau de référence certifié approprié dont le point de fusion est proche du point de fusion supposé de la substance à examiner.

Préparez 3 tubes capillaires. Effectuez la détermination du point de fusion et calculez la moyenne des 3 résultats.

Cette moyenne est comprise dans la tolérance indiquée sur le certificat accompagnant le matériau de référence certifié.

# 2.3. IDENTIFICATION

# 2.3. IDENTIFICATION

**01/2008:20301**

## 2.3.1. RÉACTIONS D'IDENTITÉ DES IONS ET DES GROUPES FONCTIONNELS

ACÉTATES

a) Chauffez la substance à examiner avec une quantité égale d'*acide oxalique R*. Il se dégage des vapeurs identifiées par leur odeur caractéristique d'acide acétique et leur réaction acide (*2.2.4*).

b) Dissolvez 30 mg environ de la substance à examiner dans 3 mL d'*eau R* ou utilisez 3 mL de la solution prescrite. Ajoutez successivement 0,25 mL de *solution de nitrate de lanthane R*, 0,1 mL d'*iode 0,05 M* et 0,05 mL d'*ammoniaque diluée R2*. Chauffez prudemment à ébullition. En quelques minutes, il apparaît un précipité bleu ou une coloration bleu foncé.

ACÉTYLE

Dans un tube à essai de 18 mm environ de diamètre extérieur et de 180 mm environ de longueur, introduisez 15 mg environ de la substance à examiner ou la quantité prescrite et 0,15 mL d'*acide phosphorique R*. Fermez le tube à essai avec un bouchon portant à l'intérieur un petit tube à essai de 100 mm environ de longueur et de 10 mm de diamètre extérieur. Ce petit tube, rempli d'*eau R*, sert de réfrigérant. Sa paroi extérieure retient une goutte de *solution de nitrate de lanthane R*. Sauf dans le cas de substances difficilement hydrolysables, placez l'appareil dans un bain-marie pendant 5 min, puis retirez le petit tube à essai, prélevez la goutte retenue et mélangez-la sur une plaque à touche avec 0,05 mL d'*iode 0,01 M*. Ajoutez sur le bord de la goutte 0,05 mL d'*ammoniaque diluée R2*. Après 1 min à 2 min, il se développe à la zone limite une coloration bleue devenant peu à peu plus foncée et persistant un certain temps.

Dans le cas de *substances difficilement hydrolysables*, chauffez lentement le mélange sur une flamme nue jusqu'à ébullition, puis continuez d'après les indications données ci-dessus.

ALCALOÏDES

Dissolvez quelques milligrammes de la substance à examiner ou la quantité prescrite dans 5 mL d'*eau R* et ajoutez de l'*acide chlorhydrique dilué R* jusqu'à réaction acide (*2.2.4*). Ajoutez 1 mL de *solution d'iodobismuthate de potassium R*. Il se forme immédiatement un précipité orangé ou rouge orangé.

ALUMINIUM

Dissolvez 15 mg environ de la substance à examiner dans 2 mL d'*eau R* ou utilisez 2 mL de la solution prescrite. Ajoutez 0,5 mL environ d'*acide chlorhydrique dilué R* et 0,5 mL environ de *réactif au thioacétamide R*. Il ne se forme pas de précipité. Ajoutez, goutte à goutte, de la *solution diluée d'hydroxyde de sodium R*. Il se forme un précipité blanc gélatineux qui se dissout par addition de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R*. Ajoutez progressivement de la *solution de chlorure d'ammonium R* ; le précipité blanc gélatineux réapparaît.

AMINES PRIMAIRES AROMATIQUES

Acidifiez la solution prescrite avec de l'*acide chlorhydrique dilué R* et ajoutez 0,2 mL de *solution de nitrite de sodium R*. Après 1 min à 2 min, ajoutez 1 mL de *solution de β-naphtol R*. Il apparaît une intense coloration orangée ou rouge et généralement un précipité de même teinte.

AMMONIUM (SELS D')

A la solution prescrite, ajoutez 0,2 g d'*oxyde de magnésium R*. Faites barboter de l'air dans le mélange et dirigez le gaz qui s'échappe à la surface d'un mélange de 1 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* et de 0,05 mL de *solution de rouge de méthyle R*. Le mélange vire au jaune et il se forme un précipité jaune par addition de 1 mL d'une solution récemment préparée de *cobaltinitrite de sodium R* à 100 g/L.

AMMONIUM (SELS D') ET SELS DE BASES VOLATILES

Dissolvez 20 mg environ de la substance à examiner dans 2 mL d'*eau R* ou utilisez 2 mL de la solution prescrite. Ajoutez 2 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* et chauffez. Il se dégage des vapeurs identifiées par leur odeur et leur réaction alcaline (*2.2.4*).

ANTIMOINE

Dissolvez en chauffant doucement 10 mg environ de la substance à examiner dans une solution de 0,5 g de *tartrate de potassium et de sodium R* dans 10 mL d'*eau R* et refroidissez. A 2 mL de cette solution ou de la solution prescrite, ajoutez, goutte à goutte, de la *solution de sulfure de sodium R*. Il se forme un précipité rouge orangé qui se dissout par addition de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R*.

ARGENT

Dissolvez 10 mg environ de la substance à examiner dans 10 mL d'*eau R* ou utilisez 10 mL de la solution prescrite. Ajoutez 0,3 mL d'*acide chlorhydrique R1*. Il se forme un précipité blanc caillebotté qui se dissout par addition de 3 mL d'*ammoniaque diluée R1*.

ARSENIC

Chauffez au bain-marie 5 mL de la solution prescrite avec un volume égal de *réactif hypophosphoreux R*. Il se forme un précipité brun.

BARBITURIQUES NON SUBSTITUÉS À L'AZOTE

Dissolvez 5 mg environ de la substance à examiner dans 3 mL de *méthanol R*. Ajoutez 0,1 mL d'une solution contenant 100 g/L de *nitrate de cobalt R* et 100 g/L de *chlorure de calcium R*. Mélangez et ajoutez en agitant 0,1 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R*. Il apparaît une coloration et un précipité bleu violacé.

BENZOATES

a) A 1 mL de la solution prescrite, ajoutez 0,5 mL de *solution de chlorure ferrique R1*. Il se forme un précipité chamois soluble dans l'*éther R*.

b) Dans un tube à essai, placez 0,2 g de la substance à examiner traitée éventuellement d'après les indications de la monographie. Humectez avec 0,2 mL à 0,3 mL d'*acide sulfurique R*. Chauffez doucement le fond du tube. Un sublimé blanc se dépose sur la paroi intérieure du tube.

c) Dissolvez 0,5 g de la substance à examiner dans 10 mL d'*eau R* ou utilisez 10 mL de la solution prescrite. Ajoutez 0,5 mL d'*acide chlorhydrique R*. Cristallisé dans l'*eau R* chaude, puis desséché sous vide, le précipité obtenu présente un point de fusion (*2.2.14*) de 120 °C à 124 °C.

BISMUTH

a) A 0,5 g de la substance à examiner, ajoutez 10 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*, ou utilisez 10 mL de la solution prescrite. Chauffez à ébullition pendant 1 min. Refroidissez, filtrez si nécessaire. A 1 mL de la solution obtenue, ajoutez 20 mL d'*eau R*. Il se forme un précipité blanc ou légèrement jaune qui, par addition de 0,05 mL à 0,1 mL de *solution de sulfure de sodium R*, vire au brun.

b) A 45 mg environ de la substance à examiner, ajoutez 10 mL d'*acide nitrique dilué R*, ou utilisez 10 mL de la solution prescrite. Chauffez à ébullition pendant 1 min. Refroidissez, filtrez si nécessaire. A 5 mL de la solution obtenue, ajoutez 2 mL d'une solution de *thiourée R* à 100 g/L. Il apparaît une coloration orangé jaune ou un précipité orangé. Ajoutez 4 mL d'une solution de *fluorure de sodium R* à 25 g/L. La solution ne se décolore pas dans les 30 min qui suivent.

BROMURES

a) Dissolvez une quantité de la substance à examiner correspondant à 3 mg environ de bromure ($Br^-$) dans 2 mL d'*eau R*, ou utilisez 2 mL de la solution prescrite. Acidifiez par l'*acide nitrique dilué R* et ajoutez 0,4 mL de *solution*

*de nitrate d'argent R1*. Agitez et laissez reposer. Il se forme un précipité caillebotté jaune pâle. Centrifugez et lavez 3 fois avec 1 mL d'*eau R*. Effectuez cette opération rapidement, à l'abri d'une lumière vive, sans tenir compte du fait que le surnageant ne devient pas parfaitement limpide. Mettez le précipité en suspension dans 2 mL d'*eau R* et ajoutez 1,5 mL d'*ammoniaque R*. Le précipité se dissout difficilement.

b) Dans un petit tube à essai, introduisez une quantité de la substance à examiner correspondant à 5 mg environ de bromure ($Br^-$) ou la quantité prescrite. Ajoutez 0,25 mL d'*eau R*, 75 mg environ de *dioxyde de plomb R*, 0,25 mL d'*acide acétique R* et agitez doucement. Séchez la paroi intérieure de la partie supérieure du tube à essai avec du papier filtre et laissez reposer pendant 5 min. Préparez une bande de papier filtre approprié de dimensions convenables. Imprégnez-la par capillarité en trempant une des extrémités dans une goutte de *solution décolorée de fuchsine R*. Dans le tube, introduisez immédiatement la partie imprégnée. A partir de l'extrémité de celle-ci, il apparaît en 10 s une coloration violette. Cette dernière se distingue nettement de la coloration rouge de la fuchsine qui peut être visible sur une petite zone à l'extrémité supérieure de la partie imprégnée du papier.

CALCIUM

a) A 0,2 mL d'une solution neutre contenant une quantité de la substance à examiner correspondant à 0,2 mg environ de calcium ($Ca^{2+}$) par millilitre ou à 0,2 mL de la solution prescrite, ajoutez 0,5 mL d'une solution de *glyoxalhydroxyanile R* à 2 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*, 0,2 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* et 0,2 mL de *solution de carbonate de sodium R*. Agitez avec 1 mL à 2 mL de *chloroforme R* et ajoutez 1 mL à 2 mL d'*eau R*. La couche chloroformique est colorée en rouge.

b) Dissolvez 20 mg environ de la substance à examiner ou la quantité prescrite dans 5 mL d'*acide acétique R*. Ajoutez 0,5 mL de *solution de ferrocyanure de potassium R*. La solution demeure limpide. Ajoutez 50 mg environ de *chlorure d'ammonium R*. Il se forme un précipité cristallin blanc.

CARBONATES ET BICARBONATES

Dans un tube à essai, introduisez 0,1 g de la substance à examiner et mettez en suspension dans 2 mL d'*eau R*, ou utilisez 2 mL de la solution prescrite. Ajoutez 3 mL d'*acide acétique dilué R* et fermez immédiatement le tube à l'aide d'un bouchon traversé par un tube en verre coudé 2 fois à angle droit. La solution ou la suspension devient effervescente et dégage un gaz incolore et inodore. Chauffez doucement et recueillez le gaz dans 5 mL de *solution d'hydroxyde de baryum R*. Il se forme un précipité blanc qui se dissout par addition d'*acide chlorhydrique R1* en excès.

CHLORURES

a) Dissolvez une quantité de la substance à examiner correspondant à 2 mg environ de chlorure ($Cl^-$) dans 2 mL d'*eau R*, ou utilisez 2 mL de la solution prescrite. Acidifiez par l'*acide nitrique dilué R*. Ajoutez 0,4 mL de *solution de nitrate d'argent R1*. Agitez et laissez reposer. Il se forme un précipité blanc caillebotté. Centrifugez et lavez 3 fois avec 1 mL d'*eau R*. Effectuez cette opération rapidement, à l'abri d'une lumière vive, sans tenir compte du fait que le surnageant ne devient pas parfaitement limpide. Mettez le précipité en suspension dans 2 mL d'*eau R* et ajoutez 1,5 mL d'*ammoniaque R*. Le précipité se dissout facilement à l'exception d'éventuelles particules importantes qui se dissolvent lentement.

b) Dans un tube à essai, introduisez une quantité de la substance à examiner correspondant à 15 mg environ de chlorure ($Cl^-$) ou la quantité prescrite. Ajoutez 0,2 g de *dichromate de potassium R* et 1 mL d'*acide sulfurique R*. Placez sur l'orifice du tube à essai une bande de papier filtre imprégnée de 0,1 mL de *solution de diphénylcarbazide R*. Le papier se colore en rouge-violet. Le papier imprégné ne doit pas entrer en contact avec le dichromate de potassium.

CITRATES

Dissolvez une quantité de la substance à examiner correspondant à 50 mg environ d'acide citrique dans 5 mL d'*eau R*, ou utilisez 5 mL de la solution prescrite. Ajoutez 0,5 mL d'*acide sulfurique R* et 1 mL de *solution de permanganate de potassium R*. Chauffez jusqu'à disparition de la coloration du permanganate. Ajoutez 0,5 mL d'une solution de *nitroprussiate de sodium R* à 100 g/L dans l'*acide sulfurique dilué R* et 4 g d'*acide sulfamique R*. Alcalinisez la solution en ajoutant, goutte à goutte, de l'*ammoniaque concentrée R* jusqu'à dissolution complète de l'acide sulfamique. L'addition d'un excès d'*ammoniaque concentrée R* provoque l'apparition d'une coloration violacée virant au bleu violacé.

ESTERS

A 30 mg environ de la substance à examiner ou à la quantité prescrite, ajoutez 0,5 mL d'une solution de *chlorhydrate d'hydroxylamine R* à 70 g/L dans le *méthanol R* et 0,5 mL d'une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 100 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*. Chauffez à ébullition, refroidissez, acidifiez par l'*acide chlorhydrique dilué R* et ajoutez 0,2 mL de *solution de chlorure ferrique R1* diluée 10 fois. Il se développe une coloration rouge ou rouge bleuâtre.

FER

a) Dissolvez une quantité de la substance à examiner correspondant à 10 mg environ de fer ($Fe^{2+}$) dans 1 mL d'*eau R*, ou utilisez 1 mL de la solution prescrite. Ajoutez 1 mL de *solution de ferricyanure de potassium R*. Il se forme un précipité bleu, qui ne se dissout pas par addition de 5 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*.

b) Dissolvez une quantité de la substance à examiner correspondant à 1 mg environ de fer ($Fe^{3+}$) dans 30 mL d'*eau R*. A 3 mL de cette solution ou à 3 mL de la solution prescrite, ajoutez 1 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et 1 mL de *solution de thiocyanate de potassium R*. Il se développe une coloration rouge. Prélevez 2 fractions de 1 mL. A l'une d'elles, ajoutez 5 mL d'*alcool isoamylique R* ou 5 mL d'*éther R*. Agitez et laissez reposer. La couche organique se colore en rose. A l'autre fraction, ajoutez 2 mL de *solution de chlorure mercurique R*. La coloration rouge disparaît.

c) Dissolvez une quantité de la substance à examiner correspondant au moins à 1 mg de fer ($Fe^{3+}$) dans 1 mL d'*eau R*, ou à 1 mL de la solution prescrite, ajoutez 1 mL de *solution de ferrocyanure de potassium R*. Il se forme un précipité bleu qui ne se dissout pas par addition de 5 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*.

IODURES

a) Dissolvez une quantité de la substance à examiner correspondant à 4 mg environ d'iodure ($I^-$) dans 2 mL d'*eau R*, ou utilisez 2 mL de la solution prescrite. Acidifiez par l'*acide nitrique dilué R* et ajoutez 0,4 mL de *solution de nitrate d'argent R1*. Agitez et laissez reposer. Il se forme un précipité caillebotté jaune pâle. Centrifugez et lavez avec 3 fois 1 mL d'*eau R*. Effectuez cette opération rapidement, à l'abri d'une lumière vive, sans tenir compte du fait que le surnageant ne devient pas parfaitement limpide. Mettez le précipité en suspension dans 2 mL d'*eau R* et ajoutez 1,5 mL d'*ammoniaque R*. Le précipité ne se dissout pas.

b) A 0,2 mL d'une solution de la substance à examiner contenant 5 mg environ d'iodure ($I^-$) par millilitre, ou à 0,2 mL de la solution prescrite, ajoutez 0,5 mL d'*acide sulfurique dilué R*, 0,1 mL de *solution de dichromate de potassium R*, 2 mL d'*eau R* et 2 mL de *chloroforme R*. Agitez pendant quelques secondes et laissez reposer. La couche chloroformique est colorée en violet ou rouge violacé.

LACTATES

Dissolvez une quantité de la substance à examiner correspondant à 5 mg environ d'acide lactique dans 5 mL d'*eau R*. A cette solution, ou à 5 mL de la solution prescrite,

ajoutez 1 mL d'*eau de brome R* et 0,5 mL d'*acide sulfurique dilué R*. Chauffez au bain-marie jusqu'à disparition de la coloration, en agitant de temps en temps à l'aide d'une baguette de verre. Ajoutez 4 g de *sulfate d'ammonium R* et mélangez. Ajoutez, goutte à goutte et sans mélanger, 0,2 mL d'une solution de *nitroprussiate de sodium R* à 100 g/L dans l'*acide sulfurique dilué R*. Toujours sans mélanger, ajoutez 1 mL d'*ammoniaque concentrée R*. Laissez reposer pendant 30 min. Il apparaît un anneau vert foncé à l'interface des 2 liquides.

MAGNÉSIUM

Dissolvez 15 mg environ de la substance à examiner dans 2 mL d'*eau R*, ou utilisez 2 mL de la solution prescrite. Ajoutez 1 mL d'*ammoniaque diluée R1*. Il se forme un précipité blanc qui se dissout par addition de 1 mL de *solution de chlorure d'ammonium R*. Ajoutez 1 mL de *solution de phosphate disodique R*. Il se forme un précipité cristallin blanc.

MERCURE

a) Déposez 0,1 mL d'une solution de la substance à examiner sur une lame de cuivre bien décapée. Il se forme une tache gris foncé qui devient brillante par frottement. Séchez la lame de cuivre, puis chauffez-la dans un tube à essai. La tache disparaît.

b) A la solution prescrite, ajoutez de la *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* jusqu'à réaction fortement alcaline (*2.2.4*). Il se forme un précipité jaune et dense (sels mercuriques).

NITRATES

A un mélange de 0,1 mL de *nitrobenzène R* et de 0,2 mL d'*acide sulfurique R*, ajoutez une quantité de la substance pulvérisée correspondant à 1 mg environ de nitrate ($NO_3^-$) ou la quantité prescrite. Après 5 min de repos, refroidissez dans l'eau glacée, ajoutez lentement et en agitant 5 mL d'*eau R*, puis 5 mL de *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R*. Ajoutez 5 mL d'*acétone R*, agitez et laissez reposer. La couche supérieure est colorée en violet foncé.

PHOSPHATES (ORTHOPHOSPHATES)

a) A 5 mL de la solution prescrite, neutralisée si nécessaire, ajoutez 5 mL de *solution de nitrate d'argent R1*. Il se forme un précipité jaune dont la coloration n'est pas modifiée par ébullition, et qui se dissout par addition d'*ammoniaque R*.

b) Mélangez 1 mL de la solution prescrite avec 2 mL de *réactif molybdovanadique R*. Il se développe une coloration jaune.

PLOMB

a) Dissolvez 0,1 g de la substance à examiner dans 1 mL d'*acide acétique R*, ou utilisez 1 mL de la solution prescrite. Ajoutez 2 mL de *solution de chromate de potassium R*. Il se forme un précipité jaune qui se dissout par addition de 2 mL de *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R*.

b) Dissolvez 50 mg environ de la substance à examiner dans 1 mL d'*acide acétique R*, ou utilisez 1 mL de la solution prescrite. Ajoutez 10 mL d'*eau R* et 0,2 mL de *solution d'iodure de potassium R*. Il se forme un précipité jaune. Chauffez à ébullition pendant 1 min à 2 min. Le précipité se dissout. Laissez refroidir. Le précipité réapparaît sous forme de paillettes brillantes jaunes.

POTASSIUM

a) Dissolvez 0,1 g de la substance à examiner dans 2 mL d'*eau R*, ou utilisez 2 mL de la solution prescrite. Ajoutez 1 mL de *solution de carbonate de sodium R*, puis chauffez. Il ne se forme pas de précipité. Ajoutez à chaud 0,05 mL de *solution de sulfure de sodium R*. Il ne se forme pas de précipité. Refroidissez dans l'eau glacée et ajoutez 2 mL d'une solution d'*acide tartrique R* à 150 g/L. Laissez reposer. Il se forme un précipité cristallin blanc.

b) Dissolvez 40 mg environ de la substance à examiner dans 1 mL d'*eau R*, ou utilisez 1 mL de la solution prescrite. Ajoutez 1 mL d'*acide acétique dilué R* et 1 mL de solution extemporanée de *cobaltinitrite de sodium R* à 100 g/L. Il se forme immédiatement un précipité jaune ou jaune orange.

SALICYLATES

a) A 1 mL de la solution prescrite, ajoutez 0,5 mL de *solution de chlorure ferrique R1*. Il se développe une coloration violette qui persiste après addition de 0,1 mL d'*acide acétique R*.

b) Dissolvez 0,5 g de la substance à examiner dans 10 mL d'*eau R*, ou utilisez 10 mL de la solution prescrite. Ajoutez 0,5 mL d'*acide chlorhydrique R*. Cristallisé dans l'*eau R* chaude, puis desséché sous vide, le précipité obtenu présente un point de fusion (*2.2.14*) de 156 °C à 161 °C.

SILICATES

Dans un creuset de plomb ou de platine, mélangez à l'aide d'un fil de cuivre la quantité prescrite de la substance à examiner avec 10 mg environ de *fluorure de sodium R* et quelques gouttes d'*acide sulfurique R* pour former un empois fluide. Fermez le creuset avec une lame mince en matière plastique transparente dont la face inférieure retient une gouttelette d'*eau R* et chauffez légèrement. Il se forme rapidement un anneau blanc autour de la gouttelette d'eau.

SODIUM

a) Dissolvez 0,1 g de la substance à examiner dans 2 mL d'*eau R*, ou utilisez 2 mL de la solution prescrite. Ajoutez 2 mL d'une solution de *carbonate de potassium R* à 150 g/L et chauffez à ébullition. Il ne se forme aucun précipité. Ajoutez 4 mL de *solution de pyroantimoniate de potassium R* et chauffez à ébullition. Laissez refroidir dans l'eau glacée et frottez si nécessaire la paroi du tube avec une baguette de verre. Il se forme un précipité blanc et dense.

b) Dissolvez une quantité de la substance à examiner correspondant à 2 mg environ de sodium ($Na^+$) dans 0,5 mL d'*eau R*, ou utilisez 0,5 mL de la solution prescrite. Ajoutez 1,5 mL de *réactif méthoxyphénylacétique R* et refroidissez dans l'eau glacée pendant 30 min. Il se forme un volumineux précipité cristallin blanc. Maintenez dans l'eau à 20 °C pendant 5 min en agitant. Le précipité ne disparaît pas. Ajoutez 1 mL d'*ammoniaque diluée R1*. Le précipité se dissout entièrement. Ajoutez 1 mL de *solution de carbonate d'ammonium R*. Il ne se forme pas de précipité.

SULFATES

a) Dissolvez 45 mg environ de la substance à examiner dans 5 mL d'*eau R* ou utilisez 5 mL de la solution prescrite. Ajoutez 1 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et 1 mL de *solution de chlorure de baryum R1*. Il se forme un précipité blanc.

b) A la suspension finale obtenue dans la réaction (a), ajoutez 0,1 mL d'*iode 0,05 M*. La suspension reste jaune (distinction des sulfites et dithionites). Ajoutez, goutte à goutte, de la *solution de chlorure stanneux R*. La coloration de la suspension disparaît (distinction des iodates). Chauffez à ébullition. Il ne se forme aucun précipité coloré (distinction des séléniates et des tungstates).

TARTRATES

a) Dissolvez 15 mg environ de la substance à examiner dans 5 mL d'*eau R,* ou utilisez 5 mL de la solution prescrite. Ajoutez 0,05 mL d'une solution de *sulfate ferreux R* à 10 g/L et 0,05 mL de *solution diluée de peroxyde d'hydrogène R*. Il apparaît une coloration jaune fugace. Dès la disparition de celle-ci, ajoutez, goutte à goutte, de la *solution diluée d'hydroxyde de sodium R*. Il se développe une coloration violette ou pourpre.

b) A 0,1 mL d'une solution contenant une quantité de la substance à examiner correspondant à 15 mg environ d'acide tartrique par millilitre ou à 0,1 mL de la solution prescrite, ajoutez 0,1 mL d'une solution de *bromure de potassium R* à 100 g/L, 0,1 mL d'une solution de *résorcinol R* à 20 g/L et 3 mL d'*acide sulfurique R*. Chauffez au bain-marie pendant 5 min à 10 min. Il se développe une coloration bleu foncé. Laissez refroidir et versez la solution dans l'*eau R*. La coloration vire au rouge.

XANTHINES

A quelques milligrammes de la substance à examiner ou à la quantité prescrite, ajoutez 0,1 mL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R* et 0,3 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*. Evaporez au bain-marie à siccité jusqu'à obtention d'un résidu rouge jaunâtre. Ajoutez 0,1 mL d'*ammoniaque diluée R2* ; le résidu se colore en rouge-violet.

ZINC

Dissolvez 0,1 g de la substance à examiner dans 5 mL d'*eau R,* ou utilisez 5 mL de la solution prescrite. Ajoutez 0,2 mL de *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R*. Il se forme un précipité blanc qui se dissout par addition de 2 mL de *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R*. Ajoutez 10 mL de *solution de chlorure d'ammonium R*. La solution reste limpide. Ajoutez 0,1 mL de *solution de sulfure de sodium R* ; il se forme un précipité floconneux blanc.

**01/2008:20302**
**corrigé 6.6**

## 2.3.2. IDENTIFICATION DES HUILES GRASSES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

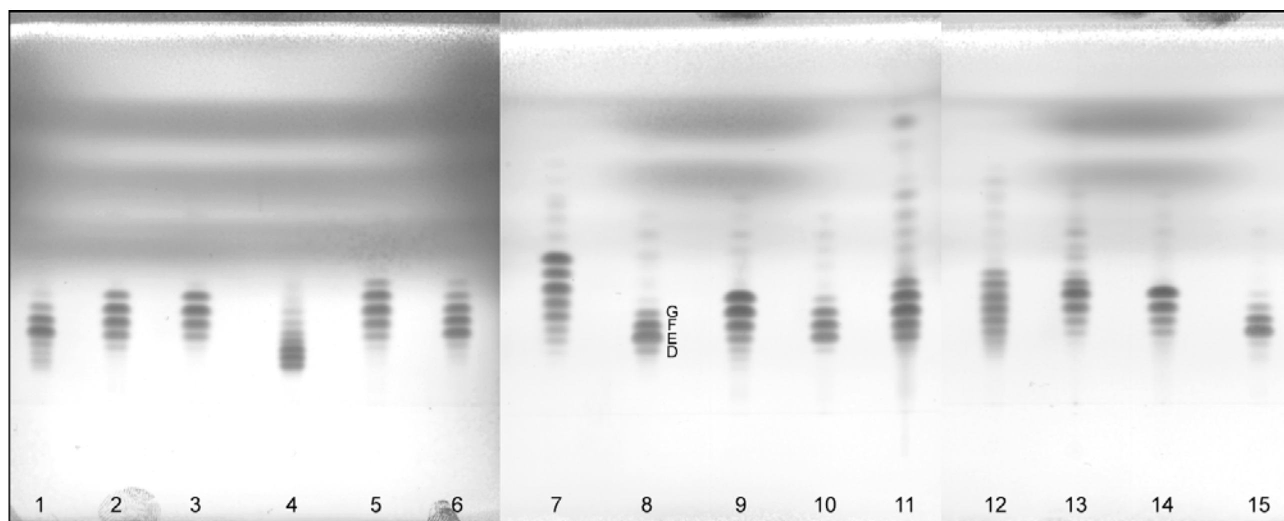
Opérez par chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) en utilisant une plaque recouverte d'un gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie haute performance approprié.

*Solution à examiner*. Sauf indication contraire, dissolvez environ 20 mg (1 goutte) d'huile grasse dans 3 mL de *chlorure de méthylène R*.

*Solution témoin*. Dissolvez environ 20 mg (1 goutte) d'*huile de maïs R* dans 3 mL de *chlorure de méthylène R*.

Déposez séparément sur la plaque 1 µL de chaque solution. Développez 2 fois sur un parcours de 0,5 cm avec de l'*éther R*. Développez ensuite 2 fois sur un parcours de 8 cm avec un mélange de 20 volumes de *chlorure de méthylène R*, de 40 volumes d'*acide acétique glacial R* et de 50 volumes d'*acétone R*. Laissez sécher la plaque à l'air. Pulvérisez une solution d'*acide phosphomolybdique R* à 100 g/L dans de l'*éthanol à 96 pour cent R*. Chauffez la plaque à 120 °C pendant environ 3 min. Examinez à la lumière du jour.

Le chromatogramme présente des taches comparables à celles reproduites dans la figure 2.3.2.-1.




1. huile d'arachide
2. huile de sésame
3. huile de maïs
4. huile de colza
5. huile de soja
6. huile de colza (exempte d'acide érucique)
7. huile de lin
8. huile d'olive
9. huile de tournesol
10. huile d'amande
11. huile de germes de blé
12. huile de bourrache
13. huile d'onagre
14. huile de carthame (type I)
15. huile de carthame (type II)

Figure 2.3.2.-1. – *Chromatogrammes pour l'identification des huiles grasses*

**01/2008:20303**

## 2.3.3. IDENTIFICATION DES PHÉNOTHIAZINES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Opérez par chromatographie sur couche mince (*2.2.27*). Imprégnez une plaque recouverte d'une couche de *kieselguhr G R* en la plaçant dans une cuve à chromatographie contenant la quantité nécessaire d'un mélange constitué par une solution de *phénoxyéthanol R* à 10 pour cent *V/V* et de *macrogol 300 R* à 50 g/L dans l'*acétone R* pour que la plaque plonge de 5 mm environ dans le liquide. Lorsque la ligne du front du mélange d'imprégnation a parcouru une distance de 17 cm au moins au-dessus du bord inférieur de la plaque, retirez celle-ci et employez-la immédiatement pour la chromatographie.

Effectuez le développement dans la même direction.

*Solution à examiner*. Dissolvez 20 mg de la substance à examiner dans du *chloroforme R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 20 mg de la substance chimique de référence (SCR) correspondante dans du *chloroforme R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

Déposez séparément sur la plaque 2 µL de chaque solution. Développez à l'obscurité sur un parcours de 15 cm, avec un mélange de 50 mL d'*éther de pétrole R* et de 1 mL de *diéthylamine R* saturé de *phénoxyéthanol R* (ajoutez 3 mL à 4 mL environ de *phénoxyéthanol R* au mélange précité jusqu'à obtention d'un trouble persistant même après agitation ; décantez et utilisez le surnageant même s'il est trouble). Exposez la plaque à la lumière ultraviolette à 365 nm et observez après quelques minutes. La tache du chromatogramme obtenu avec la substance à examiner est semblable quant à sa position, sa fluorescence et ses dimensions, à la tache du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Pulvérisez une solution d'*acide sulfurique R* à 10 pour cent *V/V* dans l'*alcool R*. La coloration de la tache du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable à celle de la tache du chromatogramme obtenu avec la solution témoin et présente la même stabilité pendant 20 min au moins.

**01/2008:20304**

## 2.3.4. ODEUR

Sur un verre de montre de 6 cm à 8 cm de diamètre, étalez en couche mince 0,5 g à 2,0 g de la substance à examiner. Après 15 min, cherchez à en définir l'odeur ou à vous assurer de l'absence d'odeur.

# 2.4. ESSAIS LIMITES DES IMPURETÉS

# 2.4. ESSAIS LIMITES DES IMPURETÉS

**01/2008:20401**

## 2.4.1. AMMONIUM

*Sauf indication contraire, utilisez le procédé A.*

PROCÉDÉ A

Dans un tube à essai, dissolvez la quantité de substance prescrite dans 14 mL d'*eau R*, alcalinisez si nécessaire avec la *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* et complétez à 15 mL avec de l'*eau R*. Ajoutez 0,3 mL de *solution alcaline de tétraiodomercurate de potassium R*. Préparez le témoin en ajoutant à 10 mL de *solution à 1 ppm d'ammonium ($NH_4$) R*, 5 mL d'*eau R* et 0,3 mL de *solution alcaline de tétraiodomercurate de potassium R*. Bouchez les tubes à essai.

Après 5 min, la coloration jaune éventuelle de la solution à examiner n'est pas plus intense que celle du témoin.

PROCÉDÉ B

Dans un flacon poudrier de 25 mL muni d'une capsule placez la quantité de substance prescrite finement pulvérisée et dissolvez ou mettez en suspension dans 1 mL d'*eau R*. Ajoutez 0,30 g d'*oxyde de magnésium lourd R*. Placez un *papier manganèse-argent R* de 5 mm × 5 mm humecté de quelques gouttes d'*eau R* sous la capsule en polyéthylène et obturez immédiatement. Agitez circulairement en évitant les projections de liquide. Chauffez à 40 °C pendant 30 min. Le papier manganèse-argent n'est pas plus fortement coloré en gris que le papier manganèse-argent placé au-dessus d'un témoin préparé simultanément et dans les mêmes conditions avec la *solution à 1 ppm d'ammonium ($NH_4$) R* prescrite, de 1 mL d'*eau R* et 0,30 g d'*oxyde de magnésium lourd R*.

**01/2008:20402**

## 2.4.2. ARSENIC

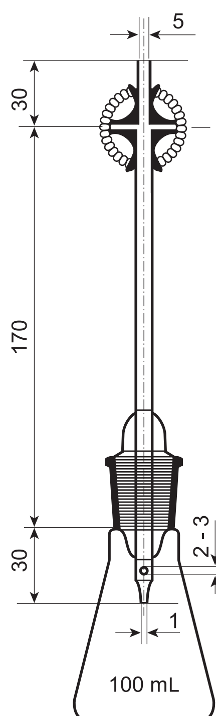



Figure 2.4.2.-1. - *Appareil pour l'essai limite A de l'arsenic*
*Dimensions en millimètres*

PROCÉDÉ A

L'appareil (figure 2.4.2.-1) est constitué par une fiole conique de 100 mL fermée par un bouchon rodé muni d'un tube de verre de 200 mm environ de longueur et de 5 mm de diamètre intérieur. La partie inférieure de ce tube est effilée jusqu'à ce que le diamètre intérieur soit de 1,0 mm ; 15 mm au-dessus de son extrémité, le tube comporte un orifice latéral de 2 mm à 3 mm de diamètre. Lorsque le tube est mis en place dans le bouchon, l'orifice latéral se trouve à 3 mm au moins au-dessous de la surface inférieure du bouchon. A la partie supérieure du tube, l'épaisseur du verre soigneusement rodée délimite une surface parfaitement plane perpendiculaire à l'axe du tube. Un autre tube de même diamètre intérieur et de 30 mm de longueur est préparé dans les mêmes conditions. Les parties planes rodées sont appliquées l'une contre l'autre et maintenues avec deux ressorts. Le tube inférieur est garni d'une couche non tassée de *coton à l'acétate de plomb R* pesant de 50 mg à 60 mg, ou d'un petit tampon de coton et d'un morceau de *papier à l'acétate de plomb R* de 50 mg à 60 mg. Entre les 2 parties rodées planes des tubes, placez un disque ou un carré de *papier au bromure mercurique R*, de surface suffisante pour couvrir l'orifice du tube (15 mm × 15 mm).

Dans la fiole conique, dissolvez la prise d'essai de la substance à examiner dans 25 mL d'*eau R*, ou dans le cas d'une solution, complétez le volume prescrit à 25 mL avec de l'*eau R*. Ajoutez 15 mL d'*acide chlorhydrique R*, 0,1 mL de *solution de chlorure stanneux R*, 5 mL de *solution d'iodure de potassium R* et attendez 15 min. Introduisez 5 g de *zinc activé R*. Assemblez aussitôt les 2 parties de l'appareil et plongez la fiole dans un bain d'eau à une température permettant un dégagement régulier du gaz. Préparez le témoin dans les mêmes conditions en utilisant 1 mL de *solution à 1 ppm d'arsenic (As) R* additionné de 24 mL d'*eau R*.

Après 2 h au moins, la tache éventuelle obtenue sur le disque de l'essai, n'est pas plus foncée que celle obtenue sur le disque du témoin.

PROCÉDÉ B

Dans un tube à essai contenant 4 mL d'*acide chlorhydrique R* et 5 mg environ d'*iodure de potassium R*, introduisez la quantité prescrite de la substance à examiner. Ajoutez 3 mL de *réactif hypophosphoreux R*. Chauffez le mélange au bain-marie pendant 15 min en agitant de temps en temps. Préparez le témoin dans les mêmes conditions en utilisant 0,5 mL de *solution à 10 ppm d'arsenic (As) R*.

Après chauffage au bain-marie, la coloration éventuelle de la solution à examiner n'est pas plus intense que celle du témoin.

**01/2008:20403**

## 2.4.3. CALCIUM

*Toutes les solutions utilisées dans cet essai doivent être préparées à partir d'eau distillée R.*

A 0,2 mL de *solution alcoolique à 100 ppm de calcium (Ca) R*, ajoutez 1 mL de *solution d'oxalate d'ammonium R*. Après 1 min, ajoutez un mélange de 1 mL d'*acide acétique dilué R* et de 15 mL d'une solution contenant la quantité prescrite de la substance à examiner, puis agitez. Préparez le témoin dans les mêmes conditions en utilisant un mélange de 10 mL de *solution à 10 ppm de calcium (Ca) R* aqueuse, de 1 mL d'*acide acétique dilué R* et de 5 mL d'*eau distillée R*.

Après 15 min, si la solution à examiner présente une opalescence, celle-ci n'est pas plus prononcée que celle du témoin.

01/2008:20404

## 2.4.4. CHLORURES

A 15 mL de la solution prescrite, ajoutez 1 mL d'*acide nitrique dilué R* et versez ce mélange en une seule fois dans un tube à essai contenant 1 mL de *solution de nitrate d'argent R2*. Préparez le témoin dans les mêmes conditions en utilisant un mélange de 10 mL de *solution à 5 ppm de chlorure (Cl) R* et de 5 mL d'*eau R*. Examinez latéralement les tubes à essai sur fond noir.

Après 5 min à l'abri de la lumière, si la solution à examiner présente une opalescence, celle-ci n'est pas plus prononcée que celle du témoin.

01/2008:20405

## 2.4.5. FLUORURES

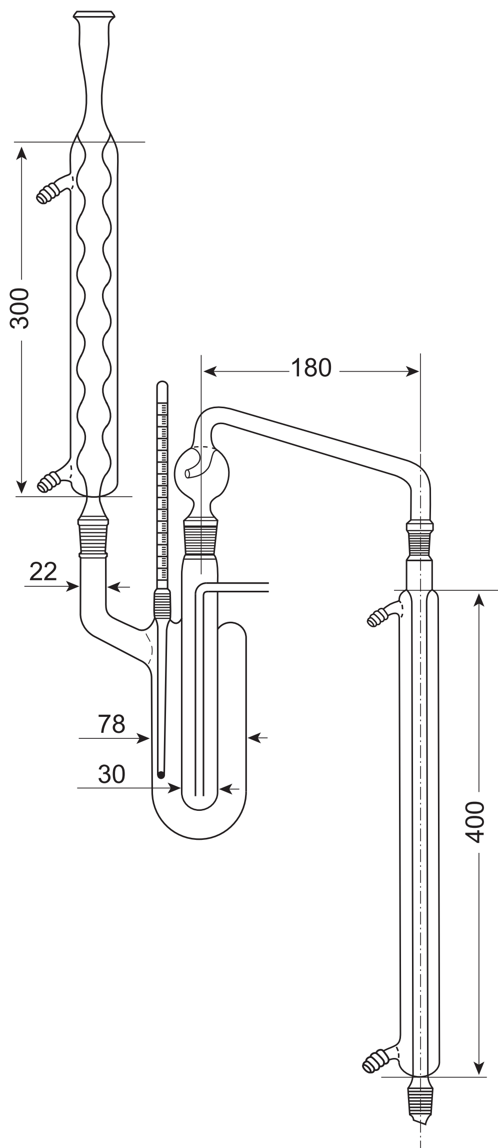



Figure 2.4.5.-1. – *Appareil pour l'essai limite des fluorures*
*Dimensions en millimètres*

Introduisez dans le tube intérieur de l'appareil (figure 2.4.5.-1) la quantité prescrite de la substance à examiner, 0,1 g de *sable R* lavé à l'acide et 20 mL d'un mélange à volumes égaux d'*acide sulfurique R* et d'*eau R*. Chauffez la gaine contenant le *tétrachloréthane R* et maintenez à ébullition (146 °C). Chauffez également le générateur de vapeur d'eau. Distillez et recueillez le distillat dans une fiole jaugée de 100 mL contenant 0,3 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* et 0,1 mL de *solution de phénolphtaléine R*. Pendant toute la durée de la distillation, maintenez un volume constant de 20 mL dans le tube et maintenez également l'alcalinité du distillat par addition d'*hydroxyde de sodium 0,1 M*. Complétez le volume du distillat à 100 mL avec de l'*eau R* (solution à examiner). Préparez le témoin dans les mêmes conditions en remplaçant la substance à examiner par 5 mL de *solution à 10 ppm de fluorure (F) R*. Dans 2 éprouvettes à bouchon rodé, introduisez respectivement 20 mL de la solution à examiner et 20 mL de la solution témoin. Ajoutez dans chaque éprouvette 5 mL de *réactif à l'acide aminométhylalizarinediacétique R*.

Après 20 min, la coloration bleue éventuelle de la solution à examiner (primitivement colorée en rouge) n'est pas plus intense que celle du témoin.

01/2008:20406

## 2.4.6. MAGNÉSIUM

A 10 mL de la solution prescrite, ajoutez 0,1 g de *tétraborate de disodium R* et ajustez le pH de 8,8 à 9,2 si nécessaire avec de l'*acide chlorhydrique dilué R* ou de la *solution diluée d'hydroxyde de sodium R*. Agitez avec 5 mL d'une solution d'*hydroxyquinoléine R* à 1 g/L dans le *chloroforme R*, pendant 1 min. Laissez reposer, séparez et rejetez la phase organique. Répétez cette opération. A la phase aqueuse, ajoutez 0,4 mL de *butylamine R* et 0,1 mL de *triéthanolamine R*. Ajustez le pH de la solution de 10,5 à 11,5 si nécessaire. Ajoutez 4 mL de la solution chloroformique d'hydroxyquinoléine, agitez pendant 1 min, laissez reposer et séparez, puis utilisez la phase inférieure pour la comparaison. Préparez le témoin dans les mêmes conditions en utilisant un mélange de 1 mL de *solution à 10 ppm de magnésium (Mg) R* et de 9 mL d'*eau R*.

La coloration éventuelle de la solution obtenue à partir de la substance à examiner n'est pas plus intense que celle du témoin.

01/2008:20407

## 2.4.7. MAGNÉSIUM ET MÉTAUX ALCALINO-TERREUX

A 200 mL d'*eau R*, ajoutez 0,1 g de *chlorhydrate d'hydroxylamine R*, 10 mL de *solution tampon chlorure d'ammonium pH 10,0 R*, 1 mL de *sulfate de zinc 0,1 M* et 15 mg environ de *mélange composé au mordant noir 11 R*. Chauffez à environ 40 °C, puis titrez à cette température par l'*édétate de sodium 0,01 M* jusqu'à virage du violet au bleu franc. A cette solution, ajoutez la prise d'essai prescrite dissoute dans 100 mL d'*eau R* ou la solution prescrite. Si la coloration vire au violet, titrez par l'*édétate de sodium 0,01 M* jusqu'à retour à la coloration bleue.

Le volume d'*édétate de sodium 0,01 M*, utilisé dans le second titrage, n'excède pas la quantité prescrite.

07/2010:20408

## 2.4.8. MÉTAUX LOURDS

Le *réactif au thioacétamide R* est utilisé dans les méthodes décrites ci-après. Comme alternative, la *solution de sulfure de sodium R1* (0,1 mL) est généralement appropriée. Etant donné que les essais prescrits dans les monographies ont été développés en utilisant le *réactif au thioacétamide R*, il est nécessaire, s'il est remplacé par la *solution de sulfure de sodium R1*, de préparer également pour les méthodes A, B et H une solution de contrôle à partir de la quantité de substance à examiner prescrite pour l'essai, additionnée du volume de solution étalon de plomb prescrite pour la préparation de la solution témoin. L'essai n'est valable que si la solution de contrôle donne une coloration au moins aussi intense que la solution témoin.

PROCÉDÉ A

*Solution à examiner*. 12 mL de la solution aqueuse prescrite de la substance à examiner.

*Solution témoin*. Mélange de 10 mL de *solution à 1 ppm de plomb (Pb) R* ou de *solution à 2 ppm de plomb (Pb) R*, comme prescrit, et de 2 mL de la solution aqueuse prescrite de la substance à examiner.

*Solution à blanc*. Mélange de 10 mL d'*eau R* et de 2 mL de la solution aqueuse prescrite de la substance à examiner.

A chaque solution, ajoutez 2 mL de *solution tampon pH 3,5 R*. Mélangez. Ajoutez à 1,2 mL de *réactif au thioacétamide R* puis mélangez immédiatement. Examinez les solutions après 2 min.

*Conformité du système* : comparée à la solution à blanc, la solution témoin présente une légère coloration brune.

*Résultat* : la coloration brune éventuelle de la solution à examiner n'est pas plus intense que celle de la solution témoin.

Si le résultat de l'essai est difficile à évaluer, filtrez les solutions sur une membrane filtrante appropriée (diamètre nominal des pores 0,45 µm). Effectuez la filtration lentement et régulièrement par pression modérée et constante sur le piston. Comparez les taches obtenues sur les filtres avec les différentes solutions.

PROCÉDÉ B

*Solution à examiner*. 12 mL de la solution prescrite de la substance à examiner, préparée en utilisant un solvant organique contenant un pourcentage minimal d'eau (par exemple, dioxane à 15 pour cent d'eau ou acétone à 15 pour cent d'eau).

*Solution témoin*. Mélange de 10 mL de solution à 1 ppm ou 2 ppm de plomb (Pb), comme prescrit, et de 2 mL de la solution prescrite de la substance à examiner dans un solvant organique. Préparez la solution à 1 ppm ou 2 ppm de plomb (Pb) par dilution de la *solution à 100 ppm de plomb (Pb) R* à l'aide du solvant utilisé pour la substance à examiner.

*Solution à blanc*. Mélange de 10 mL du solvant utilisé pour la substance à examiner et de 2 mL de la solution prescrite de la substance à examiner dans un solvant organique.

A chaque solution, ajoutez 2 mL de *solution tampon pH 3,5 R*. Mélangez. Ajoutez à 1,2 mL de *réactif au thioacétamide R* puis mélangez immédiatement. Examinez les solutions après 2 min.

*Conformité du système* : comparée à la solution à blanc, la solution témoin présente une légère coloration brune.

*Résultat* : la coloration brune éventuelle de la solution à examiner n'est pas plus intense que celle de la solution témoin.

Si le résultat de l'essai est difficile à évaluer, filtrez les solutions sur une membrane filtrante appropriée (diamètre nominal des pores 0,45 µm). Effectuez la filtration lentement et régulièrement par pression modérée et constante sur le piston. Comparez les taches obtenues sur les filtres avec les différentes solutions.

PROCÉDÉ C

*Solution à examiner*. Dans un creuset de silice, introduisez la prise d'essai prescrite (au maximum 2 g de substance à examiner) et 4 mL de solution de *sulfate de magnésium R* à 250 g/L dans l'*acide sulfurique dilué R*. Mélangez à l'aide d'une fine baguette de verre. Chauffez avec précaution. Si le mélange est liquide, évaporez doucement au bain-marie jusqu'à obtention d'un résidu sec. Chauffez ensuite progressivement jusqu'à carbonisation, puis obtention de cendres pratiquement blanches ou au plus grisâtres, la température ne dépassant pas 800 °C. Laissez refroidir. Humectez le résidu avec quelques gouttes d'*acide sulfurique dilué R*. Evaporez et calcinez de nouveau, puis laissez refroidir. La durée totale de la calcination ne doit pas dépasser 2 h. Reprenez le résidu à 2 reprises par 5 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*. Ajoutez 0,1 mL de *solution de phénolphtaléine R*, puis de l'*ammoniaque concentrée R* jusqu'à coloration rose. Refroidissez, ajoutez de l'*acide acétique glacial R* jusqu'à décoloration, puis 0,5 mL en excès. Si nécessaire, filtrez et lavez le filtre. Complétez à 20 mL avec de l'*eau R*.

*Solution témoin*. Procédez comme décrit pour la solution à examiner, en utilisant le volume prescrit de *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R* au lieu de la substance à examiner. Prélevez 10 mL des 20 mL obtenus et ajoutez 2 mL de solution à examiner.

*Solution de contrôle*. Procédez comme décrit pour la solution à examiner, en ajoutant à la substance à examiner le volume de *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R* prescrit pour la solution témoin. Prélevez 10 mL des 20 mL obtenus et ajoutez 2 mL de solution à examiner.

*Solution à blanc*. Mélange de 10 mL d'*eau R* et de 2 mL de solution à examiner.

A 12 mL de chaque solution, ajoutez 2 mL de *solution tampon pH 3,5 R*. Mélangez. Ajoutez à 1,2 mL de *réactif au thioacétamide R* puis mélangez immédiatement. Examinez les solutions après 2 min.

*Conformité du système* :

– comparée à la solution à blanc, la solution témoin présente une légère coloration brune,
– la coloration de la solution de contrôle est au moins aussi intense que celle de la solution témoin.

*Résultat* : la coloration brune éventuelle de la solution à examiner n'est pas plus intense que celle de la solution témoin.

Si le résultat de l'essai est difficile à évaluer, filtrez les solutions sur une membrane filtrante appropriée (diamètre nominal des pores 0,45 µm). Effectuez la filtration lentement et régulièrement par pression modérée et constante sur le piston. Comparez les taches obtenues sur les filtres avec les différentes solutions.

PROCÉDÉ D

*Solution à examiner*. Dans un creuset de silice, introduisez la prise d'essai prescrite de substance à examiner et mélangez-la uniformément à 0,5 g d'*oxyde de magnésium R1*. Calcinez au rouge sombre jusqu'à obtention d'une masse blanche ou blanc-gris homogène. Si, après 30 min de calcination, le mélange reste coloré, laissez refroidir, mélangez à l'aide d'une fine baguette de verre et calcinez à nouveau. Recommencez éventuellement l'opération. Chauffez à 800 °C pendant environ 1 h. Reprenez le résidu à 2 reprises avec 5 mL d'un mélange à volumes égaux d'*acide chlorhydrique R1* et d'*eau R*. Ajoutez 0,1 mL de *solution de phénolphtaléine R*, puis de l'*ammoniaque concentrée R* jusqu'à coloration rose. Refroidissez, ajoutez de l'*acide acétique glacial R* jusqu'à décoloration, puis ajoutez 0,5 mL en excès. Si nécessaire, filtrez et lavez le filtre. Complétez à 20 mL avec de l'*eau R*.

*Solution témoin*. Procédez comme décrit pour la solution à examiner, en utilisant le volume prescrit de *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R* au lieu de la substance à examiner et en desséchant à l'étuve à 100-105 °C. Prélevez 10 mL des 20 mL obtenus et ajoutez 2 mL de solution à examiner.

*Solution de contrôle*. Procédez comme décrit pour la solution à examiner, en ajoutant à la substance à examiner le volume de *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R* prescrit pour la solution témoin et en desséchant à l'étuve à 100-105 °C. Prélevez 10 mL des 20 mL obtenus et ajoutez 2 mL de solution à examiner.

*Solution à blanc*. Mélange de 10 mL d'*eau R* et de 2 mL de solution à examiner.

A 12 mL de chaque solution, ajoutez 2 mL de *solution tampon pH 3,5 R*. Mélangez. Ajoutez à 1,2 mL de *réactif au thioacétamide R* puis mélangez immédiatement. Examinez les solutions après 2 min.

*Conformité du système* :

– comparée à la solution à blanc, la solution témoin présente une légère coloration brune,
– la coloration de la solution de contrôle est au moins aussi intense que celle de la solution témoin.

*Résultat* : la coloration brune éventuelle de la solution à examiner n'est pas plus intense que celle de la solution témoin.

Si le résultat de l'essai est difficile à évaluer, filtrez les solutions sur une membrane filtrante appropriée (diamètre nominal des pores 0,45 µm). Effectuez la filtration lentement et régulièrement par pression modérée et constante sur le piston. Comparez les taches obtenues sur les filtres avec les différentes solutions.

PROCÉDÉ E

*Solution à examiner.* Dissolvez la quantité prescrite de substance à examiner dans 30 mL ou dans le volume prescrit d'*eau R*.

*Solution témoin.* Sauf indication contraire, utilisez le volume prescrit de *solution à 1 ppm de plomb (Pb) R* et complétez au même volume que la solution à examiner.

Préparez l'appareillage de filtration en adaptant l'embout d'une seringue de 50 mL, privée de son piston, à un support contenant, sur la plaque, une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 3 µm) et au-dessus un préfiltre (figure 2.4.8.-1).

Versez la solution à examiner dans le corps de la seringue, adaptez le piston, puis exercez une pression régulière sur celui-ci jusqu'à filtration complète. Ouvrez le support et enlevez le préfiltre ; vérifiez que la membrane filtrante est demeurée exempte d'impuretés, sinon remplacez-la et recommencez l'opération dans les mêmes conditions.

Au préfiltrat ou au volume prescrit du préfiltrat, ajoutez 2 mL de *solution tampon pH 3,5 R*. Mélangez. Ajoutez à 1,2 mL de *réactif au thioacétamide R* puis mélangez immédiatement. Laissez reposer pendant 10 min, filtrez comme précédemment mais en inversant l'ordre des filtres, le liquide traversant d'abord la membrane filtrante avant le préfiltre (figure 2.4.8.-1). Cette filtration doit être effectuée lentement et régulièrement par pression modérée et constante sur le piston de la seringue. Après filtration complète, ouvrez le support, prélevez la membrane filtrante et séchez-la sur papier filtre.

En parallèle, traitez la solution témoin de la même manière que la solution à examiner.

*Résultat* : la coloration de la tache obtenue avec la solution à examiner n'est pas plus intense que celle de la tache obtenue avec la solution témoin.

PROCÉDÉ F

*Solution à examiner.* Déposez la quantité ou le volume prescrit de substance à examiner dans un matras à minéralisation de 100 mL, propre et sec (un ballon de 300 mL peut être utilisé si la quantité de mousse formée est trop importante). Fixez le ballon à un angle de 45°. Si la substance à examiner est un solide, ajoutez un volume suffisant d'un mélange de 8 mL d'*acide sulfurique R* et de 10 mL d'*acide nitrique R* pour humecter complètement la substance. Si la substance à examiner est un liquide, ajoutez quelques millilitres d'un mélange de 8 mL d'*acide sulfurique R* et 10 mL d'*acide nitrique R*. Chauffez doucement jusqu'au début de la réaction. Laissez la réaction se calmer, puis ajoutez les doses supplémentaires du même mélange d'acides, en chauffant après chaque ajout, jusqu'à ce que le volume total ajouté soit égal à 18 mL. Augmentez la température et portez doucement à ébullition jusqu'à ce que la solution devienne plus sombre. Refroidissez, ajoutez 2 mL d'*acide nitrique R* et chauffez à nouveau jusqu'à l'assombrissement de la solution. Continuez l'opération de chauffage suivie d'un ajout d'*acide nitrique R* jusqu'à ce que la solution ne s'assombrisse plus, puis chauffez fortement jusqu'à obtenir un dégagement de fumées blanches et denses. Refroidissez, ajoutez avec précaution 5 mL d'*eau R*, puis portez doucement à ébullition jusqu'à obtention de fumées blanches et denses. Poursuivez le chauffage pour réduire la solution à 2-3 mL. Refroidissez, ajoutez avec précaution 5 mL d'*eau R* et examinez la coloration de la solution. Si la solution est jaune, ajoutez avec précaution 1 mL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R*, puis évaporez à nouveau jusqu'à obtenir un dégagement de fumées blanches et denses, et réduisez le volume de la solution à 2-3 mL. Si la solution est toujours jaune, renouvelez l'ajout de 5 mL d'*eau R* et de 1 mL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R* jusqu'à ce que la solution devienne incolore. Refroidissez, diluez avec précaution avec de l'*eau R* et transférez la solution dans un tube de 50 mL pour essai colorimétrique comparatif, en rinçant de façon à obtenir un volume total qui ne dépasse pas 25 mL. Ajustez la solution à pH 3,0-4,0 avec de l'*ammoniaque concentrée R1* (il est possible d'utiliser de l'*ammoniaque diluée R1* lorsque l'intervalle spécifié se rapproche), en utilisant comme indicateur externe un papier indicateur à faible intervalle, puis complétez à 40 mL avec de l'*eau R* et mélangez. Ajoutez 2 mL de *solution tampon pH 3,5 R*.

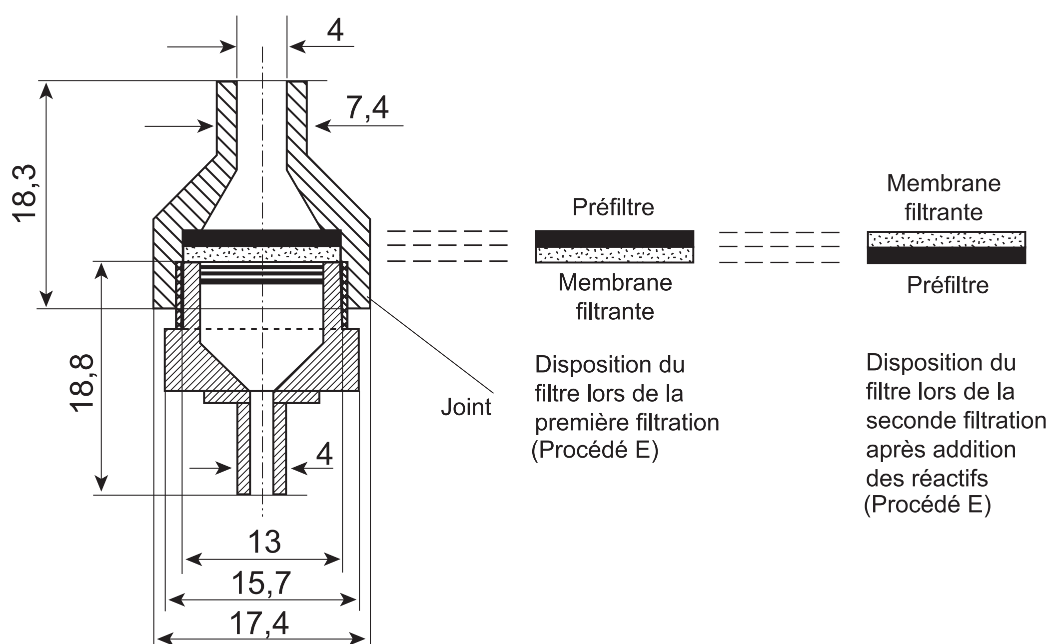



Figure 2.4.8.-1. – *Appareil pour l'essai des métaux lourds*

*Dimensions en millimètres*

Mélangez et ajoutez à 1,2 mL de *réactif au thioacétamide R*. Mélangez immédiatement. Complétez à 50 mL avec de l'*eau R* et mélangez.

*Solution témoin.* Préparez la solution témoin simultanément et dans les mêmes conditions que la solution à examiner, en utilisant le volume prescrit de *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R*.

*Solution de contrôle.* Procédez comme décrit pour la solution à examiner, mais en ajoutant à la quantité prescrite de substance à examiner le volume de *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R* prescrit pour la solution témoin.

*Solution à blanc.* Procédez comme décrit pour la solution à examiner, mais en omettant la substance à examiner.

Examinez les solutions verticalement sur fond blanc après 2 min.

*Conformité du système* :

– comparée à la solution à blanc, la solution témoin présente une coloration brune,
– la coloration de la solution de contrôle est au moins aussi intense que celle de la solution témoin.

*Résultat* : la coloration brune éventuelle de la solution à examiner n'est pas plus intense que celle de la solution témoin.

Si le résultat de l'essai est difficile à évaluer, filtrez les solutions sur une membrane filtrante appropriée (diamètre nominal des pores 0,45 µm). Effectuez la filtration lentement et régulièrement par pression modérée et constante sur le piston. Comparez les taches obtenues sur les filtres avec les différentes solutions.

PROCÉDÉ G

*AVERTISSEMENT : lors de l'utilisation de récipients pour minéralisation sous haute pression, il est impératif de se conformer aux consignes de sécurité et aux instructions d'emploi du fabricant. Les cycles de minéralisation doivent être élaborés en fonction du type de four à micro-ondes utilisé (par exemple, fours à micro-ondes à énergie contrôlée, fours à micro-ondes à température contrôlée, fours haute pression). Le cycle doit être conforme aux instructions du fabricant. Le cycle de minéralisation est approprié si une solution limpide est obtenue.*

*Solution à examiner.* Placez la quantité prescrite de substance à examiner (au maximum 0,5 g) dans un vase à précipiter approprié et propre. Ajoutez successivement 2,7 mL d'*acide sulfurique R*, 3,3 mL d'*acide nitrique R* et 2,0 mL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R* en utilisant un agitateur magnétique. Après chaque ajout de réactif, laissez réagir la substance avant d'ajouter le réactif suivant. Introduisez le mélange dans un récipient pour minéralisation sous haute pression (fluoropolymère ou verre quartz).

*Solution témoin.* Procédez comme décrit pour la solution à examiner, mais en remplaçant la substance à examiner par le volume prescrit de *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R*.

*Solution de contrôle.* Procédez comme décrit pour la solution à examiner, mais en ajoutant à la quantité prescrite de substance à examiner le volume de *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R* prescrit pour la solution témoin.

*Solution à blanc.* Procédez comme décrit pour la solution à examiner mais en omettant la substance à examiner.

Fermez les récipients et placez-les dans un four à micro-ondes de laboratoire. Procédez à la minéralisation selon une séquence de 2 programmes séparés appropriés. Elaborez les programmes en plusieurs étapes afin de contrôler la réaction, la pression de contrôle, la température ou l'énergie selon le type de four à micro-ondes disponible. Après le premier programme, laissez refroidir les récipients avant de les ouvrir. Ajoutez dans chacun d'eux 2,0 mL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R* et procédez à la minéralisation selon le deuxième programme. A l'issue du deuxième programme, laissez refroidir les récipients avant de les ouvrir. Si nécessaire, pour obtenir une solution limpide, répétez l'addition de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R* et le deuxième programme de minéralisation.

Refroidissez, diluez avec précaution avec de l'*eau R* et transférez dans une fiole, en rinçant de façon à obtenir un volume total qui ne dépasse pas 25 mL.

En utilisant comme indicateur externe du papier indicateur à gamme de pH étroite, ajustez les solutions à pH 3,0-4,0 avec de l'*ammoniaque concentrée R1* (il est possible d'utiliser de l'*ammoniaque diluée R1* à l'approche de l'intervalle de pH spécifié). Pour éviter le réchauffement des solutions, utilisez un bain d'eau glacée et un agitateur magnétique. Complétez à 40 mL avec de l'*eau R* et mélangez. Ajoutez 2 mL de *solution tampon pH 3,5 R*. Mélangez. Ajoutez à 1,2 mL de *réactif au thioacétamide R* puis mélangez immédiatement. Complétez à 50 mL avec de l'*eau R*, mélangez et laissez reposer pendant 2 min.

Filtrez les solutions sur une membrane filtrante appropriée (diamètre nominal des pores 0,45 µm). Effectuez la filtration lentement et régulièrement par pression modérée et constante sur le piston. Comparez les taches obtenues sur les filtres avec les différentes solutions.

*Conformité du système* :

– comparée à la tache obtenue avec la solution à blanc, la tache obtenue avec la solution témoin présente une coloration brune,
– la tache obtenue avec la solution de contrôle est au moins aussi intense que la tache obtenue avec la solution témoin.

*Résultat* : la coloration brune de la tache obtenue avec la solution à examiner n'est pas plus intense que celle de la tache obtenue avec la solution témoin.

PROCÉDÉ H

*Solution à examiner.* Dissolvez la quantité prescrite de substance à examiner dans 20 mL du solvant ou du mélange de solvants prescrit.

*Solution témoin.* Utilisez le volume prescrit de *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R* et complétez à 20 mL avec le solvant ou le mélange de solvants prescrit.

*Solution à blanc.* 20 mL du solvant ou du mélange de solvants prescrit.

A chaque solution, ajoutez 2 mL de *solution tampon pH 3,5 R*. Mélangez. *(Dans certains cas, il se produit une précipitation. La monographie de la substance considérée spécifie alors une redissolution dans un volume défini d'un solvant donné.)* Ajoutez à 1,2 mL de *réactif au thioacétamide R* puis mélangez immédiatement et laissez reposer pendant 2 min. Filtrez les solutions sur une membrane filtrante appropriée (diamètre nominal des pores 0,45 µm). Comparez les taches obtenues sur les filtres avec les différentes solutions.

*Conformité du système* : comparée à la tache obtenue avec la solution à blanc, la tache obtenue avec la solution témoin présente une coloration noir-brun.

*Résultat* : la coloration noir-brun de la tache obtenue avec la solution à examiner n'est pas plus intense que celle de la tache obtenue avec la solution témoin.

**01/2008:20409**

## 2.4.9. FER

Dissolvez la quantité prescrite de la substance à examiner dans de l'*eau R* et complétez à 10 mL avec le même solvant, ou utilisez 10 mL de la solution prescrite. Ajoutez 2 mL d'une solution d'*acide citrique R* à 200 g/L et 0,1 mL d'*acide thioglycolique R*. Mélangez, alcalinisez avec de l'*ammoniaque R* et complétez à 20 mL avec de l'*eau R*. Préparez le témoin dans les mêmes conditions en utilisant 10 mL de *solution à 1 ppm de fer (Fe) R*.

Après 5 min, la coloration rose éventuelle de la solution à examiner n'est pas plus intense que celle du témoin.

**01/2008:20410**

## 2.4.10. PLOMB DANS LES SUCRES

Déterminez la quantité de plomb par spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé II*).

*Solution à examiner.* Dissolvez 20,0 g de substance à examiner dans un mélange à volumes égaux d'*acide acétique dilué R* et d'*eau R*, puis complétez à 100,0 mL avec le même mélange de solvants. Ajoutez 2,0 mL d'une solution limpide de *pyrrolidinedithiocarbamate d'ammonium R* à 10 g/L et 10,0 mL de *méthylisobutylcétone R*, puis agitez à l'abri d'une lumière vive pendant 30 s. Laissez séparer les 2 phases et utilisez la phase méthylisobutylcétonique.

*Solutions de référence.* Préparez 3 solutions de référence dans les mêmes conditions que la solution à examiner, mais en leur ajoutant respectivement 0,5 mL, 1,0 mL et 1,5 mL de *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R* en plus des 20,0 g de substance à examiner.

Réglez l'appareil au zéro en utilisant la *méthylisobutylcétone R* traitée dans les mêmes conditions que la solution à examiner, mais sans la substance à examiner. Mesurez l'absorbance à 283,3 nm en utilisant une lampe à cathode creuse au plomb comme source de radiation et une flamme air-acétylène.

La substance à examiner ne contient pas plus de 0,5 ppm de plomb, sauf indication contraire dans la monographie.

**01/2008:20411**

## 2.4.11. PHOSPHATES

A 100 mL de la solution préparée et éventuellement neutralisée comme prescrit, ajoutez 4 mL de *réactif sulfomolybdique R3*. Agitez, puis ajoutez 0,1 mL de *solution de chlorure stanneux R1*. Préparez le témoin dans les mêmes conditions en utilisant 2 mL de *solution à 5 ppm de phosphate ($PO_4$) R* et 98 mL d'*eau R*. Après 10 min, comparez les colorations en utilisant 20 mL de chaque solution.

La coloration éventuelle de la solution à examiner n'est pas plus intense que celle du témoin.

**01/2008:20412**

## 2.4.12. POTASSIUM

A 10 mL de la solution prescrite, ajoutez 2 mL d'une solution récemment préparée de *tétraphénylborate de sodium R* à 10 g/L. Préparez le témoin dans les mêmes conditions en utilisant un mélange de 5 mL de *solution à 20 ppm de potassium (K) R* et de 5 mL d'*eau R*.

Après 5 min, si la solution à examiner présente une opalescence, celle-ci n'est pas plus prononcée que celle du témoin.

**01/2008:20413**

## 2.4.13. SULFATES

*Toutes les solutions utilisées dans cet essai doivent être préparées à partir d'eau distillée R.*

A 4,5 mL de *solution à 10 ppm de sulfate ($SO_4$) R1*, ajoutez 3 mL d'une solution de *chlorure de baryum R* à 250 g/L. Agitez et laissez reposer pendant 1 min. A 2,5 mL de cette solution, ajoutez 15 mL de solution à examiner et 0,5 mL d'*acide acétique R*. Préparez le témoin dans les mêmes conditions en utilisant 15 mL de *solution à 10 ppm de sulfate ($SO_4$) R* au lieu de la solution à examiner.

Après 5 min, si la solution à examiner présente une opalescence, celle-ci n'est pas plus prononcée que celle du témoin.

**04/2010:20414**

## 2.4.14. CENDRES SULFURIQUES(1)

Chauffez un creuset approprié (de silice, de platine, de porcelaine ou de quartz, par exemple) à 600 ± 50 °C pendant 30 min. Laissez refroidir dans un dessiccateur sur du gel de silice ou autre desséchant approprié puis pesez. Dans le creuset, introduisez la prise d'essai puis pesez. Humectez la substance à examiner avec un peu d'*acide sulfurique R* (généralement 1 mL) et chauffez doucement, à une température aussi faible que possible, jusqu'à carbonisation complète de l'échantillon. Après refroidissement, humectez le résidu avec un peu d'*acide sulfurique R* (généralement 1 mL). Chauffez doucement jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement de fumées blanches, puis calcinez à 600 ± 50 °C jusqu'à incinération complète du résidu. Veillez à ce qu'il n'y ait aucune émission de flammes lors du procédé. Laissez refroidir le creuset dans un dessiccateur sur du gel de silice ou autre desséchant approprié, puis pesez à nouveau et calculez le pourcentage de résidu.

Si la quantité du résidu ainsi obtenue dépasse la limite indiquée, répétez l'addition d'*acide sulfurique R*, puis la calcination comme précédemment pendant des périodes de 30 min jusqu'à ce que 2 pesées ne diffèrent pas de plus de 0,5 mg ou que le pourcentage de résidu soit conforme à la limite prescrite.

La quantité de substance utilisée pour l'essai (habituellement 1-2 g) est choisie de façon à obtenir, à la limite prescrite, un résidu (habituellement de l'ordre de 1 mg) qui peut être pesé avec une exactitude suffisante.

**01/2008:20415**
**corrigé 7.0**

## 2.4.15. NICKEL DANS LES POLYOLS

Déterminez la quantité de nickel par spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé II*).

*Solution à examiner.* Dissolvez 20,0 g de la substance à examiner dans un mélange à volumes égaux d'*acide acétique dilué R* et d'*eau R*, puis complétez à 100,0 mL avec le même mélange de solvants. Ajoutez 2,0 mL d'une solution saturée de *pyrrolidinedithiocarbamate d'ammonium R* (à 10 g/L environ) et 10,0 mL de *méthylisobutylcétone R*, puis agitez à l'abri d'une lumière vive pendant 30 s. Laissez séparer les 2 couches et utilisez la couche méthylisobutylcétonique.

*Solutions de référence.* Préparez 3 solutions de référence dans les mêmes conditions que la solution à examiner, mais en leur ajoutant respectivement 0,5 mL, 1,0 mL et 1,5 mL de *solution à 10 ppm de nickel (Ni) R* en plus des 20,0 g de la substance à examiner.

Réglez l'appareil au zéro, en utilisant la *méthylisobutylcétone R* traitée comme indiqué dans la préparation de la solution à examiner sans ajouter la substance à examiner. Mesurez l'absorbance à 232,0 nm en utilisant une lampe à cathode creuse au nickel comme source de radiation et une flamme air-acétylène.

La substance à examiner ne contient pas plus de 1 ppm de nickel, sauf indication contraire dans la monographie.

**01/2008:20416**

## 2.4.16. CENDRES TOTALES

Chauffez au rouge un creuset de silice ou de platine pendant 30 min. Laissez refroidir dans un dessiccateur, puis pesez. Sauf indication contraire, introduisez dans le creuset 1,00 g de substance ou de drogue pulvérisée. Distribuez uniformément la prise d'essai à l'intérieur du creuset. Desséchez pendant 1 h à 100-105 °C, puis incinérez dans un four à moufle, à une température de 600 ± 25 °C. L'échantillon ne doit s'enflammer

(1) Ce chapitre a fait l'objet du processus d'harmonisation des pharmacopées. Voir chapitre *5.8. Harmonisation des pharmacopées.*

à aucun moment de l'opération. Continuez l'incinération jusqu'à masse constante. Après chaque incinération, laissez refroidir le creuset au dessiccateur. Si les cendres contiennent encore des particules noires, après une incinération prolongée, reprenez-les à l'eau chaude et filtrez sur un filtre sans cendres. Incinérez à nouveau le résidu avec le filtre. Réunissez le filtrat et les cendres, évaporez prudemment à siccité et incinérez jusqu'à masse constante.

**01/2008:20417**

## 2.4.17. ALUMINIUM

Dans une ampoule à décantation, introduisez la solution prescrite et agitez avec 2 fois 20 mL et 1 fois 10 mL d'une solution d'*hydroxyquinoléine R* à 5 g/L dans le *chloroforme R*. Réunissez les solutions chloroformiques et complétez à 50,0 mL avec du *chloroforme R* (solution à examiner).

Préparez le témoin dans les mêmes conditions en utilisant la solution de référence.

Préparez l'essai à blanc dans les mêmes conditions en utilisant la solution à blanc prescrite.

Mesurez l'intensité de la fluorescence (*2.2.21*) de la solution à examiner ($I_1$) du témoin ($I_2$) et de l'essai à blanc ($I_3$) en utilisant un faisceau de lumière excitatrice à 392 nm et un filtre secondaire dont la bande de transmission est centrée à 518 nm ou un monochromateur réglé à la même longueur d'onde.

La fluorescence ($I_1 - I_3$) de la solution à examiner n'est pas supérieure à celle du témoin ($I_2 - I_3$).

**01/2008:20418**

## 2.4.18. FORMALDÉHYDE LIBRE

Utilisez le procédé A, sauf indication contraire. Le procédé B convient lorsque du métabisulfite de sodium a été ajouté au vaccin afin de neutraliser un excès de formaldéhyde.

PROCÉDÉ A

Dans le cas de vaccins pour usage humain, préparez une dilution au 1/10 du vaccin à examiner. Dans le cas d'anatoxines bactériennes pour usage vétérinaire, préparez une dilution au 1/25 du vaccin à examiner.

A 1 mL de la dilution, ajoutez 4 mL d'*eau R* et 5 mL de *réactif à l'acétylacétone R1*. Maintenez le tube dans un bain-marie à 40 °C pendant 40 min. Examinez les solutions dans l'axe vertical des tubes. La solution à examiner n'est pas plus fortement colorée qu'une solution témoin, préparée simultanément et dans les mêmes conditions, en remplaçant la dilution du vaccin à examiner par 1 mL d'une dilution de *solution de formaldéhyde R* contenant 20 µg de formaldéhyde ($CH_2O$) par millilitre.

PROCÉDÉ B

*Solution à examiner.* Préparez une dilution du vaccin à examiner au 1/200 avec de l'*eau R*. Si le vaccin est présenté sous forme d'émulsion, préparez une dilution équivalente en utilisant la phase aqueuse, préalablement séparée selon un procédé approprié (voir ci-après). Si l'une des méthodes décrites ci-après est utilisée pour séparer la phase aqueuse, utilisez une dilution au 1/20 de cette dernière.

*Solutions de référence.* Préparez des solutions contenant 0,25 g/L, 0,50 g/L, 1,00 g/L et 2,00 g/L de $CH_2O$ en diluant la *solution de formaldéhyde R* avec de l'*eau R*. Préparez une dilution de chaque solution au 1/200 avec de l'*eau R*.

A 0,5 mL de solution à examiner et à 0,5 mL de chacune des solutions de référence, dans des tubes à essai, ajoutez 5,0 mL d'une solution récemment préparée de *chlorhydrate de méthylbenzothiazolone-hydrazone R* à 0,5 g/L. Fermez les tubes, agitez et laissez reposer pendant 60 min. Ajoutez 1 mL de *réactif au chlorure ferrique-acide sulfamique R* et laissez reposer pendant 15 min. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) des solutions à 628 nm. Calculez la teneur en formaldéhyde dans le vaccin à examiner à partir de la courbe d'étalonnage tracée à l'aide des solutions de référence. L'essai n'est pas valable si le coefficient de corrélation (*r*) de la courbe d'étalonnage est inférieur à 0,97.

*Emulsions.* Si le vaccin à examiner est présenté sous forme d'émulsion, séparez la phase aqueuse par un procédé approprié et utilisez-la pour préparer la solution à examiner. Les procédés suivants se sont avérés satisfaisants.

(a) Ajoutez 1,0 mL du vaccin à examiner à 1,0 mL de *myristate d'isopropyle R*, puis mélangez. Ajoutez 1,3 mL d'*acide chlorhydrique 1 M*, 2,0 mL de *chloroforme R* et 2,7 mL d'une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L. Mélangez soigneusement. Centrifugez à 15 000 *g* pendant 60 min. Transférez la phase aqueuse dans une fiole jaugée de 10 mL et complétez au volume avec de l'*eau R*. Si ce procédé ne permet pas de séparer la phase aqueuse, ajoutez 100 g/L de *polysorbate 20 R* à la solution de chlorure de sodium et répétez l'opération en centrifugeant cette fois à 22 500 *g*.

(b) Ajoutez 1,0 mL du vaccin à examiner à 1,0 mL de solution de *chlorure de sodium R* à 100 g/L, puis mélangez. Centrifugez à 1000 *g* pendant 15 min. Transférez la phase aqueuse dans une fiole jaugée de 10 mL et complétez au volume avec de l'*eau R*.

(c) Ajoutez 1,0 mL du vaccin à examiner à 2,0 mL de solution de *chlorure de sodium R* à 100 g/L et 3,0 mL de *chloroforme R*, puis mélangez. Centrifugez à 1000 *g* pendant 5 min. Transférez la phase aqueuse dans une fiole jaugée de 10 mL et complétez au volume avec de l'*eau R*.

**01/2008:20419**

## 2.4.19. IMPURETÉS À RÉACTION ALCALINE DANS LES HUILES GRASSES

Dans un tube à essai, introduisez 10 mL d'*acétone R* récemment distillée, 0,3 mL d'*eau R* et 0,05 mL d'une solution de *bleu de bromophénol R* à 0,4 g/L dans l'*alcool R*. Neutralisez, si nécessaire, avec de l'*acide chlorhydrique 0,01 M* ou de l'*hydroxyde de sodium 0,01 M*. Ajoutez 10 mL de l'huile à examiner, agitez et laissez reposer. Le virage au jaune de la couche supérieure ne nécessite pas plus de 0,1 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M*.

**01/2008:20421**

## 2.4.21. HUILES ÉTRANGÈRES DANS LES HUILES GRASSES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Opérez par chromatographie sur couche mince (*2.2.27*). Imprégnez une plaque recouverte d'une couche de *kieselguhr G R* en la plaçant dans une cuve à chromatographie contenant la quantité nécessaire d'un mélange de 10 volumes de *paraffine liquide R* et de 90 volumes d'*éther de pétrole R*, pour que la plaque plonge de 5 mm environ dans le liquide. Lorsque la ligne du front du mélange d'imprégnation a parcouru une distance de 12 cm au moins au-dessus du bord inférieur de la plaque, retirez celle-ci et laissez évaporer le solvant pendant 5 min. Effectuez le développement dans la même direction que l'imprégnation.

*Préparation du mélange d'acides gras.* Chauffez à reflux pendant 45 min, 2 g d'huile grasse avec 30 mL d'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M*. Ajoutez 50 mL d'*eau R*, laissez refroidir et transvasez dans une ampoule à décantation. Agitez avec 3 fois 50 mL d'*éther R*. Rejetez les solutions éthérées, acidifiez la phase aqueuse à l'*acide chlorhydrique R*, puis agitez avec 3 fois 50 mL d'*éther R*. Réunissez les solutions éthérées et lavez avec 3 fois 10 mL d'*eau R*. Rejetez les eaux de lavage, séchez l'éther sur du *sulfate de sodium anhydre R* et filtrez. Evaporez l'éther au bain-marie. Utilisez le résidu pour préparer

la solution à examiner. Les acides gras peuvent également être obtenus à partir de la solution de savon préparée lors de la détermination de l'insaponifiable.

*Solution à examiner.* Dissolvez dans 4 mL de *chloroforme R*, 40 mg du mélange des acides gras obtenus à partir de l'huile à examiner.

*Solution témoin.* Dissolvez dans 4 mL de *chloroforme R*, 40 mg du mélange des acides gras obtenus à partir d'un mélange de 19 volumes d'*huile de maïs R* et de 1 volume d'*huile de colza R*.

Déposez sur la plaque 3 µL de chaque solution. Développez sur un parcours de 8 cm avec un mélange de 10 volumes d'*eau R* et de 90 volumes d'*acide acétique glacial R*. Desséchez la plaque à 110 °C pendant 10 min. Laissez refroidir et introduisez la plaque, sauf indication contraire, dans une cuve à chromatographie munie d'un couvercle étanche et saturée de vapeurs d'iode ; pour ce faire, placez de l'*iode R* dans un cristallisoir de forme basse au fond de la cuve. Après un certain temps, il apparaît des taches brunes ou jaune-brun. Sortez la plaque et attendez quelques minutes. Lorsque la coloration de fond, brune, de la couche a disparu, pulvérisez la *solution d'amidon R* ; il apparaît alors des taches bleues qui, à sec, peuvent virer au brun et redevenir bleues après pulvérisation d'*eau R*. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente toujours les taches suivantes correspondant aux taches du chromatogramme obtenu avec la solution témoin : à un $R_F$ voisin de 0,5 (acide oléique) et à un $R_F$ voisin de 0,65 (acide linoléique). Avec certaines huiles, il peut apparaître une tache à un $R_F$ voisin de 0,75 (acide linolénique). Par comparaison avec le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, constatez l'absence, dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, de la tache d'un $R_F$ de 0,25 (acide érucique).

**01/2008:20422**
**corrigé 6.8**

## 2.4.22. COMPOSITION EN ACIDES GRAS PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

La recherche des huiles étrangères est effectuée sur les esters méthyliques des acides gras constitutifs de l'huile à examiner par chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*).

### PROCÉDÉ A

*Cette méthode ne s'applique ni aux huiles contenant des glycérides d'acides gras à groupes époxy-, hydroépoxy-, hydroperoxy-, cyclopropyle ou cyclopropényle, ni à celles qui contiennent en grande quantité des acides gras dont le nombre d'atomes de carbone dans la chaîne est inférieur à 8, ni à celles dont l'indice d'acide est supérieur à 2,0.*

*Solution à examiner.* Si la monographie l'indique, desséchez l'huile à examiner avant l'étape de méthylation. Pesez 1,0 g d'huile dans un ballon à fond rond et à col rodé de 25 mL muni d'un réfrigérant à reflux et d'une entrée de gaz. Ajoutez 10 mL de *méthanol anhydre R* et 0,2 mL d'une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 60 g/L dans du *méthanol R*. Fixez le réfrigérant et faites passer un courant d'*azote R* à un débit d'environ 50 mL/min, agitez et chauffez à ébullition. Lorsque la solution est devenue limpide (généralement après environ 10 min), continuez à chauffer pendant encore 5 min. Refroidissez le ballon sous l'eau courante et transvasez dans une ampoule à décantation. Rincez le ballon avec 5 mL d'*heptane R*, transvasez les liquides de rinçage dans l'ampoule et agitez. Ajoutez 10 mL d'une solution de *chlorure de sodium R* à 200 g/L et agitez vigoureusement. Laissez les phases se séparer et transférez la phase organique dans un flacon contenant du *sulfate de sodium anhydre R*. Laissez reposer, puis filtrez.

*Solution témoin (a).* Préparez 0,50 g du mélange de substances d'étalonnage dont la composition est indiquée dans l'un des tableaux 2.4.22, comme prescrit dans les monographies (si une monographie n'indique pas une solution de référence particulière, utilisez la composition décrite dans le tableau 2.4.22.-1). Dissolvez dans de l'*heptane R* et complétez à 50,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (b).* Prélevez 1,0 mL de solution témoin (a) et complétez à 10,0 mL avec de l'*heptane R*.

*Solution témoin (c).* Préparez 0,50 g d'un mélange d'esters méthyliques d'acides gras dont la composition correspond au mélange d'acides gras indiqué dans la monographie de la substance à examiner. Dissolvez dans de l'*heptane R* et complétez à 50,0 mL avec le même solvant. Des mélanges d'esters méthyliques d'acides gras disponibles dans le commerce peuvent également être utilisés.

*Colonne* :

- *matériau* : silice fondue, verre ou quartz,
- *dimensions* : *l* = 10-30 m, Ø = 0,2-0,8 mm,
- *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur du film 0,1-0,5 µm) ou tout autre phase stationnaire appropriée.

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R* ou *hydrogène pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,3 mL/min (pour une colonne Ø = 0,32 mm).

*Rapport de division* : 1:100 ou moins, selon le diamètre de la colonne (1:50 si Ø = 0,32 mm).

*Température* :

- *colonne* : dans des conditions isothermes, 160-200 °C, selon la longueur et le type de colonne utilisés (200 °C pour une colonne d'une longueur de 30 m recouverte d'un film de *macrogol 20 000 R*) ; si une programmation linéaire de température est nécessaire, portez la température de la colonne de 170 °C à 230 °C à raison de 3 °C/min par exemple,
- *chambre à injection* : 250 °C,
- *détecteur* : 250 °C.

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL.

*Conformité du système* lorsque le mélange de substances d'étalonnage des tableaux 2.4.22.-1 ou 2.4.22.-3 est utilisé :

- *résolution* : au minimum 1,8 entre les pics dus à l'oléate de méthyle et au stéarate de méthyle dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),
- *rapport signal/bruit* : au minimum 5 pour le pic dû au myristate de méthyle dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b),
- *nombre de plateaux théoriques* : au minimum 30 000, calculé pour le pic dû au stéarate de méthyle dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

*Conformité du système* lorsque le mélange de substances d'étalonnage du tableau 2.4.22.-2 est utilisé :

- *résolution* : au minimum 4,0 entre les pics dus au caprylate de méthyle et au caprate de méthyle dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),
- *rapport signal/bruit* : au minimum 5 pour le pic dû au caproate de méthyle dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b),
- *nombre de plateaux théoriques* : au minimum 15 000, calculé pour le pic dû au caprate de méthyle dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

*ÉVALUATION DES CHROMATOGRAMMES*

Evitez les conditions opératoires qui donnent des « pics masqués » (présence de constituants ayant des temps de rétention voisins comme par exemple les acides linolénique et arachidique).

**Analyse qualitative**. Identifiez les pics dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) (chromatographie isotherme ou chromatographie avec programmation linéaire de température).

Lorsqu'une chromatographie isotherme est utilisée, les pics peuvent également être identifiés en traçant des courbes d'étalonnage à l'aide du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) et des informations indiquées dans les tableaux 2.4.22.-1, 2.4.22.-2 ou 2.4.22.-3.

Tableau 2.4.22.-1. – *Mélange de substances d'étalonnage (pour la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire avec division, il est recommandé d'ajouter au mélange d'étalonnage celui des composants du mélange à examiner qui possède la chaîne la plus longue, lorsque l'analyse qualitative est réalisée en utilisant les courbes d'étalonnage)*

| Mélange de composition suivante | Composition (pour cent *m/m*) |
|---|---|
| *Laurate de méthyle R* | 5 |
| *Myristate de méthyle R* | 5 |
| *Palmitate de méthyle R* | 10 |
| *Stéarate de méthyle R* | 20 |
| *Arachidate de méthyle R* | 40 |
| *Oléate de méthyle R* | 20 |

Tableau 2.4.22.-2. – *Mélange de substances d'étalonnage (pour la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire avec division, il est recommandé d'ajouter au mélange d'étalonnage celui des composants du mélange à examiner qui possède la chaîne la plus longue, lorsque l'analyse qualitative est réalisée en utilisant les courbes d'étalonnage)*

| Mélange de composition suivante | Composition (pour cent *m/m*) |
|---|---|
| *Caproate de méthyle R* | 10 |
| *Caprylate de méthyle R* | 10 |
| *Caprate de méthyle R* | 20 |
| *Laurate de méthyle R* | 20 |
| *Myristate de méthyle R* | 40 |

Tableau 2.4.22.-3. – *Mélange de substances d'étalonnage (pour la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire avec division, il est recommandé d'ajouter au mélange d'étalonnage celui des composants du mélange à examiner qui possède la chaîne la plus longue, lorsque l'analyse qualitative est réalisée en utilisant les courbes d'étalonnage)*

| Mélange de composition suivante | Composition (pour cent *m/m*) |
|---|---|
| *Myristate de méthyle R* | 5 |
| *Palmitate de méthyle R* | 10 |
| *Stéarate de méthyle R* | 15 |
| *Arachidate de méthyle R* | 20 |
| *Oléate de méthyle R* | 20 |
| *Eicosénoate de méthyle R* | 10 |
| *Béhénate de méthyle R* | 10 |
| *Lignocérate de méthyle R* | 10 |

Mesurez le temps de rétention réduit ($t'_R$) de chaque pic du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a). $t'_R$ est le temps de rétention mesuré à partir du pic du solvant et non à partir du moment de l'injection. Tracez la droite :

$$\log (t'_R) = f \text{ (longueur de chaîne équivalente)}$$

Les logarithmes des $t'_R$ des acides insaturés se situent sur cette droite, en des points correspondant à un nombre non entier d'atomes de carbone, appelé « longueur de chaîne équivalente » ; la longueur de chaîne équivalente est la longueur de la chaîne saturée théorique qui aurait le même $t'_R$ que celui de l'acide gras à identifier. Par exemple, l'acide linoléique a le même $t'_R$ que l'acide gras saturé théorique ayant 18,8 atomes de carbone.

Identifiez les pics du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner à l'aide de la droite obtenue et des $t'_R$. Des longueurs de chaîne équivalente sont indiquées dans le tableau 2.4.22.-4.

Tableau 2.4.22.-4. – *Longueurs de chaîne équivalente (cette valeur, qui sera déterminée à partir des courbes d'étalonnage, est donnée à titre indicatif pour une colonne de macrogol 20 000 R)*

| Acide gras | Longueur de chaîne équivalente |
|---|---|
| Acide caproïque | 6,0 |
| Acide caprylique | 8,0 |
| Acide caprique | 10,0 |
| Acide laurique | 12,0 |
| Acide myristique | 14,0 |
| Acide palmitique | 16,0 |
| Acide palmitoléique | 16,3 |
| Acide margarique | 17,0 |
| Acide stéarique | 18,0 |
| Acide oléique | 18,3 |
| Acide linoléique | 18,8 |
| Acide gamma-linolénique | 19,0 |
| Acide alpha-linolénique | 19,2 |
| Acide arachidique | 20,0 |
| Acide éicosénoïque (acide gondoïque) | 20,2 |
| Acide arachidonique | 21,2 |
| Acide béhénique | 22,0 |
| Acide érucique | 22,2 |
| Acide 12-oxostéarique | 22,7 |
| Acide ricinoléique | 23,9 |
| Acide 12-hydroxystéarique | 23,9 |
| Acide lignocérique | 24,0 |
| Acide nervonique | 24,2 |

**Analyse quantitative**. Utilisez la méthode de normalisation dans laquelle la somme de la surface des pics du chromatogramme, à l'exception de celui du solvant, est considérée comme étant égale à 100 pour cent. La teneur de chaque composant est calculée en déterminant la surface du pic correspondant, en pourcentage de la somme de la surface de tous les pics. Ne tenez pas compte des pics dont la surface est inférieure à 0,05 pour cent de la surface totale.

Dans certains cas, à savoir lorsque la longueur de chaîne des acides gras est inférieure ou égale à 12 atomes de carbone, des facteurs de correction peuvent être prescrits dans les monographies afin de convertir la surface des pics en pourcentage *m/m*.

PROCÉDÉ B

*Cette méthode ne s'applique ni aux huiles contenant des glycérides d'acides gras à groupes époxy-, hydroépoxy-, hydroperoxy-, cyclopropyle ou cyclopropényle, ni à celles dont l'indice d'acide est supérieur à 2,0.*

*Solution à examiner*. Introduisez 0,100 g de substance à examiner dans un tube à centrifugation de 10 mL muni d'un bouchon à vis. Dissolvez avec 1 mL d'*heptane R* et 1 mL de *carbonate de diméthyle R* et agitez vigoureusement en chauffant doucement (50-60 °C). Ajoutez à la solution encore

chaude 1 mL d'une solution de *sodium R* à 12 g/L dans du *méthanol anhydre R*, préparée avec les précautions nécessaires, et agitez vigoureusement pendant environ 5 min. Ajoutez 3 mL d'*eau distillée R* et agitez vigoureusement pendant environ 30 s. Centrifugez pendant 15 min à 1500 *g*. Injectez 1 µL de phase organique.

*Solutions témoins et évaluation des chromatogrammes*. En l'absence d'indication particulière dans la monographie, procédez comme décrit sous Procédé A.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,

– *dimensions* : *l* = 30 m, Ø = 0,25 mm,

– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur du film 0,25 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 0,9 mL/min.

*Rapport de division* : 1:100.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 15 | 100 |
| | 15 - 36 | 100 → 225 |
| | 36 - 61 | 225 |
| Chambre à injection | | 250 |
| Détecteur | | 250 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL.

PROCÉDÉ C

*Cette méthode ne s'applique pas aux huiles contenant des glycérides d'acides gras à groupe époxy-, hydroépoxy-, hydroperoxy-, aldéhyde, cétone, cyclopropyle et cyclopropényle ainsi que ceux à groupes polyinsaturés conjugués ou à groupes acétyléniques du fait de la destruction partielle ou totale de ces groupes.*

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,10 g de substance à examiner dans 2 mL d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 20 g/L dans du *méthanol R* dans une fiole conique de 25 mL et chauffez à reflux pendant 30 min. Ajoutez 2,0 mL de *solution méthanolique de trifluorure de bore R* à travers le réfrigérant et chauffez pendant 30 min. Ajoutez 4 mL d'*heptane R* à travers le réfrigérant et chauffez pendant 5 min. Refroidissez le mélange et ajoutez 10,0 mL de *solution saturée de chlorure de sodium R*, agitez pendant 15 s et ajoutez une quantité de *solution saturée de chlorure de sodium R* suffisante pour amener la phase supérieure dans le col de la fiole. Prélevez 2 mL de la phase supérieure, lavez 3 fois avec 2 mL d'*eau R* et séchez sur du *sulfate de sodium anhydre R*.

*Solutions témoins, conditions chromatographiques et évaluation des chromatogrammes*. En l'absence d'indication particulière dans la monographie, procédez comme décrit sous Procédé A.

**01/2008:20423**

## 2.4.23. STÉROLS DANS LES HUILES GRASSES

SÉPARATION DE LA FRACTION STÉROLIQUE

Préparez l'insaponifiable puis séparez la fraction stérolique de l'huile grasse par chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) en utilisant une *plaque au gel de silice pour CCM R* (épaisseur de la couche 0,2-0,5 mm).

*Solution à examiner (a)*. Dans un ballon de 150 mL muni d'un réfrigérant à reflux, introduisez un volume de solution de *bétuline R* à 2 g/L dans le *chlorure de méthylène R* choisi de telle sorte qu'il contienne une quantité de bétuline correspondant à environ 10 pour cent de la teneur en stérols de la prise d'essai utilisée pour le dosage (par exemple, le volume de solution de bétuline ajouté sera de 500 µL dans le cas de l'huile d'olive, de 1500 µL dans le cas d'autres huiles végétales). Si la monographie exige le calcul de la teneur pour cent de chaque stérol dans la fraction stérolique, l'addition de bétuline peut être omise. Evaporez à siccité sous un courant d'*azote R*. Ajoutez 5,00 g (*m*) de substance à examiner. Ajoutez ensuite 50 mL de *solution alcoolique d'hydroxyde de potassium 2 M R* et chauffez au bain-marie pendant 1 h en agitant fréquemment par mouvements circulaires. Refroidissez jusqu'à une température inférieure à 25 °C, puis transvasez le contenu du ballon dans une ampoule à décantation avec 100 mL d'*eau R*. Agitez, avec précaution, avec 3 fois 100 mL d'*éther exempt de peroxydes R*. Réunissez les fractions éthérées dans une autre ampoule à décantation contenant 40 mL d'*eau R*, agitez doucement pendant quelques minutes, laissez décanter et jetez la phase aqueuse. Lavez la couche éthérée à plusieurs reprises, chaque fois avec 40 mL d'*eau R* jusqu'à ce que la couche aqueuse ne soit plus alcaline à la phénolphtaléine. Transvasez la couche éthérée dans un ballon taré en lavant l'ampoule à décantation avec de l'*éther exempt de peroxydes R*. Distillez l'éther avec les précautions d'usage et ajoutez au résidu 6 mL d'*acétone R*. Eliminez soigneusement le solvant dans un courant d'*azote R*. Séchez à masse constante à 100-105 °C, laissez refroidir dans un dessiccateur et pesez. Transférez le résidu dans un tube à hémolyse avec du *chlorure de méthylène R*. Evaporez sous un courant d'*azote R* jusqu'à obtenir un volume d'environ 1 mL. Selon le taux d'insaponifiable de l'huile, adaptez la concentration finale de la solution à 25-50 mg/mL.

*Solution à examiner (b)*. Appliquez à 5,00 g d'*huile de colza R* le traitement décrit ci-dessus pour la substance à examiner, à partir de « Ajoutez ensuite 50 mL de *solution alcoolique d'hydroxyde de potassium 2 M R* ».

*Solution à examiner (c)*. Appliquez à 5,00 g d'*huile de tournesol R* le traitement décrit ci-dessus pour la substance à examiner, à partir de « Ajoutez ensuite 50 mL de *solution alcoolique d'hydroxyde de potassium 2 M R* ».

*Solution témoin*. Dissolvez 25 mg de *cholestérol R* et 10 mg de *bétuline R* dans 1 mL de *chlorure de méthylène R*.

Utilisez une plaque différente pour chaque solution à examiner. Déposez 10 µL de solution témoin, en une bande de 10 mm, à 20 mm de la base et 10 mm du bord gauche, et 0,5 mL des solutions à examiner (a), (b) ou (c), en bandes de 150 mm, à 20 mm de la base. Développez sur un parcours de 17 cm avec un mélange de 35 volumes d'*éther R* et de 65 volumes d'*hexane R*. Séchez les plaques dans un courant d'*azote R*. Pulvérisez une solution de *dichlorofluorescéine R* à 2 g/L dans l'*éthanol R* et examinez en lumière ultraviolette à 254 nm. Le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente des bandes correspondant au cholestérol et à la bétuline. Les chromatogrammes obtenus avec les solutions à examiner présentent des bandes de $R_F$ voisins correspondant aux stérols. Sur chacun des chromatogrammes, prélevez une zone de couche correspondant à la bande des stérols ainsi que la zone située 2-3 mm au-dessus et en-dessous des zones visibles correspondant à la solution témoin. Placez ces prélèvements

dans 3 fioles de 50 mL, ajoutez dans chacune 15 mL de *chlorure de méthylène R* et chauffez à reflux, tout en maintenant sous agitation, pendant 15 min. Filtrez séparément chaque solution sur un filtre de verre fritté (40) (*2.1.2*) ou sur un fitre de papier approprié. Lavez chaque filtre avec 3 fois 15 mL de *chlorure de méthylène R*. Introduisez dans 3 fioles le filtrat et les produits de lavage obtenus respectivement pour chaque filtre. Evaporez sous un courant d'*azote R* jusqu'à obtenir un volume d'environ 5-10 mL. Transvasez dans un tube à hémolyse et évaporez à siccité sous un courant d'*azote R*.

DOSAGE DES STÉROLS

Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*). *Effectuez le dosage à l'abri de l'humidité et préparez les solutions extemporanément.*

*Solution à examiner*. Aux stérols séparés à partir de la substance à examiner par chromatographie sur couche mince, ajoutez un mélange récemment préparé de 0,04 mL de *chlorotriméthylsilane R*, de 0,1 mL d'*hexaméthyldisilazane R* et de 0,5 mL de *pyridine anhydre R*. Laissez reposer pendant au moins 5 min et utilisez la phase liquide.

*Solution témoin (a)*. A 9 parties des stérols séparés de l'*huile de colza R* par chromatographie sur couche mince, ajoutez 1 partie de *cholestérol R*. Ajoutez à ce mélange un mélange récemment préparé de 0,04 mL de *chlorotriméthylsilane R*, de 0,1 mL d'*hexaméthyldisilazane R* et de 0,5 mL de *pyridine anhydre R*. Laissez reposer pendant au moins 5 min et utilisez la phase liquide.

*Solution témoin (b)*. Aux stérols obtenus à partir de l'*huile de tournesol R* par chromatographie sur couche mince, ajoutez un mélange récemment préparé de 0,04 mL de *chlorotriméthylsilane R*, de 0,1 mL d'*hexaméthyldisilazane R* et de 0,5 mL de *pyridine anhydre R*. Laissez reposer pendant au moins 5 min et utilisez la phase liquide.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : $l$ = 20-30 m, Ø = 0,25-0,32 mm,
– *phase stationnaire* : *poly[méthyl(95)phényl(5)]siloxane R* ou *poly(cyanopropyl)(7)(phényl)(7)(méthyl)(86)siloxane R* (épaisseur du film 0,25 µm).

*Gaz vecteur* : *hydrogène pour chromatographie R* ou *hélium pour chromatographie R*.

*Vitesse linéaire* : 30-50 cm/s (hydrogène) ou 20-35 cm/s (hélium).

*Rapport de division* : 1:50 ou 1:100.

*Température* :

– *colonne* : 260 °C,
– *chambre à injection* : 280 °C,
– *détecteur* : 290 °C.

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) présente 4 pics principaux correspondant au cholestérol, au brassicastérol, au campestérol et au β-sitostérol. Le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) présente 4 pics principaux correspondant au campestérol, au stigmastérol, au β-sitostérol et au Δ7-stigmasténol. Les temps de rétention relatifs des différents stérols par rapport au β-sitostérol sont indiqués dans le tableau 2.4.23.-1.

Tableau 2.4.23.-1. – *Temps de rétention relatifs des stérols par rapport au β-sitostérol, obtenus avec 2 colonnes différentes*

| | **Poly(cyanopropyl)(7)-(phényl)(7)-(méthyl)(86)siloxane** | **Poly[méthyl(95)-phényl(5)]siloxane** |
|---|---|---|
| Cholestérol | 0,64 | 0,63 |
| Brassicastérol | 0,70 | 0,71 |
| 24-Méthylènecholestérol | 0,79 | 0,80 |
| Campestérol | 0,82 | 0,81 |
| Campestanol | 0,83 | 0,82 |
| Stigmastérol | 0,87 | 0,87 |
| Δ7-Campestérol | 0,93 | 0,92 |
| Δ5,23-Stigmastadiénol | 0,95 | 0,95 |
| Clérostérol | 0,96 | 0,96 |
| β-Sitostérol | 1 | 1 |
| Sitostanol | 1,01 | 1,02 |
| Δ5-Avénastérol | 1,03 | 1,03 |
| Δ5,24-Stigmastadiénol | 1,09 | 1,08 |
| Δ7-Stigmasténol(1) | 1,13 | 1,12 |
| Δ7-Avénastérol | 1,18 | 1,16 |
| Bétuline | 1,4 | 1,4 |

(1) Ce stérol est également appelé Δ7-stigmastérol dans la littérature.

Le pic correspondant à l'étalon interne (bétuline) doit être nettement séparé des pics correspondant aux stérols à doser.

Examinez le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner. Identifiez les pics et calculez la teneur pour cent de chaque stérol dans la fraction stérolique, à l'aide de l'expression :

$$\frac{A}{S} \times 100$$

$A$ = surface du pic dû au composant à doser,

$S$ = somme des surfaces des pics dus aux composants indiqués dans le tableau 2.4.23.-1.

Si la monographie l'exige, calculez la teneur de chaque stérol dans la substance à examiner, en milligrammes pour 100 grammes de substance à examiner, à l'aide de l'expression :

$$\frac{A \times m' \times 100}{A' \times m}$$

$A$ = surface du pic dû au composant à doser,

$A'$ = surface du pic dû à la bétuline,

$m$ = masse de la prise d'essai de la substance à examiner, en grammes,

$m'$ = masse de *bétuline R* ajoutée, en milligrammes.

01/2008:20424

# 2.4.24. IDENTIFICATION ET CONTRÔLE DES SOLVANTS RÉSIDUELS

Les méthodes ci-après mentionnées peuvent être utilisées :

i. pour identifier la majeure partie des solvants résiduels inconnus (appartenant aux classes 1 et 2) qui sont présents dans une substance active, un excipient ou un médicament,

ii. en tant qu'essai limite pour les solvants résiduels (appartenant aux classes 1 et 2) qui sont présents dans une substance active, un excipient ou un médicament,

iii. pour quantifier les solvants résiduels appartenant à la classe 2 lorsque les limites sont supérieures à 1000 ppm (0,1 pour cent) ou pour quantifier, le cas échéant, les solvants résiduels appartenant à la classe 3.

Les solvants résiduels des classes 1, 2 et 3 sont présentés dans le chapitre *5.4. Solvants résiduels*.

Trois diluants possibles sont spécifiés pour la préparation des solutions mères de la substance à examiner, avec les conditions opératoires correspondantes pour l'injection à espace de tête de l'échantillon gazeux dans la colonne. Deux systèmes chromatographiques sont décrits, mais le système A est celui à utiliser de préférence, l'emploi du système B étant normalement réservé à la confirmation de l'identité du solvant résiduel. Le choix d'une des trois méthodes décrites pour la préparation des solutions mères est fonction des propriétés de solubilité de la substance à examiner et, dans certains cas, de la nature des solvants résiduels à contrôler.

Les conditions opératoires mentionnées (espace de tête) ne permettent pas de détecter immédiatement les solvants résiduels suivants : formamide, 2-éthoxyéthanol, 2-méthoxyéthanol, éthylèneglycol, *N*-méthylpyrrolidone et sulfolane. Il convient d'utiliser d'autres procédures appropriées pour contrôler ces solvants.

Lorsque la méthode permettant de contrôler les solvants résiduels présents dans une substance est utilisée de manière quantitative, elle doit être validée pour la substance contrôlée.

MODE OPÉRATOIRE

Opérez par chromatographie en phase gazeuse à espace de tête statique (*2.2.28*).

**Préparation de la solution mère 1**. Cette méthode de préparation est destinée au contrôle des solvants résiduels dans les substances hydrosolubles.

*Solution mère de la substance à examiner (1).* Dissolvez 0,200 g de la substance à examiner dans de l'*eau R* et complétez à 20,0 mL avec le même solvant.

**Préparation de la solution mère 2**. Cette méthode de préparation est destinée au contrôle des solvants résiduels dans les substances insolubles dans l'eau.

*Solution mère de la substance à examiner (2).* Dissolvez 0,200 g de la substance à examiner dans du *N,N-diméthylformamide R* (DMF) et complétez à 20,0 mL avec le même solvant.

**Préparation de la solution mère 3**. Cette méthode de préparation est destinée au contrôle du *N,N*-diméthylacétamide et/ou du *N,N*-diméthylformamide lorsque la présence dans la substance à examiner de l'une de ces substances, ou des deux, est connue ou suspectée.

*Solution mère de la substance à examiner (3).* Dissolvez 0,200 g de la substance à examiner dans de la *1,3-diméthyl-2-imidazolidinone R* (DMI) et complétez à 20,0 mL avec le même solvant.

Dans certains cas, aucune de ces trois méthodes de préparation n'est appropriée. Il doit alors être démontré que la nature du diluant à utiliser et les conditions d'espace de tête statique à appliquer sont appropriées.

*Solution de solvants (a).* Ajoutez 9 mL de *dimethylsulfoxide R* à 1,0 mL de *solution de solvants résiduels de classe 1 SCR* et diluez à 100 mL avec de l'*eau R*. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec de l'*eau R*.

Les solutions de référence correspondent aux limites suivantes :

- benzène : 2 ppm,
- tétrachlorure de carbone : 4 ppm,
- 1,2-dichloroéthane : 5 ppm,
- 1,1-dichloroéthène : 8 ppm,
- 1,1,1-trichloroéthane : 10 ppm.

*Solution de solvants (b).* Dissolvez des quantités appropriées de solvants résiduels de classe 2 dans du *diméthylsulfoxyde R* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Diluez pour obtenir une concentration de 1/20 des limites indiquées dans le tableau 2 (voir *5.4 Solvants résiduels*).

*Solution de solvants (c).* Dissolvez 1,00 g du (des) solvant(s) présent(s) dans la substance à examiner dans du *diméthylsulfoxyde R* ou dans de l'*eau R*, selon le cas, et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Diluez cette solution de façon à obtenir une concentration égale au 1/20 de la (des) limite(s) indiquée(s) dans le tableau 1 ou 2 (voir *5.4 Solvants résiduels*) ou dans la monographie.

*Solution à blanc.* Procédez comme pour la solution de solvants (c), mais sans addition du (des) solvant(s) (cette solution sert à vérifier l'absence de pics pouvant interférer).

*Solution à examiner.* Introduisez dans un flacon d'injection 5,0 mL de solution mère de la substance à examiner et 1,0 mL de solution à blanc.

*Solution témoin (a) (classe 1).* Introduisez dans un flacon d'injection 1,0 mL de solution de solvants (a) et 5,0 mL du diluant approprié.

*Solution témoin ($a_1$) (classe 1).* Introduisez dans un flacon d'injection 5,0 mL de solution mère de la substance à examiner et 1,0 mL de solution de solvants (a).

*Solution témoin (b) (classe 2).* Introduisez dans un flacon d'injection 1,0 mL de solution de solvants (b) et 5,0 mL du diluant approprié.

*Solution témoin (c).* Introduisez dans un flacon d'injection 5,0 mL de solution mère de la substance à examiner et 1,0 mL de solution de solvants (c).

*Solution témoin (d).* Introduisez dans un flacon d'injection 1,0 mL de solution à blanc et 5,0 mL du diluant approprié.

*Fermez les flacons de façon étanche avec une membrane de caoutchouc revêtue de polytétrafluoroéthylène et sertie par une capsule d'aluminium. Agitez de façon à obtenir une solution homogène.*

Les conditions d'espace de tête statique suivantes peuvent être utilisées :

| | Méthode de préparation de la solution mère | | |
|---|---|---|---|
| **Conditions opératoires** | **1** | **2** | **3** |
| Température d'équilibre (°C) | 80 | 105 | 80 |
| Temps d'équilibrage (min) | 60 | 45 | 45 |
| Température de transfert (°C) | 85 | 110 | 105 |
| Gaz vecteur : *azote pour chromatographie R* ou *hélium pour chromatographie R*, sous une pression appropriée | | | |
| Durée de pressurisation(S) | 30 | 30 | 30 |
| Volume injecté (mL) | 1 | 1 | 1 |

La chromatographie peut être réalisée en utilisant :

*SYSTÈME A*

– une colonne capillaire ou semi-capillaire de silice fondue, d'une longueur de 30 m et d'un diamètre intérieur de 0,32 mm ou de 0,53 mm, recouverte d'un mélange réticulé de 6 pour cent de polycyanopropylphénylsiloxane et de 94 pour cent de poly(diméthyl)siloxane (épaisseur du film : 1,8 µm ou 3 µm),

– comme gaz vecteur, de l'*azote pour chromatographie R* ou de l'*hélium pour chromatographie R*, avec un rapport de division de 1:5 et une vitesse linéaire de 35 cm/s environ,

– un détecteur à ionisation de flamme (un spectromètre de masse peut également être utilisé ou un détecteur à capture d'électrons pour les solvants chlorés de classe 1),

en maintenant la température de la colonne à 40 °C pendant 20 min, puis en l'augmentant de 10 °C par minute jusqu'à 240 °C et en la maintenant à 240 °C pendant 20 min, et en maintenant la température de la chambre à injection à 140 °C et celle du détecteur à 250 °C,

ou, en cas d'interférence de la matrice, le système suivant :

*SYSTÈME B*

– une colonne capillaire ou semi-capillaire de silice fondue, d'une longueur de 30 m et d'un diamètre intérieur de 0,32 mm ou de 0,53 mm, recouverte d'un film de *macrogol 20 000 R* (épaisseur : 0,25 µm),

– comme gaz vecteur, de l'*azote pour chromatographie R* ou de l'*hélium pour chromatographie R*, avec un rapport de division de 1:5 et une vitesse linéaire de 35 cm/s environ,

– un détecteur à ionisation de flamme (un spectromètre de masse peut également être utilisé ou un détecteur à capture d'électrons pour les solvants chlorés de classe 1),

en maintenant la température de la colonne à 50 °C pendant 20 min, puis en l'augmentant de 6 °C par minute jusqu'à 165 °C et en la maintenant à 165 °C pendant 20 min, et en maintenant la température de la chambre à injection à 140 °C et celle du détecteur à 250 °C.

Injectez 1 mL de la phase gazeuse de la solution témoin (a) dans la colonne décrite sous Système A et enregistrez le chromatogramme dans des conditions permettant de mesurer le rapport signal/bruit du pic du 1,1,1-trichloroéthane. Ce rapport doit être égal ou supérieur à 5. Un chromatogramme typique est représenté figure 2.4.24.-1.

Injectez 1 mL de la phase gazeuse de la solution témoin ($a_1$) dans la colonne décrite sous Système A. Il est encore possible de détecter les pics correspondant aux solvants résiduels de la classe 1.

Injectez 1 mL de la phase gazeuse de la solution témoin (b) dans la colonne décrite sous Système A et enregistrez le chromatogramme dans des conditions permettant de déterminer la résolution entre les pics de l'acétonitrile et du chlorure de méthylène. Le système est valable si le chromatogramme obtenu est semblable au chromatogramme représenté figure 2.4.24.-2 et si la résolution entre les pics de l'acétonitrile et du chlorure de méthylène n'est pas inférieure à 1,0.

Injectez 1 mL de la phase gazeuse de la solution à examiner dans la colonne décrite sous Système A. Si, dans le chromatogramme obtenu, il n'apparaît aucun pic correspondant à l'un des pics des chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins (a) ou (b), la substance à examiner satisfait à l'essai. Si le chromatogramme obtenu présente un des pics correspondant à l'un des pics des chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins (a) ou (b), employez le système B.

Injectez 1 mL de la phase gazeuse de la solution témoin (a) dans la colonne décrite sous Système B et enregistrez le chromatogramme dans des conditions permettant de mesurer le rapport signal/bruit du pic du benzène. Ce rapport doit être égal ou supérieur à 5. Un chromatogramme typique est représenté figure 2.4.24.-3.

Injectez 1 mL de la phase gazeuse de la solution témoin ($a_1$) dans la colonne décrite sous Système B. Il est encore possible de détecter les pics correspondant aux solvants résiduels de la classe 1.

Injectez 1 mL de la phase gazeuse de la solution témoin (b) dans la colonne décrite sous Système B et enregistrez le chromatogramme dans des conditions permettant de déterminer la résolution entre les pics de l'acétonitrile et du trichloroéthène. Le système est valable si le chromatogramme obtenu est semblable au chromatogramme représenté figure 2.4.24.-4 et si la résolution entre les pics de l'acétonitrile et du trichloroéthène n'est pas inférieure à 1,0.

Injectez 1 mL de la phase gazeuse de la solution à examiner dans la colonne décrite sous Système B. Si, dans le chromatogramme obtenu, il n'apparaît aucun pic correspondant à l'un des pics des chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins (a) ou (b), la substance à examiner satisfait à l'essai. Si le chromatogramme obtenu présente un (des) pic(s) correspondant à l'un des pics des chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins (a) ou (b) et si cette correspondance entre pics confirme celle observée avec le système A, procédez comme suit.

Injectez 1 mL de la phase gazeuse de la solution témoin (c) dans la colonne décrite sous Système A ou Système B. Si nécessaire, ajustez la sensibilité du système de façon que la hauteur du pic correspondant au solvant résiduel identifié représente au moins 50 pour cent de l'échelle totale de l'enregistreur.

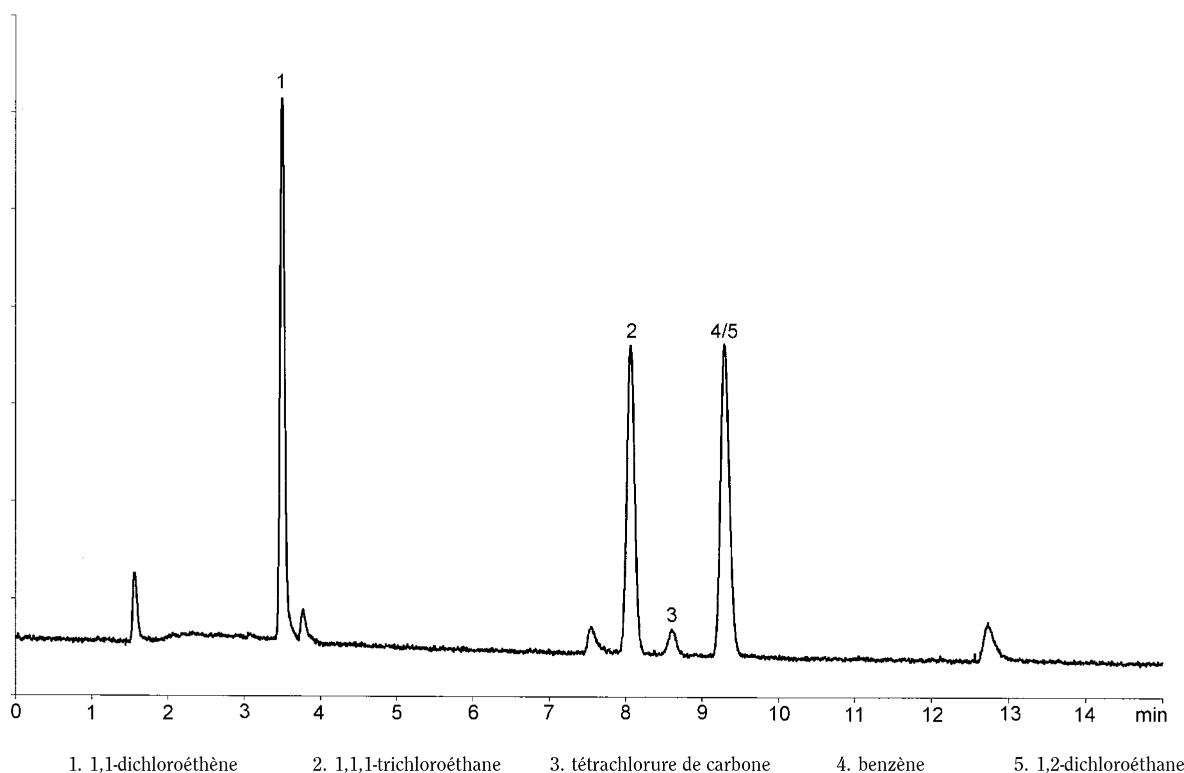
Injectez dans la colonne 1 mL de la phase gazeuse de la solution témoin (d). Aucun pic interférant n'est observé.

Injectez dans la colonne 1 mL de la phase gazeuse de la solution à examiner et 1 mL de la phase gazeuse de la solution témoin (c). Répétez ces deux injections à 2 reprises.

La surface moyenne du pic dû au(x) solvant(s) résiduel(s) dans les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner n'est pas supérieure à la moitié de la surface moyenne du pic correspondant dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin (c). L'essai n'est valable que si, après 3 injections successives de la solution à examiner et de la solution témoin (c), l'écart type relatif de la différence entre les surfaces de pics respectivement obtenues avec les deux solutions n'est pas supérieur à 15 pour cent.

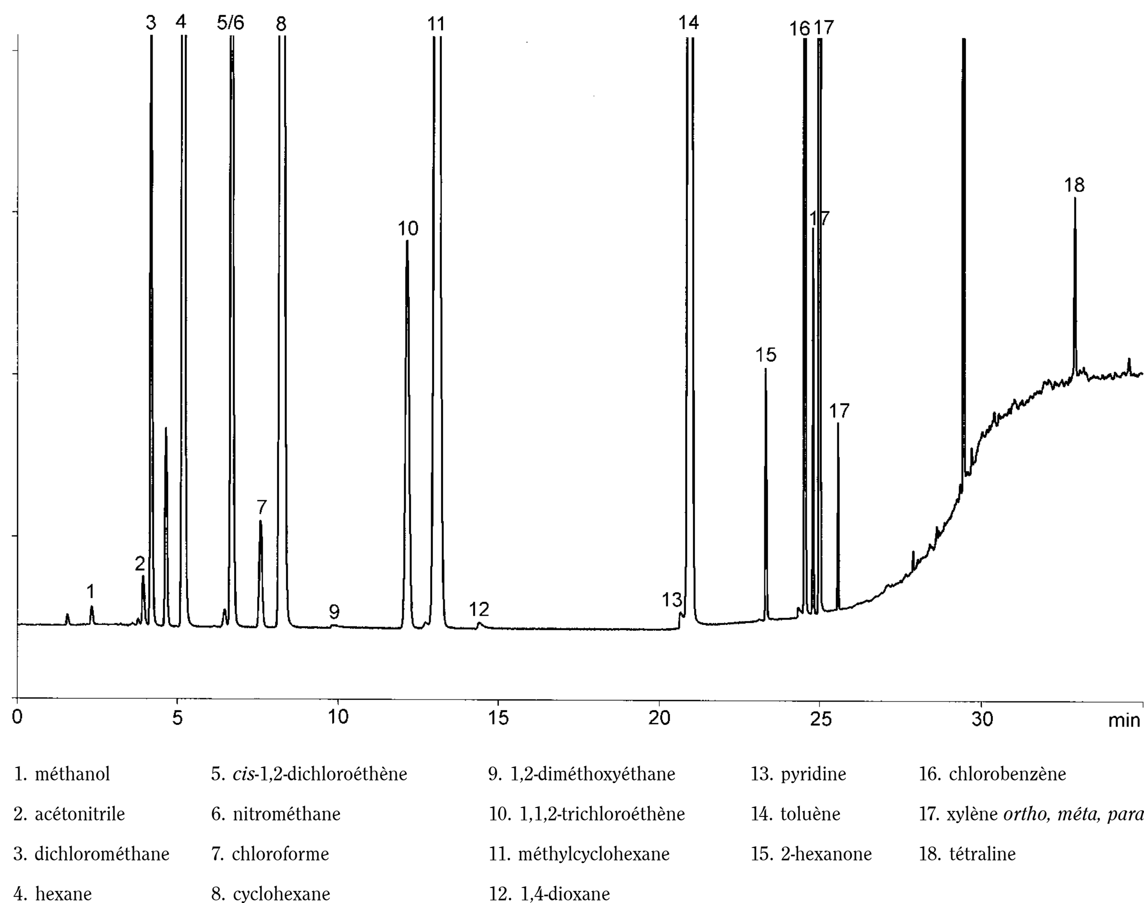
La figure 2.4.24.-5 représente un diagramme illustrant la procédure.

Lorsque le solvant résiduel (classes 2 ou 3) est présent à concentration égale ou supérieure à 0,1 pour cent, il peut faire l'objet d'une analyse quantitative par la méthode des ajouts dosés, au moyen du système A ou du système B.



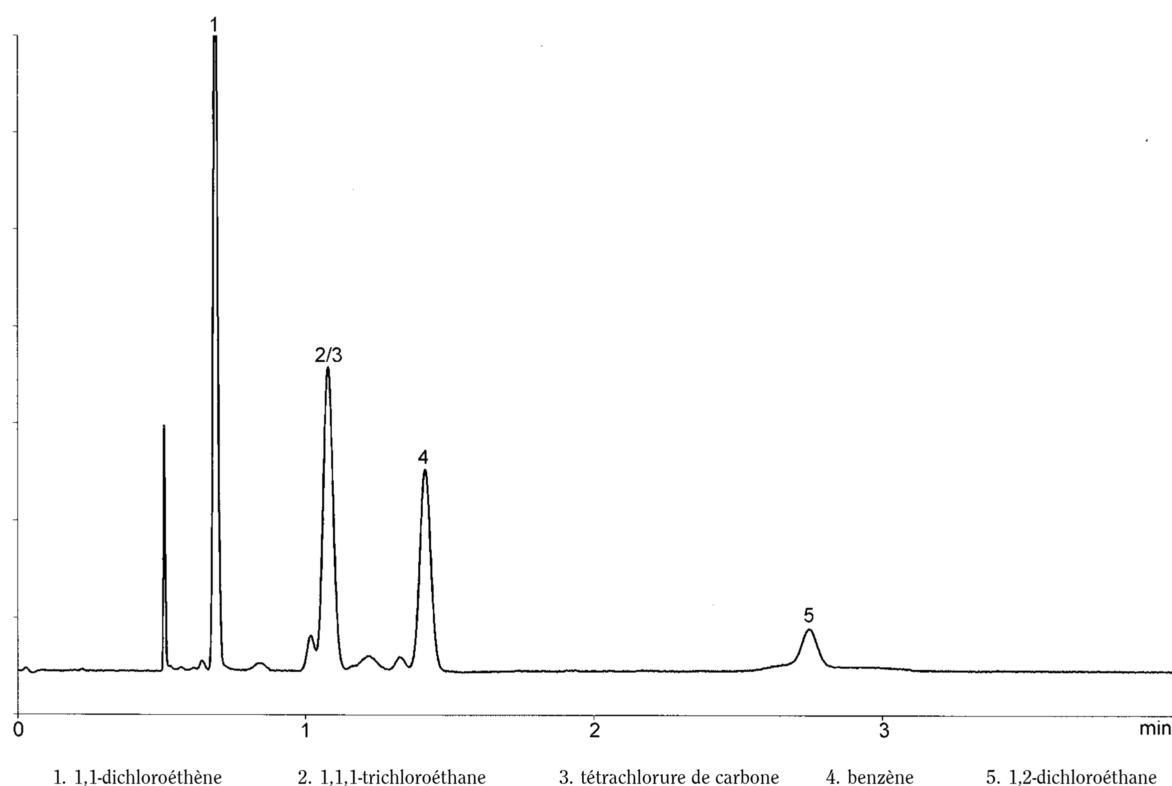

1. 1,1-dichloroéthène 2. 1,1,1-trichloroéthane 3. tétrachlorure de carbone 4. benzène 5. 1,2-dichloroéthane

Figure 2.4.24.-1. – *Chromatogramme typique des solvants de classe 1 dans les conditions décrites pour le système A et Procédure 1. Détecteur à ionisation de flamme.*



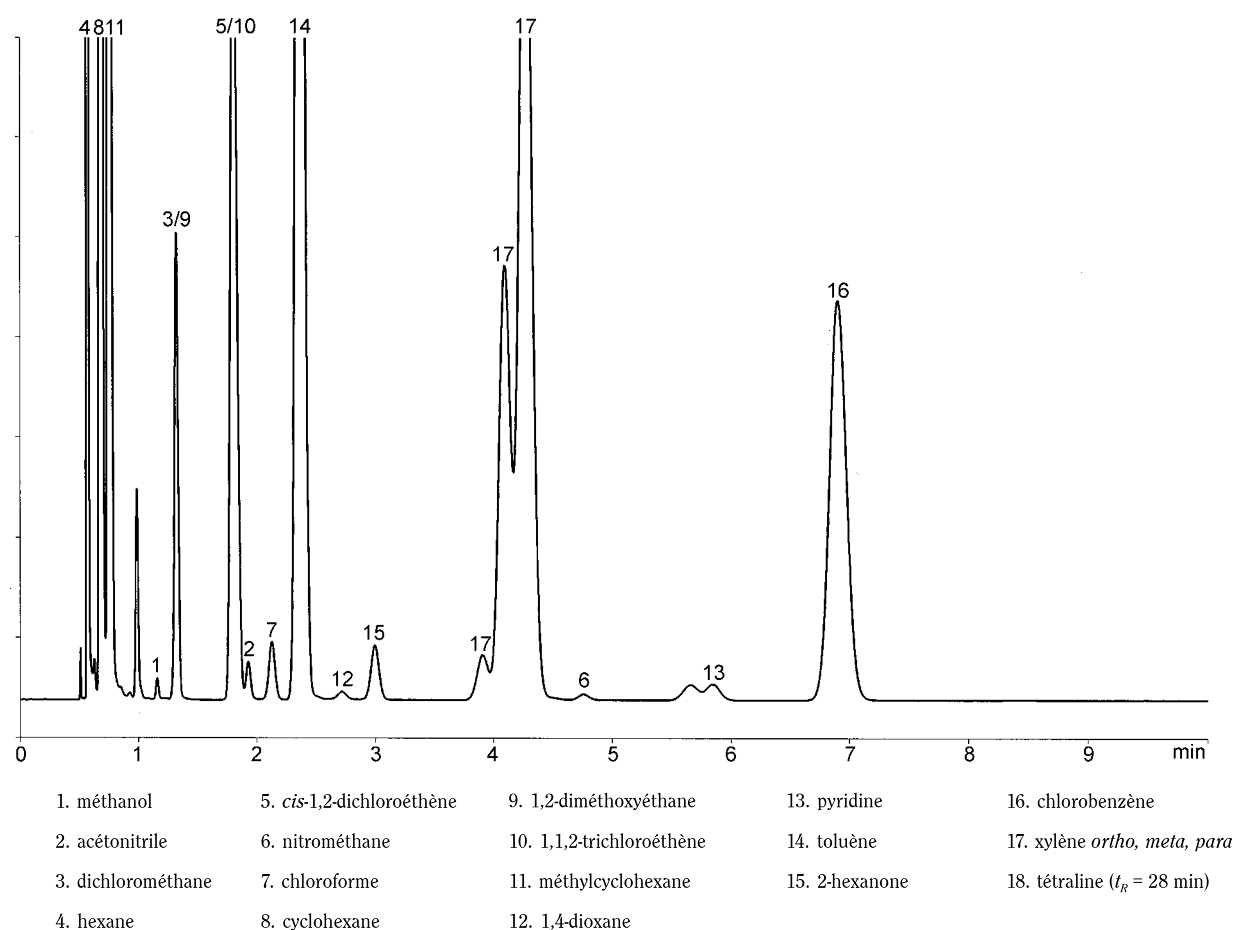

1. méthanol
2. acétonitrile
3. dichlorométhane
4. hexane
5. *cis*-1,2-dichloroéthène
6. nitrométhane
7. chloroforme
8. cyclohexane
9. 1,2-diméthoxyéthane
10. 1,1,2-trichloroéthène
11. méthylcyclohexane
12. 1,4-dioxane
13. pyridine
14. toluène
15. 2-hexanone
16. chlorobenzène
17. xylène *ortho, méta, para*
18. tétraline

Figure 2.4.24.-2. – *Chromatogramme typique des solvants de classe 2 dans les conditions décrites pour le système A et Procédure 1. Détecteur à ionisation de flamme.*




1. 1,1-dichloroéthène 2. 1,1,1-trichloroéthane 3. tétrachlorure de carbone 4. benzène 5. 1,2-dichloroéthane

Figure 2.4.24.-3. – *Chromatogramme typique des solvants de classe 1 dans les conditions décrites pour le système B et Procédure 1. Détecteur à ionisation de flamme.*




| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1. méthanol | 5. *cis*-1,2-dichloroéthène | 9. 1,2-diméthoxyéthane | 13. pyridine | 16. chlorobenzène |
| 2. acétonitrile | 6. nitrométhane | 10. 1,1,2-trichloroéthène | 14. toluène | 17. xylène *ortho, meta, para* |
| 3. dichlorométhane | 7. chloroforme | 11. méthylcyclohexane | 15. 2-hexanone | 18. tétraline ($t_R$ = 28 min) |
| 4. hexane | 8. cyclohexane | 12. 1,4-dioxane | | |

Figure 2.4.24.-4. – *Chromatogramme typique des solvants de classe 2 dans les conditions décrites pour le système B et Procédure 1. Détecteur à ionisation de flamme.*

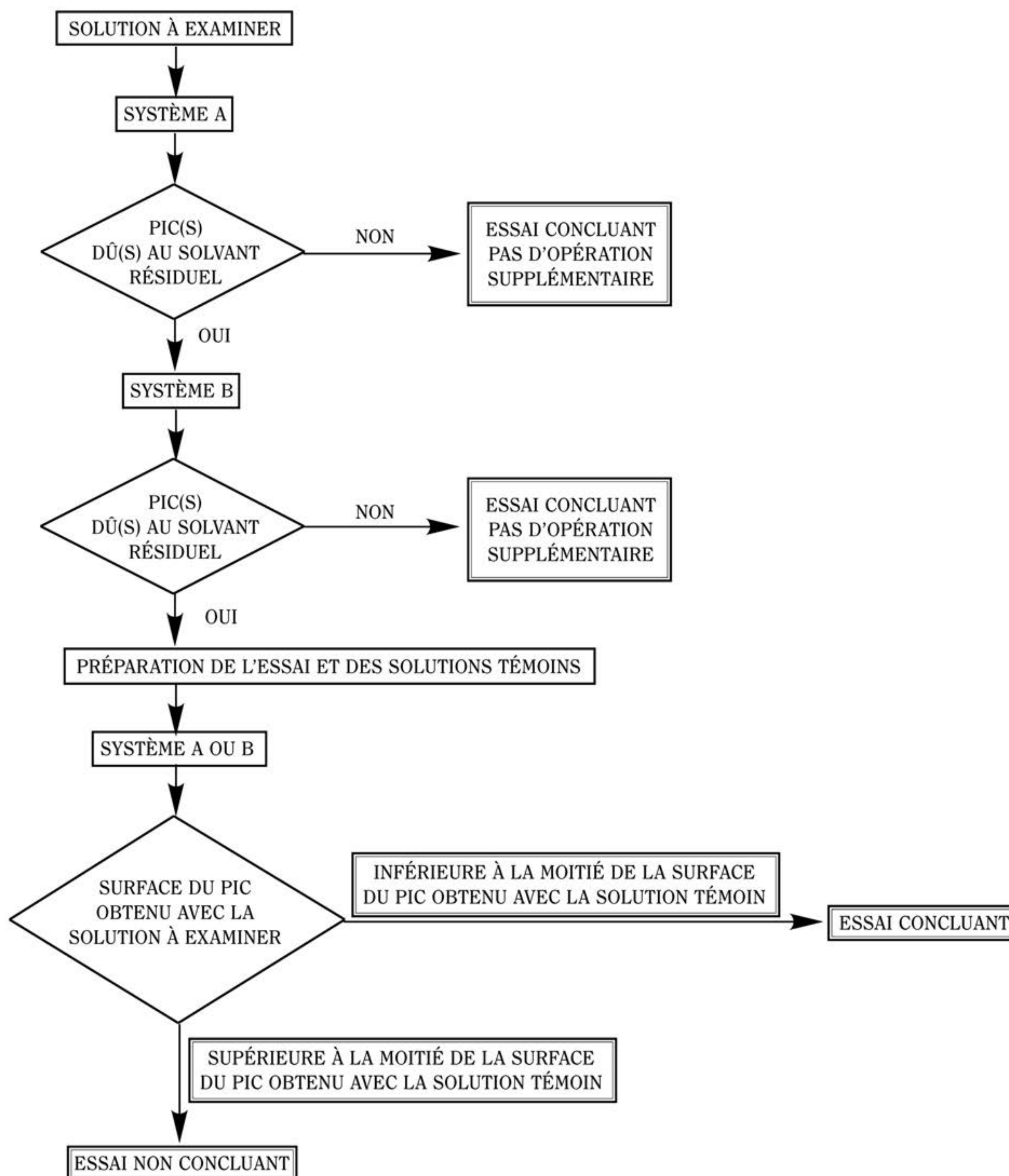



Figure 2.4.24.-5. – *Schéma relatif à l'identification des solvants résiduels et à l'application des essais limites*

**01/2008:20425**

## 2.4.25. OXYDE D'ÉTHYLÈNE ET DIOXANE

Cet essai est destiné à la détermination des résidus d'oxyde d'éthylène et de dioxane dans des échantillons solubles dans l'eau ou dans le diméthylacétamide. Pour les substances insolubles ou insuffisamment solubles dans ces solvants, la préparation de la solution mère et les conditions d'espace de tête statique sont indiquées dans les monographies spécifiques.

Opérez par chromatographie en phase gazeuse à espace de tête (*2.2.28*).

A. Pour les échantillons solubles dans ou miscibles à l'eau, procédez de la façon suivante.

*Solution à examiner*. Dans un flacon de 10 mL (d'autres flacons peuvent être utilisés conformément aux conditions opératoires correspondantes), introduisez 1,00 g ($M_T$) de substance à examiner et ajoutez 1,0 mL d'*eau R*. Obturez et mélangez afin d'obtenir une solution homogène. Laissez reposer à 70 °C pendant 45 min.

*Solution témoin (a).* Dans un flacon identique de 10 mL, introduisez 1,00 g ($M_R$) de substance à examiner, ajoutez 0,50 mL de *solution d'oxyde d'éthylène R3* et 0,50 mL de *solution de dioxane R1.* Obturez et mélangez afin d'obtenir une solution homogène. Laissez reposer à 70 °C pendant 45 min.

*Solution témoin (b).* A 0,50 mL de *solution d'oxyde d'éthylène R3* déposée dans un flacon de 10 mL, ajoutez 0,1 mL d'une solution récemment préparée d'*acétaldéhyde R* à 10 mg/L et 0,1 mL de *solution de dioxane R1*. Obturez et mélangez afin d'obtenir une solution homogène. Laissez reposer à 70 °C pendant 45 min.

B. Pour les échantillons solubles dans ou miscibles au diméthylacétamide, procédez de la façon suivante.

*Solution à examiner*. Dans un flacon de 10 mL (d'autres flacons peuvent être utilisés conformément aux conditions opératoires correspondantes), introduisez 1,00 g ($M_T$) de substance à examiner et ajoutez 1,0 mL de *diméthylacétamide R* et 0,20 mL d'*eau R*. Obturez et mélangez afin d'obtenir une solution homogène. Laissez reposer à 90 °C pendant 45 min.

*Solution témoin (a)*. Dans un flacon identique de 10 mL, introduisez 1,00 g ($M_R$) de substance à examiner, ajoutez 1,0 mL de *diméthylacétamide R*, 0,10 mL de *solution de dioxane R* et 0,10 mL de *solution d'oxyde d'éthylène R2*. Obturez et mélangez afin d'obtenir une solution homogène. Laissez reposer à 90 °C pendant 45 min.

*Solution témoin (b)*. A 0,10 mL de *solution d'oxyde d'éthylène R2* déposée dans un flacon de 10 mL, ajoutez 0,1 mL d'une solution récemment préparée d'*acétaldéhyde R* à 10 mg/L et 0,10 mL de *solution de dioxane R*. Obturez et mélangez afin d'obtenir une solution homogène. Laissez reposer à 70 °C pendant 45 min.

Les conditions d'espace de tête statique suivantes peuvent être utilisées :

– température d'équilibrage : 70 °C (90 °C pour les solutions dans le diméthylacétamide),
– durée d'équilibrage : 45 min,
– température de la ligne de transfert : 75 °C (150 °C pour les solutions dans le diméthylacétamide),
– gaz vecteur : *hélium pour chromatographie R*,
– durée de pressurisation : 1 min,
– durée d'injection : 12 s.

La chromatographie peut être réalisée en utilisant :

– une colonne de verre ou de silice fondue, d'une longueur de 30 m et d'un diamètre intérieur de 0,32 mm, recouverte d'une couche de *poly(diméthyl)siloxane R* d'une épaisseur de 1,0 µm,
– comme gaz vecteur, de l'*hélium pour chromatographie R* ou de l'*azote pour chromatographie R*, à une vitesse linéaire de 20 cm/s environ et avec un rapport de division de 1:20,
– un détecteur à ionisation de flamme,

en maintenant la température de la colonne à 50 °C pendant 5 min, puis en l'augmentant de 5 °C par minute jusqu'à 180 °C, puis de 30 °C par minute jusqu'à 230 °C et en la maintenant à 230 °C pendant 5 min ; en maintenant la température de la chambre à injection à 150 °C et celle du détecteur à 250 °C.

Injectez un volume approprié, par exemple 1,0 mL, de la phase gazeuse de la solution témoin (b). Ajustez la sensibilité du système de façon que la hauteur des pics correspondant à l'oxyde d'éthylène et à l'acétaldéhyde dans le chromatogramme obtenu représente au moins 15 pour cent de l'échelle totale de l'enregistreur.

L'essai n'est valable que si :

– dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b), la résolution entre les pics correspondant respectivement à l'acétaldéhyde et à l'oxyde d'éthylène n'est pas inférieure à 2,0,
– dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b), le rapport signal/bruit du pic correspondant au dioxane n'est pas inférieur à 5.

Injectez séparément des volumes appropriés, par exemple 1,0 mL (ou des volumes identiques à ceux utilisés pour la solution témoin (b)) des phases gazeuses de la solution à examiner et de la solution témoin (a). Répétez la procédure à 2 autres reprises.

*Vérification de la précision*

Pour chacune des répétitions, calculez pour l'oxyde d'éthylène et pour le dioxane la différence entre les surfaces des pics respectivement obtenus avec la solution à examiner et avec la solution témoin (a). Le dosage n'est valable que si l'écart type relatif des 3 valeurs obtenues pour l'oxyde d'éthylène n'est pas supérieur à 15 pour cent et si l'écart type relatif des 3 valeurs obtenues pour le dioxane n'est pas supérieur à 10 pour cent. Si la masse des prises d'essai utilisées pour les solutions témoins s'écarte de 1,00 g de plus de 0,5 pour cent, les corrections appropriées doivent être effectuées.

La teneur en oxyde d'éthylène ou en dioxane en parties par million est calculée à l'aide des expressions :

$$\frac{A_T \times C}{(A_R \times M_T) - (A_T \times M_R)}$$

$A_T$ = surface du pic correspondant à l'oxyde d'éthylène dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_R$ = surface du pic correspondant à l'oxyde d'éthylène dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),

$M_T$ = masse de la substance à examiner (en grammes) dans la solution à examiner,

$M_R$ = masse de la substance à examiner (en grammes) dans la solution témoin,

$C$ = quantité d'oxyde d'éthylène (en microgrammes) ajoutée à la solution témoin (a).

$$\frac{D_T \times C}{(D_R \times M_T) - (D_T \times M_R)}$$

$D_T$ = surface du pic correspondant au dioxane dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$D_R$ = surface du pic correspondant au dioxane dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),

$C$ = quantité de dioxane (en microgrammes) ajoutée à la solution témoin (a).

**01/2008:20426**

## 2.4.26. *N,N*-DIMÉTHYLANILINE

MÉTHODE A

Opérez par chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) en utilisant la *N,N-diéthylaniline R* comme étalon interne.

*Solution d'étalon interne*. Dissolvez 50 mg de *N,N-diéthylaniline R* dans 4 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* et complétez à 50 mL avec de l'*eau R*. Prélevez 1 mL de solution et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

*Solution à examiner*. Dans un tube à essai à bouchon rodé, dissolvez 0,50 g de la substance à examiner dans 30,0 mL d'*eau R*. Ajoutez 1,0 mL de solution d'étalon interne. Amenez la solution à une température de 26-28 °C. Ajoutez 1,0 mL de *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R*. Mélangez jusqu'à dissolution complète. Ajoutez 2,0 mL de *triméthylpentane R*. Agitez pendant 2 min. Laissez séparer les phases. Utilisez la couche supérieure.

*Solution témoin*. Dissolvez 50,0 mg de *N,N-diméthylaniline R* dans 4,0 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R*. Prélevez 1,0 mL de solution et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 30,0 mL avec de l'*eau R*. Ajoutez 1,0 mL de solution d'étalon interne et 1,0 mL de *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R*. Ajoutez 2,0 mL de *triméthylpentane R*. Agitez pendant 2 min. Laissez séparer les phases. Utilisez la couche supérieure.

2. Méthodes analytiques

La chromatographie peut être réalisée en utilisant :

– une colonne de silice fondue d'une longueur de 25 m et d'un diamètre intérieur de 0,32 mm, recouverte de *polyméthylphénylsiloxane R* réticulé (épaisseur du film 0,52 µm),
– comme gaz vecteur, de l'*hélium pour chromatographie R*, avec un rapport de division 1:20, une pression de tête de colonne de 50 kPa et un débit de 20 mL/min,
– un détecteur à ionisation de flamme,
– un tube manchon capillaire avec division, d'une longueur de 1 cm environ, rempli de *terre d'infusoires pour chromatographie en phase gazeuse R* imprégnée de 10 pour cent *m/m* de *poly(diméthyl)siloxane R*,

en maintenant la température de la colonne à 150 °C pendant 5 min, puis en l'augmentant de 20 °C par minute jusqu'à 275 °C et en la maintenant à 275 °C pendant 3 min, et en maintenant la température du détecteur à 300 °C et celle de la chambre à injection à 220 °C.

Les temps de rétention sont : 3,6 min environ pour la *N,N*-diméthylaniline et 5,0 min environ pour la *N,N*-diéthylaniline.

Injectez 1 µL de solution à examiner et 1 µL de solution témoin.

MÉTHODE B

Opérez par chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) en utilisant le *naphtalène R* comme étalon interne.

*Solution d'étalon interne*. Dissolvez 50 mg de *naphtalène R* dans du *cyclohexane R* et complétez à 50 mL avec le même solvant. Prélevez 5 mL de solution et complétez à 100 mL avec du *cyclohexane R*.

*Solution à examiner*. Dans un tube à essai à bouchon rodé, introduisez 1,00 g de substance à examiner. Ajoutez 5 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* et 1,0 mL de solution d'étalon interne. Bouchez et agitez énergiquement pendant 1 min. Centrifugez si nécessaire. Utilisez la couche supérieure.

*Solution témoin*. A 50,0 mg de *N,N-diméthylaniline R*, ajoutez 2 mL d'*acide chlorhydrique R* et 20 mL d'*eau R*. Agitez jusqu'à dissolution et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R*. Prélevez 5,0 mL de solution et complétez à 250,0 mL avec de l'*eau R*. Dans un tube à essai à bouchon rodé, introduisez 1,0 mL de cette dernière solution. Ajoutez 5 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* et 1,0 mL de solution d'étalon interne. Bouchez et agitez énergiquement pendant 1 min. Centrifugez si nécessaire. Utilisez la couche supérieure.

La chromatographie peut être réalisée en utilisant :

– une colonne de verre d'une longueur de 2 m et d'un diamètre intérieur de 2 mm, remplie de *terre d'infusoires silanisée pour chromatographie en phase gazeuse R*, imprégnée de 3 pour cent *m/m* de *polyméthylphénylsiloxane R*,
– comme gaz vecteur, de l'*azote pour chromatographie R* à un débit de 30 mL/min,
– un détecteur à ionisation de flamme,

en maintenant la température de la colonne à 120 °C, celle de la chambre à injection et celle du détecteur à 150 °C.

Injectez 1 µL de solution à examiner et 1 µL de solution témoin.

**01/2008:20427**

## 2.4.27. MÉTAUX LOURDS DANS LES DROGUES VÉGÉTALES ET DANS LES HUILES GRASSES

Examinez par spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23*).

*AVERTISSEMENT : il convient de se familiariser avec les instructions de sécurité et d'utilisation fournies par les fabricants des récipients fermés pour minéralisation sous haute pression et du four à micro-ondes de laboratoire.*

APPAREILLAGE

L'appareillage typique comporte :

– des fioles à minéralisation en polytétrafluoroéthylène d'un volume d'environ 120 mL, à fermeture hermétique, pourvue d'une soupape pour régler la pression à l'intérieur du récipient et d'un tube en polytétrafluoroéthylène pour laisser s'échapper le gaz,
– un appareillage pour fermer les fioles d'une manière hermétique en appliquant la même force de torsion pour chacune d'entre elles,
– un four à micro-ondes à une fréquence du magnétron de 2450 MHz avec un système pour sélectionner des accroissements de la puissance de 1 pour cent de 0 à 630 ± 70 W, un ordinateur programmable, une chambre de minéralisation dont les parois sont recouvertes de polytétrafluoroéthylène et pourvues d'un système à plan tournant, d'un ventilateur à vitesse réglable et d'un tube pour la décharge de gaz,
– un spectromètre d'absorption atomique équipé de lampes à cathode creuse comme source de radiation, d'une lampe au deutérium comme correcteur de fond ; le système est muni de :

  (a) un four de graphite comme dispositif d'atomisation pour le cadmium, le cuivre, le fer, le nickel, le plomb et le zinc,

  (b) un système automatique de génération de vapeurs d'hydrures à flux continu pour l'arsenic et le mercure.

MODE OPÉRATOIRE

*En cas d'utilisation d'appareillage alternatif, un ajustement des paramètres instrumentaux peut être nécessaire.*

Lavez toute la verrerie et l'appareillage de laboratoire avant usage avec une solution d'*acide nitrique R* à 10 g/L.

*Solution à examiner*. Dans une fiole à minéralisation introduisez la prise d'essai prescrite de substance à examiner (environ 0,50 g de drogue pulvérisée (1400) (*2.9.12*) ou 0,50 g d'huile grasse). Ajoutez 6 mL d'*acide nitrique exempt de métaux lourds R* et 4 mL d'*acide chlorhydrique exempt de métaux lourds R*. Fermez la fiole hermétiquement.

Placez les fioles à minéralisation dans un four à micro-ondes. Effectuez la minéralisation en 3 étapes, selon le programme suivant prévu pour 7 fioles contenant chacune la solution à examiner : 80 pour cent de puissance pendant 15 min, 100 pour cent de puissance pendant 5 min, 80 pour cent de puissance pendant 20 min.

A la fin du cycle, laissez refroidir les fioles à l'air, puis ajoutez à chaque fiole 4 mL d'*acide sulfurique exempt de métaux lourds R*. Répétez le programme de minéralisation. Après refroidissement à l'air, ouvrez chaque fiole et versez la solution limpide et incolore obtenue dans un ballon jaugé de 50 mL. Rincez chaque fiole avec 2 fois 15 mL d'*eau R* et versez les liquides de rinçage dans le ballon jaugé. Ajoutez 1,0 mL d'une solution de *nitrate de magnésium R* à 10 g/L et 1,0 mL d'une solution de *dihydrogénophosphate d'ammonium R* à 100 g/L et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R*.

*Solution à blanc*. Mélangez 6 mL d'*acide nitrique exempt de métaux lourds R* et 4 mL d'*acide chlorhydrique exempt de métaux lourds R* dans une fiole à digestion. Effectuez la minéralisation de la même manière que pour la préparation de la solution à examiner.

*CADMIUM, CUIVRE, FER, NICKEL, PLOMB ET ZINC*

Déterminez la teneur en cadmium, cuivre, fer, nickel, plomb et zinc par la méthode des ajouts dosés (*2.2.23, Procédé II*) en utilisant des solutions de référence de chacun des éléments à doser et en réglant l'appareil selon les paramètres instrumentaux indiqués dans le tableau 2.4.27.-1.

La valeur de l'absorbance de la solution à blanc est automatiquement soustraite à la valeur obtenue avec la solution à examiner.

Tableau 2.4.27.-1

| | | Cd | Cu | Fe | Ni | Pb | Zn |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Longueur d'onde | nm | 228,8 | 324,8 | 248,3 | 232 | 283,5 | 213,9 |
| Bande passante | nm | 0,5 | 0,5 | 0,2 | 0,2 | 0,5 | 0,5 |
| Courant de lampe | mA | 6 | 7 | 5 | 10 | 5 | 7 |
| Température de calcination | °C | 800 | 800 | 800 | 800 | 800 | 800 |
| Température d'atomisation | °C | 1800 | 2300 | 2300 | 2500 | 2200 | 2000 |
| Correcteur du fond | | oui | non | non | non | non | non |
| Débit d'azote | L/min | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

*ARSENIC ET MERCURE*

Déterminez la teneur en arsenic et mercure par la méthode de la courbe d'étalonnage (*2.2.23, Procédé I*) par comparaison avec des solutions de référence d'arsenic ou de mercure en utilisant un système automatique de génération de vapeurs d'hydrures à flux continu.

La valeur de l'absorbance de la solution à blanc est automatiquement soustraite à la valeur obtenue avec la solution à examiner.

**Arsenic**

*Solution échantillon.* A 19,0 mL de solution à examiner ou de solution à blanc comme prescrit plus haut, ajoutez 1 mL d'une solution d'*iodure de potassium R* à 200 g/L. Laissez reposer la solution à examiner environ 50 min à température ambiante ou environ 4 min à 70 °C.

*Réactif acide. Acide chlorhydrique exempt de métaux lourds R.*

*Réactif de réduction.* Une solution de *tétrahydroborate de sodium R* à 6 g/L dans une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 5 g/L.

Les paramètres instrumentaux indiqués dans le tableau 2.4.27.-2 peuvent être utilisés.

**Mercure**

*Solution échantillon.* Solution à examiner ou solution à blanc, comme prescrit plus haut.

*Réactif acide.* Une solution d'*acide chlorhydrique exempt de métaux lourds R* à 515 g/L.

*Réactif de réduction.* Solution à 10 g/L de *chlorure stanneux R* dans de l'*acide chlorhydrique dilué exempt de métaux lourds R.*

Les paramètres instrumentaux indiqués dans le tableau 2.4.27.-2 peuvent être utilisés.

Tableau 2.4.27.-2

| | | As | Hg |
|---|---|---|---|
| Longueur d'onde | nm | 193,7 | 253,7 |
| Bande passante | nm | 0,2 | 0,5 |
| Courant de la lampe | mA | 10 | 4 |
| Débit du réactif acide | mL/min | 1,0 | 1,0 |
| Débit du réactif de réduction | mL/min | 1,0 | 1,0 |
| Débit de la solution échantillon | mL/min | 7,0 | 7,0 |
| Chambre d'absorption | | Quartz (chauffé) | Quartz (non chauffé) |
| Correcteur du fond | | non | non |
| Débit d'azote | L/min | 0,1 | 0,1 |

**01/2008:20428**

## 2.4.28. ACIDE 2-ÉTHYLHEXANOÏQUE

Opérez par chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*), en utilisant de l'*acide 3-cyclohexylpropionique R* comme étalon interne.

*Solution d'étalon interne.* Dissolvez 100 mg d'*acide 3-cyclohexylpropionique R* dans du *cyclohexane R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

*Solution à examiner.* A 0,300 g de substance à examiner, ajoutez 4,0 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 33 pour cent *V/V*. Agitez énergiquement, pendant 1 min, avec 1,0 mL de solution d'étalon interne. Laissez les phases se séparer (si nécessaire, centrifugez pour améliorer la séparation). Utilisez la phase supérieure.

*Solution témoin.* Dissolvez 75,0 mg d'*acide 2-éthylhexanoïque R* dans la solution d'étalon interne et complétez à 50,0 mL avec la même solution. A 1,0 mL de cette solution, ajoutez 4,0 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 33 pour cent *V/V*. Agitez énergiquement pendant 1 min et laissez les phases se séparer (si nécessaire, centrifugez pour améliorer la séparation). Utilisez la phase supérieure.

La chromatographie peut être réalisée en utilisant :

- une colonne semi-capillaire en silice fondue, d'une longueur de 10 m et d'un diamètre intérieur de 0,53 mm, remplie de *2-nitrotéréphtalate de macrogol 20 000 R* (épaisseur du film 1,0 µm),
- comme gaz vecteur, de l'*hélium pour chromatographie R,* à un débit de 10 mL/min,
- un détecteur à ionisation de flamme,

en utilisant la programmation de température suivante :

| | Intervalle (min) | Température (°C) | Vitesse (°C/min) | Commentaire |
|---|---|---|---|---|
| Colonne | 0 - 2 | 40 | – | isotherme |
| | 2 - 7,3 | 40 → 200 | 30 | gradient linéaire |
| | 7,3 - 10,3 | 200 | – | isotherme |
| Chambre à injection | | 200 | | |
| Détecteur | | 300 | | |

Injectez 1 µL de solution à examiner et 1 µL de solution témoin.

L'essai n'est valable que si la résolution entre les pics correspondant à l'acide 2-éthylhexanoïque (premier pic) et à l'étalon interne n'est pas inférieur à 2,0.

Calculez la teneur pour cent en acide 2-éthylhexanoïque à l'aide de l'expression :

$$\frac{A_T \times I_R \times m_R \times 2}{A_R \times I_T \times m_T}$$

$A_T$ = surface du pic correspondant à l'acide 2-éthylhexanoïque dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_R$ = surface du pic correspondant à l'acide 2-éthylhexanoïque dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$I_T$ = surface du pic correspondant à l'étalon interne dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$I_R$ = surface du pic correspondant à l'étalon interne dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_T$ = masse de la substance à examiner dans la solution à examiner, en grammes,

$m_R$ = masse de l'acide 2-éthylhexanoïque dans la solution témoin, en grammes.

**07/2010:20429**

# 2.4.29. COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES HUILES RICHES EN ACIDES OMÉGA-3

*Le dosage peut être utilisé pour la détermination quantitative de la teneur en EPA et en DHA dans les produits à base d'huile de poisson contenant des acides oméga-3 à différentes concentrations. La méthode s'applique aux triglycérides ou aux esters éthyliques et les résultats sont exprimés respectivement en triglycérides ou en esters éthyliques.*

EPA ET DHA

Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*). *Effectuez les manipulations aussi rapidement que possible, en évitant toute exposition à la lumière actinique, aux agents et catalyseurs d'oxydation (par exemple cuivre et fer) et à l'air.*

Le dosage est effectué sur les esters méthyliques ou éthyliques de l'acide (tout-*Z*)-eicosa-5,8,11,14,17-pentaénoïque (EPA ; 20:5 n-3) et de l'acide (tout-*Z*)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaénoïque (DHA ; 22:6 n-3) de la substance à examiner.

*Etalon interne. Tricosanoate de méthyle R.*

*Solution à examiner (a)*

A. Dissolvez une quantité d'échantillon à examiner telle qu'indiquée dans le tableau 2.4.29.-1 et environ 70,0 mg d'étalon interne dans une solution de *butylhydroxytoluène R* à 50 mg/L dans le *triméthylpentane R* et complétez à 10,0 mL avec la même solution. Si nécessaire, chauffez doucement (jusqu'à 60 °C) pour dissoudre l'étalon interne.

Tableau 2.4.29.-1.

| **Somme EPA + DHA approximative (pour cent)** | **Quantité d'échantillon à examiner (g)** |
|---|---|
| 30 - 50 | 0,4 - 0,5 |
| 50 - 70 | 0,3 |
| 70 - 90 | 0,25 |

Les esters éthyliques sont alors prêts pour l'analyse. Pour les triglycérides, poursuivez comme décrit à l'étape B.

B. Introduisez 2,0 mL de la solution obtenue à l'étape A dans un tube de quartz et évaporez le solvant sous un faible courant d'*azote R*. Ajoutez 1,5 mL de solution d'*hydroxyde de sodium R* à 20 g/L dans le *méthanol R*, recouvrez d'une couche d'*azote R*, bouchez hermétiquement avec une capsule doublée de polytétrafluoroéthylène, mélangez et chauffez au bain-marie pendant 7 min. Laissez refroidir. Ajoutez 2 mL de *solution méthanolique de trichlorure de bore R*, recouvrez d'une couche d'*azote R*, obturez hermétiquement, mélangez et chauffez au bain-marie pendant 30 min. Refroidissez à 40-50 °C, ajoutez 1 mL de *triméthylpentane R*, bouchez et agitez fortement pendant au moins 30 s. Ajoutez immédiatement 5 mL d'une *solution saturée de chlorure de sodium R*, recouvrez d'une couche d'*azote R*, bouchez et agitez fortement pendant au moins 15 s. Transférez la couche supérieure dans un autre tube. Agitez encore 1 fois la couche méthanolique avec 1 mL de *triméthylpentane R*. Lavez les extraits de triméthylpentane combinés avec 2 fois 1 mL d'*eau R* et séchez sur du *sulfate de sodium anhydre R*. Préparez 3 solutions pour chaque échantillon.

*Solution à examiner (b).* Dissolvez 0,300 g d'échantillon à examiner dans une solution de *butylhydroxytoluène R* à 50 mg/L dans le *triméthylpentane R* et complétez à 10,0 mL avec la même solution. Procédez comme décrit pour la solution à examiner (a).

*Solution témoin ($a_1$).* Dissolvez environ 70,0 mg d'étalon interne et 90,0 mg d'*ester éthylique d'acide eicosapentaénoïque SCR* dans une solution de *butylhydroxytoluène R* à 50 mg/L dans le *triméthylpentane R* puis complétez à 10,0 mL avec la même solution. Si nécessaire, chauffez doucement (jusqu'à 60 °C) pour dissoudre l'étalon interne.

*Solution témoin ($a_2$).* Dissolvez 60,0 mg d'*ester éthylique d'acide docosahexaénoïque SCR* et environ 70,0 mg d'étalon interne dans une solution de *butylhydroxytoluène R* à 50 mg/L dans le *triméthylpentane R* puis complétez à 10,0 mL avec la même solution. Si nécessaire, chauffez doucement (jusqu'à 60 °C) pour dissoudre l'étalon interne.

Pour les solutions témoins ($a_1$) et ($a_2$), procédez ensuite comme décrit pour la solution à examiner (a), étape A, pour l'analyse des esters éthyliques. Pour l'analyse des triglycérides opérez de la même manière que pour la solution à examiner (a) (étape B) et préparez 3 solutions pour chaque échantillon.

*Solution témoin (b).* Dans une fiole jaugée de 10 mL, dissolvez 0,3 g d'*arachidate de méthyle R*, 0,3 g de *béhénate de méthyle R*, 0,3 g de *palmitate de méthyle R* et 0,3 g de *stéarate de méthyle R* dans une solution de *butylhydroxytoluène R* à 50 mg/L dans le *triméthylpentane R* et complétez à 10,0 mL avec la même solution.

*Solution témoin (c).* Dans une fiole jaugée de 10 mL, dissolvez un échantillon contenant environ 55,0 mg d'*ester méthylique d'acide docosahexaénoïque R* et environ 5,0 mg d'*ester méthylique d'acide tétracos-15-énoïque R* dans une solution de *butylhydroxytoluène R* à 50 mg/L dans le *triméthylpentane R* et complétez à 10,0 mL avec la même solution.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : $l$ = au moins 25 m, Ø = 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* à phase greffée (épaisseur du film 0,2 µm).

*Gaz vecteur* : *hydrogène pour chromatographie R* ou *hélium pour chromatographie R.*

*Débit* : 1 mL/min.

*Rapport de division* : 1:200, ou sans division avec contrôle de la température (il est nécessaire de diluer les solutions au 1/200 avec une solution de *butylhydroxytoluène R* à 50 mg/L dans le *triméthylpentane R* avant injection).

*Température* :

| | **Intervalle (min)** | **Température (°C)** |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 2 | 170 |
| | 2 - 25,7 | 170 → 240 |
| | 25,7 - 28 | 240 |
| Chambre à injection | | 250 |
| Détecteur | | 270 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL, à 2 reprises.

*Conformité du système* :

– dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b), la composition en pourcentage de surface augmente selon l'ordre suivant : palmitate de méthyle, stéarate de méthyle, arachidate de méthyle et béhénate de méthyle ; la différence entre le pourcentage de surface du palmitate de méthyle et celui du béhénate de méthyle est inférieure à 2,0 unités de pourcentage de surface ;
– *résolution* : au minimum 1,2 entre les pics dus à l'ester méthylique d'acide docosahexaénoïque et à l'ester méthylique d'acide tétracos-15-énoïque dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) ;
– dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a), les pics dus au tricosanoate de méthyle et à l'ester méthylique ou éthylique d'acide hénéicosapentaénoïque (C21:5), par comparaison avec le

chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b), sont nettement séparés (dans le cas contraire, un facteur de correction doit être appliqué).

Calculez les teneurs pour cent en EPA et en DHA à l'aide de l'expression suivante et en tenant compte de la teneur déclarée des substances de référence :

$$A_x \times \frac{A_{x,3}}{m_{x,3}} \times \frac{m_1}{A_1} \times \frac{m_{x,r}}{A_{x,r}} \times \frac{1}{m_2} \times C \times 100$$

$m_1$ = masse d'étalon interne dans la solution à examiner (a), en milligrammes,

$m_2$ = masse d'échantillon à examiner dans la solution à examiner (a), en milligrammes,

$m_{x,3}$ = masse d'étalon interne dans la solution témoin ($a_1$) (détermination de l'EPA) ou dans la solution témoin ($a_2$) (détermination du DHA), en milligrammes,

$m_{x,r}$ = masse d'*ester éthylique d'acide eicosapentaénoïque SCR* dans la solution témoin ($a_1$) ou d'*ester éthylique d'acide docosahexaénoïque SCR* dans la solution témoin ($a_2$), en milligrammes,

$A_x$ = surface du pic dû à l'ester de l'acide eicosapentaénoïque ou à l'ester de l'acide docosahexaénoïque dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a),

$A_{x,r}$ = surface du pic dû à l'ester de l'acide eicosapentaénoïque dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin ($a_1$) ou à l'ester de l'acide docosahexaénoïque dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin ($a_2$),

$A_1$ = surface du pic dû à l'étalon interne dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a),

$A_{x,3}$ = surface du pic dû à l'étalon interne dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin ($a_1$) (détermination de l'EPA) ou avec la solution témoin ($a_2$) (détermination du DHA),

$C$ = facteur de conversion entre ester éthylique et triglycérides,

$C$ = 1,00 pour les esters éthyliques,

$C$ = 0,954 pour l'EPA,

$C$ = 0,957 pour le DHA.

ACIDES OMÉGA-3 TOTAUX

A partir du dosage EPA et DHA, calculez la teneur pour cent en acides oméga-3 totaux à l'aide de l'expression suivante et en identifiant les pics à l'aide des chromatogrammes :

$$EPA + DHA + \frac{A_{n-3}\ (EPA + DHA)}{A_{\mathrm{EPA}} + A_{\mathrm{DHA}}}$$

*EPA* = teneur pour cent en EPA,

*DHA* = teneur pour cent en DHA,

$A_{n\text{-}3}$ = somme de la surface des pics dus aux esters de C18:3 n-3, C18:4 n-3, C20:4 n-3, C21:5 n-3 et C22:5 n-3 dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b),

$A_{\mathrm{EPA}}$ = surface du pic dû à l'ester d'EPA dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b),

$A_{\mathrm{DHA}}$ = surface du pic dû à l'ester de DHA dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b).

**01/2008:20430**

## 2.4.30. ÉTHYLÈNEGLYCOL ET DIÉTHYLÈNEGLYCOL DANS LES SUBSTANCES ÉTHOXYLÉES

*Les substances éthoxylées peuvent contenir des quantités variables d'éthylèneglycol et de diéthylèneglycol en raison du procédé de fabrication. La méthode décrite ci-après peut être utilisée pour le dosage de ces substances, en particulier dans les surfactants suivants : ricinoléate de macrogolglycérol, hydroxystéarate de macrogolglycérol, hydroxystéarate de macrogol 15, nonoxinol 9 et éther cétostéarique de macrogol.*

Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*).

*Solution d'étalon interne*. Dissolvez 30,0 mg de *1,2-pentanediol R* dans de l'*acétone R* et complétez à 30,0 mL avec le même solvant. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 20,0 mL avec de l'*acétone R*.

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,500 g de substance à examiner dans la solution d'étalon interne et complétez à 10,0 mL avec la même solution.

*Solution témoin (a)*. Mélangez 30,0 mg d'*éthylèneglycol R* à de l'*acétone R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec la solution d'étalon interne.

*Solution témoin (b)*. Préparez une solution de *diéthylèneglycol R* dont la concentration correspond à la limite prescrite, en utilisant les mêmes solvants que pour la préparation de la solution témoin (a).

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,

– *dimensions* : *l* = 30 m, Ø = 0,53 mm,

– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur du film 1 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 10 mL/min.

*Rapport de division* : 1:3.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 40 | 80 → 200 |
| | 40 - 45 | 200 → 230 |
| | 45 - 65 | 230 |
| Chambre à injection | | 250 |
| Détecteur | | 250 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 2 µL.

*Rétention relative* par rapport au 1,2-pentanediol (temps de rétention = environ 19 min) : éthylèneglycol = environ 0,7 ; diéthylèneglycol = environ 1,3.

**01/2008:20431**
**corrigé 6.1**

## 2.4.31. NICKEL DANS LES HUILES VÉGÉTALES HYDROGÉNÉES

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*AVERTISSEMENT : il convient de se familiariser avec les instructions de sécurité et d'utilisation fournies par les fabricants de récipients fermés pour minéralisation sous haute pression et de fours à micro-ondes de laboratoire.*

*La teneur en nickel des réactifs nitrate de magnésium R et dihydrogénophosphate d'ammonium R doit être contrôlée avant utilisation et leur teneur en nickel doit être prise en compte dans le calcul de la teneur en nickel de l'échantillon.*

*Solution à examiner.* Dans un récipient pour minéralisation résistant à de hautes pressions (parois en fluoropolymère ou en quartz), pesez 0,250 g ($m$) de substance à examiner, ajoutez 6,0 mL d'*acide nitrique exempt de nickel R* et 2,0 mL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R*. Préparez une solution à blanc dans les mêmes conditions. Disposez les récipients fermés dans un four à micro-ondes de laboratoire et procédez à la minéralisation en suivant un programme approprié, par exemple 1000 W pendant 40 min. Laissez refroidir les récipients avant de les ouvrir. Ajoutez 2,0 mL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R* et répétez l'étape de minéralisation. Laissez refroidir les récipients avant de les ouvrir. Transférez quantitativement le contenu de chaque récipient dans une fiole de 25 mL, ajoutez 0,5 mL d'une solution de *nitrate de magnésium R* à 10 g/L et 0,5 mL d'une solution de *dihydrogénophosphate d'ammonium R* à 100 g/L puis complétez à 25,0 mL avec de l'*eau pour chromatographie R* et mélangez.

*Solutions de référence.* Introduisez dans 4 fioles jaugées, respectivement 25 µL, 50 µL, 75 µL et 100 µL de *solution à 5 ppm de nickel (Ni) R*. A chacune des fioles, ajoutez 0,5 mL d'une solution de *nitrate de magnésium R* à 10 g/L, 0,5 mL d'une solution de *dihydrogénophosphate d'ammonium R* à 100 g/L, 6,0 mL d'*acide nitrique exempt de nickel R* puis complétez à 25,0 mL avec de l'*eau pour chromatographie R* et mélangez. Les solutions de référence obtenues contiennent respectivement 5 ng/mL, 10 ng/mL, 15 ng/mL et 20 ng/mL (ppb) de nickel.

*Solution de réglage du zéro.* Introduisez dans une fiole jaugée 1,0 mL d'une solution de *nitrate de magnésium R* à 10 g/L, 1,0 mL d'une solution de *dihydrogénophosphate d'ammonium R* à 100 g/L et 12,0 mL d'*acide nitrique exempt de nickel R* puis complétez à 50,0 mL avec de l'*eau pour chromatographie R* et mélangez.

*Mode opératoire.* Déterminez l'absorbance de chaque solution à 232,0 nm en utilisant un spectromètre d'absorption atomique muni d'un four de graphite approprié équipé d'un système de compensation d'un tube recouvert par pyrolyse et d'une lampe à cathode creuse au nickel. Maintenez la température de séchage du four à 120 °C pendant 35 s après une montée en température de 5 s ; la température de calcination à 1100 °C pendant 10 s après une montée en température de 30 s ; la température de refroidissement à 800 °C pendant 5 s ; après une descente en température de 5 s et la température d'atomisation à 2600 °C pendant 7 s. Utilisez la solution de réglage du zéro pour calibrer le zéro de l'appareil. A l'aide de la courbe d'étalonnage, déterminez les concentrations de la solution à examiner et de la solution à blanc d'après les absorbances obtenues. Si nécessaire, diluez la solution à examiner avec la solution de réglage du zéro de façon à obtenir une absorbance située entre les bornes de la courbe d'étalonnage.

Calculez la teneur en Ni en microgrammes par gramme (ppm) à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{c \times f}{m \times 40}$$

$c$ = concentration mesurée en Ni, en nanogrammes par millilitre,

$f$ = facteur de dilution de la solution à examiner,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**07/2010:20432**

## 2.4.32. CHOLESTÉROL TOTAL DANS LES HUILES RICHES EN ACIDES OMÉGA-3

*Cette méthode peut servir à la détermination quantitative de la somme du cholestérol libre et du cholestérol estérifié dans les produits issus d'huiles de poisson riches en acides oméga-3 (esters éthyliques ou triglycérides).*

Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*).

*Solution mère d'étalon interne.* Dissolvez 0,15 g de *(5α)-cholestane R* dans de l'*heptane R* et complétez à 50,0 mL avec le même solvant.

*Solution de travail d'étalon interne. Préparez la solution extemporanément.* Prélevez 1,0 mL de solution mère d'étalon interne et complétez à 10,0 mL avec de l'*heptane R*.

*Solution mère de cholestérol.* Dissolvez 30,0 mg de *cholestérol R* dans de l'*heptane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant. La solution est conditionnée en flacons pour chromatographie gazeuse et peut être conservée au congélateur pendant 6 mois.

*Solution de travail de cholestérol. Préparez la solution extemporanément.* Prélevez 1,0 mL de solution mère de cholestérol et complétez à 10,0 mL avec de l'*heptane R*.

*Solution d'α-tocophérol.* Prélevez 15,0 mg d'*α-tocophérol SCR* et complétez à 10,0 mL avec de l'*heptane R*.

*Solution à examiner.* Pesez 0,100 g de la substance à examiner dans un tube de quartz de 15 ml. Ajoutez 1,0 mL de solution mère ou de solution de travail d'étalon interne, selon la teneur supposée de l'huile en cholestérol (voir tableau 2.4.32.-1).

Evaporez à siccité sur un bloc chauffant à 50 °C sous un léger courant d'azote, en mélangeant. Ajoutez 0,5 mL d'une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 50 pour cent et 3,0 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Remplissez le tube d'*azote R* et bouchez-le. Chauffez à nouveau sur le bloc chauffant à 100 °C pendant 1 h, en agitant. Refroidissez pendant environ 10 min et ajoutez 6 mL d'*eau distillée R*. Extrayez avec 4 fois 2,5 mL d'*éther R*. Agitez à chaque fois pendant 1 min avec un mélangeur de type vortex. Transvasez la phase éthérée dans un grand tube à centrifugation ou une ampoule à décantation et lavez les extraits réunis avec 5 mL d'*eau distillée R*, en remuant minutieusement en un nombre donné de mouvements, par exemple 60. Eliminez la phase aqueuse, ajoutez à la phase éthérée 5 mL d'une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 3 pour cent et mélangez minutieusement en agitant le tube à 20 reprises. Eliminez la phase aqueuse, ajoutez à nouveau 5 mL d'*eau distillée R* et mélangez minutieusement en agitant à nouveau le tube à 20 reprises. Transvasez la phase éthérée dans un petit tube à centrifugation, en évitant tout transfert d'eau. S'il se forme une émulsion, ajoutez une petite quantité de *chlorure de sodium R* pour séparer les phases.

Evaporez à siccité sous un léger courant d'azote en chauffant avec précaution. Dissolvez le résidu dans 600 µL d'*acétate d'éthyle R*.

Selon la teneur supposée de l'huile en cholestérol, la solution est à nouveau diluée comme suit :

– teneur inférieure à 3 mg/g : prélevez 200 µL de solution et complétez à 2,0 mL avec de l'*acétate d'éthyle R*,

– teneur supérieure ou égale à 3 mg/g : prélevez 20 µL de solution et complétez à 2,0 mL avec de l'*acétate d'éthyle R*.

*Solution témoin (a).* Dans un tube de quartz de 15 ml, placez 1,0 mL de solution mère ou de solution de travail d'étalon interne et 1,0 mL de solution mère ou de solution de travail de cholestérol, selon la teneur supposée de l'huile en cholestérol (voir tableau 2.4.32.-1), et poursuivez comme décrit pour la solution à examiner, à partir de « Evaporez à siccité sur un bloc chauffant... ».

Tableau 2.4.32.-1. – *Préparation de la solution à examiner et des solutions témoins*

| | **Solution à examiner** | | **Solution témoin (a)** | | **Solution témoin (b)** |
|---|---|---|---|---|---|
| | inférieur à 3 mg/g | supérieur ou égal à 3 mg/g | inférieur à 3 mg/g | supérieur ou égal à 3 mg/g | |
| Solution mère d'étalon interne | – | + | – | + | + |
| Solution de travail d'étalon interne | + | – | + | – | – |
| Solution mère de cholestérol | – | – | – | + | + |
| Solution de travail de cholestérol | – | – | + | – | – |
| Solution d'α-tocophérol | – | – | – | – | + |

*Solution témoin (b).* Mélangez 1,0 mL de solution mère d'étalon interne, 1,0 mL de solution mère de cholestérol et 2,0 mL de solution d'α-tocophérol dans un ballon approprié. Evaporez à siccité sous un léger courant d'azote, en chauffant avec précaution ; dissolvez le résidu dans de l'*acétate d'éthyle R* et complétez à 50,0 mL avec le même solvant. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec de l'*acétate d'éthyle R*. La solution peut être conservée au congélateur pendant 6 mois.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 30 m, Ø = 0,25 mm (épaisseur du film 0,25 µm),

– *phase stationnaire* : *poly(diméthyl)(diphényl)siloxane R*.

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,3 mL/min.

*Température* :

| | **Intervalle (min)** | **Température (°C)** |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 1 | 170 |
| | 1 - 38 | 170 → 320 |
| | 38 - 40 | 320 |
| Chambre à injection | | 320 |
| Détecteur | | 300 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL.

*Conformité du système* : solution témoin (b) :

– *résolution* : au minimum 1,2 entre les pics dus au cholestérol et à l'α-tocophérol.

Calculez la teneur en cholestérol total, exprimée en milligrammes de cholestérol par gramme d'huile, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times F}{A_2 \times m_1 \times R}$$

$A_1$ = surface du pic dû au cholestérol dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû au (5α)-cholestane dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$m_1$ = masse de la substance à examiner dans la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse du (5α)-cholestane dans la solution mère d'étalon interne, en grammes,

$F$ = 20 pour les huiles à teneur supposée en cholestérol supérieure ou égale à 3 mg/g ; 2 pour les huiles à teneur supposée en cholestérol inférieure à 3 mg/g,

$R$ = facteur de réponse.

Calculez le facteur de réponse *R* à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_3 \times m_2}{A_4 \times m_3 \times 5}$$

$A_3$ = surface du pic dû au cholestérol dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),

$A_4$ = surface du pic dû au (5α)-cholestane dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),

$m_3$ = masse du cholestérol dans la solution mère de cholestérol, en grammes.

# 2.5. MÉTHODES DE DOSAGE

# 2.5. MÉTHODES DE DOSAGE

**01/2008:20501**

## 2.5.1. INDICE D'ACIDE

L'indice d'acide $I_A$ est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1 g de substance.

Dissolvez 10,00 g de la substance à examiner ou la quantité prescrite, ($m$ g), dans 50 mL d'un mélange à volumes égaux d'*éthanol à 96 pour cent R* et d'*éther de pétrole R3*. Si nécessaire, chauffez à environ 90 °C pour dissoudre la substance à examiner. Sauf indication contraire, le solvant doit être neutralisé au préalable par l'*hydroxyde de potassium 0,1 M* ou l'*hydroxyde de sodium 0,1 M* en présence de 0,5 mL de *solution de phénolphtaléine R1*. Après dissolution, titrez par l'*hydroxyde de potassium 0,1 M* ou l'*hydroxyde de sodium 0,1 M*. Si la préparation a été chauffée pour dissoudre la substance à examiner, maintenez la température à environ 90 °C pendant le titrage. Le titrage est terminé lorsque la couleur rose persiste pendant au moins 15 s ($n$ mL de réactif titrant).

$$I_{\mathrm{A}} = \frac{5,610n}{m}$$

**01/2008:20502**

## 2.5.2. INDICE D'ESTERS

L'indice d'esters $I_E$ est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la saponification des esters présents dans 1 g de substance. Il est calculé à partir de l'indice de saponification $I_S$ et de l'indice d'acide $I_A$ :

$$I_{\mathrm{E}} = I_{\mathrm{S}} - I_{\mathrm{A}}$$

**01/2008:20503**

## 2.5.3. INDICE D'HYDROXYLE

L'indice d'hydroxyle $I_{OH}$ est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation de l'acide qui se combine par acylation à 1 g de substance.

PROCÉDÉ A

Dans un ballon à acétylation de 150 mL muni d'un réfrigérant à air, introduisez une prise d'essai ($m$ g) conforme à la quantité indiquée dans le tableau 2.5.3-1 ci-après, sauf exception précisée. Ajoutez le volume de *solution d'anhydride acétique R1* indiqué dans le tableau 2.5.3-1 et adaptez le réfrigérant à air.

Chauffez le ballon au bain-marie pendant 1 h, en ayant soin de maintenir le niveau de l'eau à 2,5 cm environ au-dessus du niveau du liquide contenu dans le ballon. Retirez le ballon et laissez refroidir. Ajoutez par l'extrémité supérieure du réfrigérant 5 mL d'*eau R*. Si l'addition d'*eau R* produit un trouble, ajoutez la quantité suffisante de *pyridine R* pour le faire disparaître en notant le volume ajouté. Agitez, chauffez à nouveau le ballon au bain-marie pendant 10 min. Retirez le ballon et laissez refroidir. Rincez le réfrigérant et les parois du ballon avec 5 mL d'*alcool R* neutralisé au préalable en présence de *solution de phénolphtaléine R1*. Titrez par l'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M* ($n_1$ mL d'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M*) en présence de 0,2 mL de *solution de phénolphtaléine R1*. Effectuez un essai à blanc dans les mêmes conditions ($n_2$ mL d'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M*).

$$I_{\mathrm{OH}} = \frac{28,05\,(n_2 - n_1)}{m} + I_{\mathrm{A}}$$

Tableau 2.5.3.-1

| Indice présumé $I_{OH}$ | Prise d'essai (g) | Volume de réactif (mL) |
|---|---|---|
| 10 - 100 | 2,0 | 5,0 |
| 100 - 150 | 1,5 | 5,0 |
| 150 - 200 | 1,0 | 5,0 |
| 200 - 250 | 0,75 | 5,0 |
| 250 - 300 | 0,60 ou 1,20 | 5,0 ou 10,0 |
| 300 - 350 | 1,0 | 10,0 |
| 350 - 700 | 0,75 | 15,0 |
| 700 - 950 | 0,5 | 15,0 |

PROCÉDÉ B

Dans une fiole conique de 5 mL parfaitement sèche, munie d'un bouchon de verre rodé ou de matière plastique appropriée, introduisez la prise d'essai ($m$ g). Ajoutez 2,0 mL de *réactif à l'anhydride propionique R*, bouchez la fiole et agitez doucement jusqu'à dissolution. Après 2 h de repos, sauf indication contraire, débouchez et introduisez la fiole avec son contenu dans une fiole conique de 500 mL à large ouverture contenant 25,0 mL d'une solution d'*aniline R* à 9 g/L dans le *cyclohexane R* et 30 mL d'*acide acétique glacial R*. Agitez puis, après 5 min de repos, ajoutez 0,05 mL de *solution de violet cristallisé R* et titrez par l'*acide perchlorique 0,1 M* jusqu'à virage au vert émeraude ($n_1$ mL d'*acide perchlorique 0,1 M*). Effectuez un essai à blanc dans les mêmes conditions ($n_2$ mL d'*acide perchlorique 0,1 M*).

$$I_{\mathrm{OH}} = \frac{5,610\,(n_1 - n_2)}{m}$$

Afin de tenir compte de la présence éventuelle d'eau, déterminez-en la teneur ($y$ pour cent) par semi-microdosage (*2.5.12*).

L'indice d'hydroxyle est alors donné par l'équation :

$$I_{\mathrm{OH}} = (\text{indice trouvé}) - 31,1y$$

**01/2008:20504**

## 2.5.4. INDICE D'IODE

L'indice d'iode $I_I$ est le nombre qui exprime en grammes la quantité d'halogène, calculée en iode, susceptible d'être fixée, dans les conditions précisées, par 100 g de substance.

*Si la monographie n'indique pas le procédé à utiliser, le procédé A est mis en oeuvre. Tout passage du procédé A au procédé B fait l'objet d'une validation.*

PROCÉDÉ A

Sauf indication contraire, utilisez la prise d'essai correspondante indiquée dans le tableau 2.5.4-1.

Tableau 2.5.4.-1

| Indice présumé $I_I$ | Prise d'essai (g) |
|---|---|
| inférieur à 20 | 1,0 |
| 20 - 60 | 0,5 - 0,25 |
| 60 - 100 | 0,25 - 0,15 |
| supérieur à 100 | 0,15 - 0,10 |

Dans un récipient de 250 mL muni d'un bouchon rodé, sec ou rincé avec l'*acide acétique glacial R*, introduisez la prise d'essai ($m$ g) et dissolvez-la dans 15 mL de *chloroforme R* sauf indication contraire. Ajoutez très lentement 25,0 mL de *solution de bromure d'iode R*. Bouchez le récipient et placez-le à l'obscurité pendant 30 min, sauf indication contraire, en agitant fréquemment. Après addition de 10 mL d'une solution d'*iodure de potassium R* à 100 g/L et de 100 mL d'*eau R*, titrez

par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* en agitant énergiquement jusqu'à ce que la coloration jaune ait presque disparu. Ajoutez 5 mL de *solution d'amidon R* et continuez le titrage en agitant énergiquement et en ajoutant, goutte à goutte, le *thiosulfate de sodium 0,1 M* jusqu'à disparition de la coloration ($n_1$ mL de *thiosulfate de sodium 0,1 M*). Effectuez un essai à blanc dans les mêmes conditions ($n_2$ mL de *thiosulfate de sodium 0,1 M*).

$$I_{\mathrm{I}} = \frac{1,269\ (n_2 - n_1)}{m}$$

PROCÉDÉ B

Sauf indication contraire, utilisez la prise d'essai correspondante indiquée dans le tableau 2.5.4.-2.

Tableau 2.5.4.-2

| Indice présumé $I_{\mathrm{I}}$ | Masse (g) correspondant à un excès de 150 pour cent de ICl | Masse (g) correspondant à un excès de 100 pour cent de ICl | Solution de chlorure d'iode (mL) |
|---|---|---|---|
| <3 | 10 | 10 | 25 |
| 3 | 8,4613 | 10,5760 | 25 |
| 5 | 5,0770 | 6,3460 | 25 |
| 10 | 2,5384 | 3,1730 | 20 |
| 20 | 0,8461 | 1,5865 | 20 |
| 40 | 0,6346 | 0,7935 | 20 |
| 60 | 0,4321 | 0,5288 | 20 |
| 80 | 0,3173 | 0,3966 | 20 |
| 100 | 0,2538 | 0,3173 | 20 |
| 120 | 0,2115 | 0,2644 | 20 |
| 140 | 0,1813 | 0,2266 | 20 |
| 160 | 0,1587 | 0,1983 | 20 |
| 180 | 0,1410 | 0,1762 | 20 |
| 200 | 0,1269 | 0,1586 | 20 |

La masse de l'échantillon est telle qu'il y a un excès de *solution de chlorure d'iode R* de 50 pour cent à 60 pour cent de la quantité ajoutée, soit 100 pour cent à 150 pour cent de la quantité absorbée.

Dans un récipient de 250 mL muni d'un bouchon rodé, préalablement rincé avec l'*acide acétique glacial R* ou séché, introduisez la prise d'essai (*m* g) et dissolvez-la dans 15 mL d'un mélange à volumes égaux de *cyclohexane R* et d'*acide acétique glacial R* sauf indication contraire. Si nécessaire, faites préalablement fondre la substance (point de fusion supérieur à 50 °C). Ajoutez très lentement le volume de *solution de chlorure d'iode R* indiqué dans le tableau 2.5.4.-2. Bouchez le récipient et placez-le à l'obscurité pendant 30 min, sauf indication contraire, en agitant fréquemment. Ajoutez 10 mL d'une solution d'*iodure de potassium R* à 100 g/L et 100 mL d'*eau R*. Titrez par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* en agitant énergiquement jusqu'à ce que la coloration jaune ait presque disparu. Ajoutez 5 mL de *solution d'amidon R* et continuez le titrage en ajoutant, goutte à goutte, le *thiosulfate de sodium 0,1 M* jusqu'à disparition de la coloration ($n_1$ mL de *thiosulfate de sodium 0,1 M*). Effectuez un essai à blanc dans les mêmes conditions ($n_2$ mL de *thiosulfate de sodium 0,1 M*).

$$I_{\mathrm{I}} = \frac{1,269\ (n_2 - n_1)}{m}$$

**01/2008:20505**

# 2.5.5. INDICE DE PEROXYDE

L'indice de peroxyde $I_{\mathrm{P}}$ est le nombre qui exprime en milliéquivalents d'oxygène actif la quantité de peroxyde contenue dans 1000 g de substance, déterminé par les méthodes prescrites ci-après.

*Si la monographie n'indique pas le procédé à utiliser, le procédé A doit être mis en oeuvre. Tout passage du procédé A au procédé B doit faire l'objet d'une validation.*

PROCÉDÉ A

Dans une fiole conique de 250 mL à bouchon rodé, introduisez 5,00 g de la substance à examiner (*m* g). Ajoutez 30 mL d'un mélange de 2 volumes de *chloroforme R* et de 3 volumes d'*acide acétique glacial R*. Agitez jusqu'à dissolution de l'échantillon et ajoutez 0,5 mL de *solution saturée d'iodure de potassium R*. Agitez pendant exactement 1 min, puis ajoutez 30 mL d'*eau R*. Titrez par le *thiosulfate de sodium 0,01 M* ajouté lentement, sans cesser d'agiter énergiquement, jusqu'à ce que la coloration jaune ait presque disparu. Ajoutez 5 mL de *solution d'amidon R*. Continuez le titrage en agitant énergiquement jusqu'à disparition de la coloration ($n_1$ mL de *thiosulfate de sodium 0,01 M*). Effectuez un essai à blanc dans les mêmes conditions ($n_2$ mL de *thiosulfate de sodium 0,01 M*). Le titrage de l'essai à blanc ne doit pas consommer plus de 0,1 mL de *thiosulfate de sodium 0,01 M*.

$$I_{\mathrm{P}} = \frac{10\,(n_1 - n_2)}{m}$$

PROCÉDÉ B

*Effectuez les opérations à l'abri de la lumière actinique.*

Dans une fiole conique, introduisez 50 mL d'un mélange de 2 volumes de *triméthylpentane R* et de 3 volumes d'*acide acétique glacial R*, puis obturez à l'aide d'un bouchon. Agitez la fiole jusqu'à ce que la substance à examiner (*m* g ; tableau 2.5.5.-1) soit dissoute. A l'aide d'une pipette volumétrique appropriée, ajoutez 0,5 mL de *solution saturée d'iodure de potassium R* et obturez à l'aide d'un bouchon. Laissez reposer la solution pendant 60 ± 1 s, mélangez soigneusement en continu, puis ajoutez 30 mL d'*eau R*.

Titrez la solution par du *thiosulfate de sodium 0,01 M* ($V_1$ mL) ajouté progressivement et maintenez sous agitation énergique et constante jusqu'à disparition presque totale de la coloration jaune due à l'iode. Ajoutez 0,5 mL environ de *solution d'amidon R1* et poursuivez le titrage, en maintenant sous agitation constante, tout particulièrement vers le point de fin de titrage, afin de libérer tout l'iode de la couche de solvant. Ajoutez goutte à goutte la solution de thiosulfate de sodium jusqu'à ce que la coloration bleue commence à disparaître.

Tableau 2.5.5.-1

| Indice de peroxyde $I_{\mathrm{P}}$ attendu | Masse de substance à examiner (g) |
|---|---|
| 0 - 12 | 2,00 - 5,00 |
| 12 - 20 | 1,20 - 2,00 |
| 20 - 30 | 0,80 - 1,20 |
| 30 - 50 | 0,500 - 0,800 |
| 50 - 90 | 0,300 - 0,500 |

Selon le volume de *thiosulfate de sodium 0,01 M* utilisé, il peut être nécessaire d'utiliser du *thiosulfate de sodium 0,1 M*.

*NOTE* : étant donné la tendance du triméthylpentane à flotter à la surface du milieu aqueux et le temps nécessaire à l'obtention d'un mélange adéquat entre le solvant et le titrant aqueux – ce qui permet de libérer les dernières traces d'iode – la neutralisation de l'indicateur à l'amidon demande 15 s à 30 s d'attente lorsque l'indice de peroxyde est supérieur ou égal à 70. Il est recommandé d'utiliser du *thiosulfate de sodium 0,1 M*

pour des indices de peroxyde supérieurs à 150. Une faible quantité (0,5 pour cent à 1,0 pour cent (*m/m*)) d'émulsifiant à HLB élevé (par exemple polysorbate 60) peut être ajoutée au mélange afin de retarder la phase de séparation et de réduire le décalage lors de la libération de l'iode.

Effectuez un titrage à blanc ($V_0$ mL). Si cette détermination dépasse 0,1 mL de réactif titrant, remplacez les réactifs impurs et répétez le titrage.

$$I_{\mathrm{P}} = \frac{1000\,(V_1 - V_0)\,c}{m}$$

*c* = concentration de la solution de thiosulfate de sodium, en moles par litre.

**01/2008:20506**

## 2.5.6. INDICE DE SAPONIFICATION

L'indice de saponification $I_{\mathrm{S}}$ est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres et à la saponification des esters présents dans 1 g de substance.

Sauf indication contraire, utilisez la prise d'essai correspondante indiquée dans le tableau 2.5.6.-1.

Tableau 2.5.6.-1

| Indice présumé $I_{\mathrm{S}}$ | Prise d'essai (g) |
|---|---|
| <3 | 20 |
| 3 - 10 | 12 - 15 |
| 10 - 40 | 8 - 12 |
| 40 - 60 | 5 - 8 |
| 60 - 100 | 3 - 5 |
| 100 - 200 | 2,5 - 3 |
| 200 - 300 | 1 - 2 |
| 300 - 400 | 0,5 - 1 |

Dans une fiole de 250 mL de verre borosilicaté et munie d'un réfrigérant à reflux, introduisez la prise d'essai (*m* g). Ajoutez 25,0 mL d'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M* et quelques billes de verre. Adaptez le réfrigérant et chauffez à reflux pendant 30 min, sauf indication contraire. Ajoutez 1 mL de *solution de phénolphtaléine R1* et titrez immédiatement (alors que la solution est encore chaude) par l'*acide chlorhydrique 0,5 M* ($n_1$ mL d'*acide chlorhydrique 0,5 M*). Effectuez un essai à blanc dans les mêmes conditions ($n_2$ mL d'*acide chlorhydrique 0,5 M*).

$$I_{\mathrm{S}} = \frac{28,05\,(n_2 - n_1)}{m}$$

**01/2008:20507**

## 2.5.7. INSAPONIFIABLE

Le terme « insaponifiable » s'applique aux substances, non volatiles à 100-105 °C, obtenues par extraction, avec un solvant organique, d'une solution de la substance à examiner après saponification. Le résultat est calculé en pour cent *m/m*.

*Utilisez une verrerie rodée et non-graissée.*

Dans un ballon de 250 mL muni d'un réfrigérant à reflux, introduisez la prise d'essai (*m* g). Ajoutez 50 mL de *solution alcoolique d'hydroxyde de potassium 2 M R* et chauffez au bain-marie pendant 1 h en agitant par mouvements circulaires répétés. Après refroidissement à une température inférieure à 25 °C, transvasez le contenu du ballon dans une ampoule à décantation avec 100 mL d'*eau R* et agitez prudemment le liquide avec 3 fois 100 mL d'*éther exempt de peroxydes R*. Réunissez les liquides éthérés dans une autre ampoule à décantation contenant 40 mL d'*eau R*, agitez doucement pendant quelques minutes, laissez décanter et rejetez la phase aqueuse. Lavez la phase éthérée avec 2 fois 40 mL d'*eau R*. Lavez ensuite successivement avec 40 mL d'une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 30 g/L, puis avec 40 mL d'*eau R* ; répétez 3 fois cette opération. Lavez à plusieurs reprises la phase éthérée avec 40 mL d'*eau R* jusqu'à ce que la phase aqueuse ne soit plus alcaline à la phénolphtaléine. Transvasez la phase éthérée dans un ballon taré en lavant l'ampoule à décantation avec de l'*éther exempt de peroxydes R*. Distillez l'éther avec les précautions d'usage et ajoutez au résidu 6 mL d'*acétone R*. Eliminez soigneusement le solvant à l'aide d'un courant d'air. Séchez à 100-105 °C jusqu'à masse constante, laissez refroidir dans un dessiccateur et pesez (*a* g).

$$\text{Insaponifiable} = \frac{100a}{m}\ \text{pour cent}$$

Dissolvez le résidu dans 20 mL d'*alcool R*, neutralisés au préalable en présence de *solution de phénolphtaléine R*, et titrez par la *solution éthanolique d'hydroxyde de sodium 0,1 M*. Un volume de *solution éthanolique d'hydroxyde de sodium 0,1 M* supérieur à 0,2 mL dénote une séparation incomplète des 2 phases, le résidu pesé ne peut être considéré comme « insaponifiable ». En cas de doute, l'essai doit être répété.

**01/2008:20508**

## 2.5.8. DOSAGE DE L'AZOTE AMINÉ PRIMAIRE AROMATIQUE

Dissolvez la prise d'essai dans 50 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* ou autre réactif prescrit et ajoutez 3 g de *bromure de potassium R*. Refroidissez dans l'eau glacée et titrez par le *nitrite de sodium 0,1 M* ajouté lentement et en agitant.

Déterminez le terme de la réaction par électrométrie ou à l'aide de l'indicateur prescrit.

**01/2008:20509**

## 2.5.9. DOSAGE DE L'AZOTE APRÈS MINÉRALISATION PAR L'ACIDE SULFURIQUE

SEMI-MICRODOSAGE

Dans un matras à minéralisation, introduisez une prise d'essai (*m* g) contenant 2 mg environ d'azote. Ajoutez 4 g d'un mélange pulvérisé de 100 g de *sulfate dipotassique R*, de 5 g de *sulfate de cuivre R* et de 2,5 g de *sélénium R*, et 3 billes de verre. Entraînez les parcelles solides adhérant au col du matras par lavage avec 5 mL d'*acide sulfurique R* versés le long des parois. Mélangez le contenu par un mouvement circulaire. Obturez le matras de façon non hermétique, par exemple à l'aide d'une ampoule piriforme de verre soufflé, pour éviter une perte excessive d'acide sulfurique. Chauffez d'abord progressivement, puis augmentez la température jusqu'à forte ébullition avec condensation de l'acide sulfurique sur le col du matras ; des précautions doivent être prises pour éviter que la partie supérieure du matras soit surchauffée. Continuez le chauffage pendant 30 min, sauf indication contraire. Laissez refroidir, dissolvez la partie solide en ajoutant avec précaution 25 mL d'*eau R* au mélange, refroidissez de nouveau et transvasez dans un appareil à distiller par entraînement à la vapeur. Ajoutez 30 mL de *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R* et distillez immédiatement en faisant passer la vapeur dans le mélange. Recueillez 40 mL environ de distillat dans 20,0 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M* additionnés d'un volume d'*eau R* suffisant pour que la partie terminale du réfrigérant plonge dans le mélange. Vers la fin de la distillation, abaissez le récipient collecteur afin que la partie terminale du réfrigérant soit au-dessus de la surface du mélange. Veillez à ce que l'eau

condensée sur la surface extérieure du réfrigérant ne se mélange pas au contenu du récipient collecteur. Titrez le distillat par l'*hydroxyde de sodium 0,01 M* en présence d'*indicateur mixte au rouge de méthyle R* ($n_1$ mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*).

Répétez l'essai en remplaçant la substance à examiner par 50 mg environ de *glucose R* ($n_2$ mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*).

$$\text{Teneur en azote} = \frac{0,01401\,(n_2 - n_1)}{m} \text{ pour cent}$$

**01/2008:20510**

## 2.5.10. COMBUSTION DANS L'OXYGÈNE

Sauf indication contraire, la fiole à combustion est une fiole conique d'au moins 500 mL en verre borosilicaté. Son bouchon rodé est muni d'un porte-échantillon approprié en platine ou en platine iridié par exemple.

Pulvérisez finement la substance, placez la prise d'essai prescrite au centre d'un morceau de papier filtre de 30 mm sur 40 mm muni d'une languette de 10 mm environ de largeur et de 30 mm environ de longueur. Quand il est prescrit d'utiliser du papier imprégné de carbonate de lithium, humectez le centre du papier avec une solution saturée de *carbonate de lithium R* et desséchez à l'étuve avant l'emploi. Enveloppez la prise d'essai dans le papier et placez le tout dans le porte-échantillon. Dans la fiole, versez de l'*eau R* ou la solution absorbante indiquée, remplacez l'air par de l'oxygène à l'aide d'un tube plongeant jusqu'au niveau du liquide, mouillez l'ouverture de la fiole avec de l'*eau R* et obturez la fiole avec son bouchon. Allumez la languette par un procédé approprié en observant les précautions convenables. Maintenez fermement le bouchon sur la fiole pendant la combustion. Agitez vigoureusement pour obtenir la dissolution complète des produits de combustion. Refroidissez et, après 5 min environ, sauf indication contraire, débouchez la fiole en prenant les précautions nécessaires. Rincez les parties rodées, les parois de la fiole et le porte-échantillon avec de l'*eau R*. Réunissez les produits de combustion et les eaux de lavage, puis procédez selon les indications de la monographie.

**01/2008:20511**

## 2.5.11. TITRAGES COMPLEXOMÉTRIQUES

ALUMINIUM

Dans une fiole conique de 500 mL, introduisez 20,0 mL de la solution prescrite, 25,0 mL d'*édétate de sodium 0,1 M* et 10 mL d'un mélange à volumes égaux de solution d'*acétate d'ammonium R* à 155 g/L et d'*acide acétique dilué R*. Chauffez à ébullition pendant 2 min, puis refroidissez. Ajoutez 50 mL d'*éthanol R* et 3 mL d'une solution récemment préparée de *dithizone R* à 0,25 g/L dans l'*éthanol R*. Titrez l'excès d'édétate de sodium par le *sulfate de zinc 0,1 M* jusqu'à virage du bleu verdâtre au rouge-violet.

1 mL d'*édétate de sodium 0,1 M* correspond à 2,698 mg d'Al.

BISMUTH

Dans une fiole conique de 500 mL, introduisez la solution prescrite, complétez à 250 mL avec de l'*eau R* et, sauf indication contraire, ajoutez, goutte à goutte et en agitant, de l'*ammoniaque concentrée R* jusqu'à début d'opalescence, puis 0,5 mL d'*acide nitrique R*. Chauffez vers 70 °C jusqu'à ce que la solution soit à nouveau limpide. Ajoutez 50 mg environ de *mélange composé au xylénolorange R* et titrez par l'*édétate de sodium 0,1 M* jusqu'à virage du violet-rose au jaune.

1 mL d'*édétate de sodium 0,1 M* correspond à 20,90 mg de Bi.

CALCIUM

Dans une fiole conique de 500 mL, introduisez la solution prescrite et complétez à 300 mL avec de l'*eau R*. Ajoutez 6,0 mL de *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R* et 15 mg environ de *mélange composé au calcone-acide carboxylique R*. Titrez par l'*édétate de sodium 0,1 M* jusqu'à virage du violet au bleu franc.

1 mL d'*édétate de sodium 0,1 M* correspond à 4,008 mg de Ca.

MAGNÉSIUM

Dans une fiole conique de 500 mL, introduisez la solution prescrite et complétez à 300 mL avec de l'*eau R*. Ajoutez 10 mL de *solution tampon chlorure d'ammonium pH 10,0 R* et 50 mg environ de *mélange composé au mordant noir 11 R*. Chauffez à 40 °C environ, puis titrez à cette température par l'*édétate de sodium 0,1 M* jusqu'à virage du violet au bleu franc.

1 mL d'*édétate de sodium 0,1 M* correspond à 2,431 mg de Mg.

PLOMB

Dans une fiole conique de 500 mL, introduisez la solution prescrite et complétez à 200 mL avec de l'*eau R*. Ajoutez 50 mg environ de *mélange composé au xylénolorange R* et de l'*hexaméthylènetétramine R* jusqu'à coloration rose-violet. Titrez par l'*édétate de sodium 0,1 M* jusqu'à virage du rose-violet au jaune.

1 mL d'*édétate de sodium 0,1 M* correspond à 20,72 mg de Pb.

ZINC

Dans une fiole conique de 500 mL, introduisez la solution prescrite et complétez à 200 mL avec de l'*eau R*. Ajoutez 50 mg environ de *mélange composé au xylénolorange R* et de l'*hexaméthylènetétramine R* jusqu'à coloration rose-violet. Ajoutez 2 g d'*hexaméthylènetétramine R* en excès. Titrez par l'*édétate de sodium 0,1 M* jusqu'à virage du rose-violet au jaune.

1 mL d'*édétate de sodium 0,1 M* correspond à 6,54 mg de Zn.

**01/2008:20512**
**corrigé 6.0**

## 2.5.12. SEMI-MICRODOSAGE DE L'EAU

Le semi-microdosage de l'eau repose sur la réaction quantitative de l'eau avec un réactif contenant du dioxyde de soufre et de l'iode dans un milieu anhydre approprié, en présence d'une base qui présente une capacité tampon suffisante.

*Appareillage*

L'appareillage est constitué par une fiole de titrage munie de :

- 2 électrodes identiques de platine ;
- des ouvertures étanches permettant l'introduction du solvant et du réactif titrant ;
- une ouverture permettant l'introduction de l'air à travers un desséchant ;
- une ouverture pour l'introduction de la substance à examiner, munie d'un bouchon ou, pour l'introduction des liquides, d'un septum.

Des systèmes d'admission d'azote sec et d'aspiration du solvant peuvent également être installés.

Le titrage est effectué en suivant les instructions du fournisseur de l'instrument. Les précautions nécessaires sont prises pendant la détermination afin de préserver les réactifs et solvants de l'humidité atmosphérique. Le point de fin de titrage est déterminé au moyen de 2 électrodes indicatrices identiques reliées à une source électrique qui maintient entre les électrodes soit une intensité de courant constante soit un potentiel constant. Lors d'un titrage direct (procédé A), l'addition de titrant entraîne soit une diminution du potentiel lorsque l'intensité du courant est maintenue constante, soit une augmentation de l'intensité du courant lorsque le potentiel est maintenu constant, jusqu'à atteindre le point de fin de titrage. Les instruments munis d'un système de détection automatique du terme de la réaction sont couramment employés.

**Titre du réactif**. Dans la fiole de titrage, introduisez soit du *méthanol R*, desséché si nécessaire, soit le solvant recommandé par le fournisseur du réactif. Selon l'appareillage utilisé, réalisez le séchage de la cellule de mesure ou réalisez un

prétitrage. Introduisez une quantité adéquate d'eau sous une forme appropriée (*eau R* ou un matériau de référence certifié) puis effectuez le titrage en respectant le temps d'agitation nécessaire. L'équivalent en eau du réactif titrant n'est pas inférieur à 80 pour cent de celui indiqué par le fournisseur. Etablissez l'équivalent en eau du réactif titrant avant la première utilisation puis à des intervalles appropriés.

Sauf indication contraire, utilisez le Procédé A.

**Procédé A**. Dans la fiole de titrage, introduisez soit du *méthanol R*, soit le solvant indiqué dans la monographie, soit le solvant recommandé par le fournisseur du réactif titrant. Selon l'appareillage utilisé, réalisez le séchage de la cellule de mesure ou réalisez un prétitrage. Introduisez rapidement la prise d'essai et effectuez le titrage en respectant le temps d'extraction nécessaire.

**Procédé B**. Dans la fiole de titrage, introduisez soit du *méthanol R*, soit le solvant indiqué dans la monographie, soit le solvant recommandé par le fournisseur du réactif titrant. Selon l'appareillage utilisé, réalisez le séchage de la cellule de mesure ou réalisez un prétitrage. Introduisez rapidement la prise d'essai de la substance à examiner dans un état de division convenable. Ajoutez un volume, exactement mesuré, du titrant, suffisant pour avoir un excès d'environ 1 mL, ou le volume prescrit. Laissez reposer à l'abri de la lumière pendant 1 min ou le temps prescrit, en agitant de temps à autre. Titrez l'excès de réactif par du *méthanol R*, ou un autre solvant prescrit, contenant une quantité exactement connue d'eau.

**Conformité**. L'exactitude de la détermination à l'aide du réactif titrant choisi doit être vérifiée pour chaque substance à examiner. Le procédé ci-après, donné à titre d'exemple, convient pour des échantillons contenant 2,5-25 mg d'eau.

La teneur en eau de la substance à examiner est déterminée en utilisant le système réactif/solvant choisi. Par la suite, des quantités connues d'*eau R*, sous une forme appropriée, sont ajoutées de façon séquentielle (au minimum 5 additions) et la teneur cumulée en eau est déterminée après chaque addition. Calculez le pourcentage de la récupération $r$ en chaque point à l'aide de l'expression suivante :

$$r = 100\frac{W_2}{W_1}$$

$W_1$ = quantité d'eau ajoutée, en milligrammes,

$W_2$ = quantité d'eau obtenue, en milligrammes.

Calculez la droite de régression de l'eau cumulée déterminée par rapport à l'eau ajoutée. Calculez la pente $b$, l'ordonnée à l'origine $a$ et l'intersection $d$ entre la droite d'étalonnage extrapolée et l'axe des abscisses.

Calculez le pourcentage de récupération moyen $\overline{r}$. Calculez les pourcentages d'erreur $e_1$ et $e_2$ à l'aide des expressions suivantes :

$$e_1 = 100\frac{a - M}{M}$$

$$e_2 = 100\frac{|d| - M}{M}$$

$a$ = ordonnée à l'origine, en milligrammes d'eau,

$d$ = intersection avec l'axe des abscisses, en milligrammes d'eau,

$M$ = teneur en eau de la substance, en milligrammes d'eau.

Le système réactif/solvant est jugé acceptable si :

– $|e_1|$ et $|e_2|$ sont au maximum de 2,5 pour cent,

– $b$ se situe entre 0,975 et 1,025 (écart de ± 2,5 pour cent),

– $\overline{r}$ se situe entre 97,5 pour cent et 102,5 pour cent.

**01/2008:20513**

## 2.5.13. ALUMINIUM DANS LES VACCINS ADSORBÉS

Homogénéisez la préparation à examiner ; prélevez une quantité présumée contenir 5 mg à 6 mg d'aluminium et introduisez-la dans un matras à minéralisation de 50 mL. Ajoutez 1 mL d'*acide sulfurique R*, 0,1 mL d'*acide nitrique R* et quelques billes de verre. Chauffez la solution jusqu'à dégagement de vapeurs blanches épaisses. S'il se produit une carbonisation, ajoutez quelques gouttes d'*acide nitrique R* et maintenez l'ébullition jusqu'à décoloration. Laissez refroidir pendant quelques minutes, ajoutez avec précaution 10 mL d'*eau R* et faites bouillir jusqu'à obtention d'une solution limpide. Laissez refroidir, ajoutez 0,05 mL de *solution de méthylorange R* et neutralisez avec la *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R* (6,5 mL à 7 mL). S'il se produit un précipité, dissolvez-le en ajoutant, goutte à goutte, de l'*acide sulfurique dilué R*. Introduisez la solution dans une fiole conique de 250 mL, rincez le matras avec 25 mL d'*eau R*. Ajoutez 25,0 mL d'*édétate de sodium 0,02 M*, 10 mL de *solution tampon acétate pH 4,4 R*, quelques billes de verre et faites bouillir doucement pendant 3 min. Ajoutez 0,1 mL de *solution de pyridylazonaphtol R* et titrez la solution chaude par le *sulfate de cuivre 0,02 M* jusqu'à virage au brun-pourpre. Effectuez un essai à blanc en omettant le vaccin à examiner.

1 mL d'*édétate de sodium 0,02 M* correspond à 0,5396 mg de Al.

**01/2008:20514**

## 2.5.14. CALCIUM DANS LES VACCINS ADSORBÉS

*Toutes les solutions utilisées dans cet essai doivent être préparées à partir d'eau distillée R.*

Déterminez la teneur en calcium par spectrométrie d'émission atomique (*2.2.22, Procédé I*). Homogénéisez la préparation à examiner et prélevez 1,0 mL. Ajoutez 0,2 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et complétez à 3,0 mL avec de l'*eau R*. Mesurez l'absorbance à 620 nm.

**01/2008:20515**

## 2.5.15. PHÉNOL DANS LES IMMUNOSÉRUMS ET LES VACCINS

Homogénéisez la préparation à examiner. Prélevez un volume approprié, diluez avec de l'*eau R* de façon à obtenir une solution présumée contenir 15 µg de phénol par millilitre. Préparez une série de solutions de référence avec du *phénol R*, contenant respectivement 5 µg, 10 µg, 15 µg, 20 µg et 30 µg de phénol par millilitre. A 5 mL de la solution à examiner et à 5 mL de chacune des solutions de référence, ajoutez respectivement 5 mL de *solution tampon pH 9,0 R*, 5 mL de *solution d'aminopyrazolone R* et 5 mL de *solution de ferricyanure de potassium R*. Laissez reposer pendant 10 min et mesurez l'intensité de la coloration à 546 nm.

Etablissez la courbe d'étalonnage et calculez la concentration en phénol de la solution à examiner.

**01/2008:20516**

## 2.5.16. PROTÉINES DANS LES VACCINS POLYOSIDIQUES

*Solution à examiner.* Dans une fiole jaugée d'un volume approprié permettant d'obtenir une solution de concentration connue correspondant à 5 mg environ de polyoside sec par millilitre, transférez quantitativement le contenu d'un récipient et complétez au trait de jauge avec de l'*eau R*. Introduisez 1 mL de solution à examiner dans un tube en verre et ajoutez 0,15 mL

d'une solution d'*acide trichloracétique R* à 400 g/L. Agitez, laissez reposer pendant 15 min ; centrifugez à 5000 tr/min pendant 10 min et rejetez le surnageant. Ajoutez 0,4 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* au culot de centrifugation.

*Solutions de référence.* Introduisez 0,100 g d'*albumine bovine R* dans 100 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* (solution mère contenant l'équivalent de 1 g de protéines par litre). Prélevez 1 mL de la solution mère et complétez à 20 mL avec de l'*hydroxyde de sodium 0,1 M* (solution de référence (1) contenant l'équivalent de 50 mg de protéines par litre). Prélevez 1 mL de la solution mère et complétez à 4 mL avec de l'*hydroxyde de sodium 0,1 M* (solution de référence (2) contenant l'équivalent de 250 mg de protéines par litre). Dans 6 tubes de verre, introduisez respectivement 0,10 mL, 0,20 mL, 0,40 mL de la solution de référence (1) et 0,15 mL, 0,20 mL, 0,25 mL de la solution de référence (2). Complétez le volume de chaque tube à 0,40 mL avec de l'*hydroxyde de sodium 0,1 M*.

Préparez un essai à blanc à partir de 0,40 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M*.

A tous les tubes, ajoutez 2 mL de la *solution cupri-tartrique R3*. Agitez, laissez reposer pendant 10 min. Ajoutez à tous les tubes 0,2 mL d'un mélange à volumes égaux de *réactif phosphomolybdotungstique R* et d'*eau R*, préparé immédiatement avant l'emploi. Bouchez, agitez par retournement. Laissez reposer à l'obscurité 30 min. La coloration bleue reste stable pendant 60 min. Si nécessaire, centrifugez pour obtenir des solutions limpides.

Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 760 nm en utilisant comme liquide de compensation l'essai à blanc. Portez sur un graphique les absorbances des 6 solutions de référence en fonction des quantités de protéines qui y sont contenues, puis lisez sur la courbe d'étalonnage la quantité de protéines dans la solution à examiner.

**01/2008:20517**

## 2.5.17. ACIDES NUCLÉIQUES DANS LES VACCINS POLYOSIDIQUES

*Solution à examiner.* Dans une fiole jaugée d'un volume approprié permettant d'obtenir une solution de concentration connue correspondant à 5 mg environ de polyoside sec par millilitre, transférez quantitativement le contenu d'un récipient et complétez au trait de jauge avec de l'*eau R*.

Diluez la solution à examiner, si nécessaire, pour que la valeur de l'absorbance soit appropriée à l'instrument utilisé. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 260 nm en utilisant comme liquide de compensation l'*eau R*.

L'absorbance d'une solution d'acides nucléiques à 1 g/L mesurée à 260 nm est égale à 20.

**01/2008:20518**

## 2.5.18. PHOSPHORE DANS LES VACCINS POLYOSIDIQUES

*Solution à examiner.* Dans une fiole jaugée d'un volume approprié permettant d'obtenir une solution de concentration connue correspondant à 5 mg environ de polyoside sec par millilitre. Transférez quantitativement le contenu d'un récipient et complétez au trait de jauge avec de l'*eau R*. Diluez la solution à examiner de façon que le volume utilisé dans l'essai (1 mL) contienne 6 µg de phosphore environ. Introduisez 1,0 mL de solution à examiner dans un tube à combustion de 10 mL.

*Solutions de référence.* Dissolvez 0,2194 g de *phosphate monopotassique R* dans 500 mL d'*eau R* afin d'obtenir une solution contenant l'équivalent de 0,1 mg de phosphore par millilitre. Prélevez 5,0 mL de solution et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Dans 3 tubes à combustion, introduisez respectivement 0,5 mL, 1,0 mL et 2,0 mL de solution diluée.

Préparez un essai à blanc en introduisant dans un tube à combustion 2,0 mL d'*eau R*.

A tous les tubes, ajoutez 0,2 mL d'*acide sulfurique R* et chauffez dans un bain d'huile à 120 °C pendant 1 h, puis à 160 °C jusqu'à l'apparition de fumées blanches (1 h environ). Ajoutez 0,1 mL d'*acide perchlorique R* et chauffez à 160 °C jusqu'à disparition de la coloration (90 min environ). Refroidissez les tubes et ajoutez dans chacun d'eux 4 mL d'*eau R* et 4 mL de *réactif au molybdate d'ammonium R*. Chauffez dans un bain-marie à 37 °C pendant 90 min, puis refroidissez. Complétez le volume de chaque tube à 10,0 mL avec de l'*eau R*. La coloration bleue reste stable pendant plusieurs heures.

Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 820 nm en utilisant comme liquide de compensation l'essai à blanc. Portez sur un graphique les absorbances des 3 solutions de référence en fonction des quantités de phosphore qui y sont contenues, puis lisez sur la courbe d'étalonnage la quantité de phosphore dans la solution à examiner.

**01/2008:20519**

## 2.5.19. *O*-ACÉTYLE DANS LES VACCINS POLYOSIDIQUES

*Solution à examiner.* Dans une fiole jaugée d'un volume approprié permettant d'obtenir une solution de concentration connue correspondant à 5 mg environ de polyoside sec par millilitre, transférez quantitativement le contenu d'un récipient et complétez au trait de jauge avec de l'*eau R*. Diluez la solution à examiner de façon que les volumes testés contiennent 30 µg à 600 µg de chlorure d'acétylcholine (*O*-acétyle). Introduisez en double respectivement 0,3 mL, 0,5 mL et 1,0 mL de la solution diluée dans 6 tubes (3 témoins - 3 essais).

*Solutions de référence.* Introduisez 0,150 g de *chlorure d'acétylcholine R* dans 10 mL d'*eau R* (solution mère contenant 15 g de chlorure d'acétylcholine par litre). Diluez extemporanément 1 mL de la solution mère dans 50 mL d'*eau R* (solution de référence (1) contenant l'équivalent de 300 µg de chlorure d'acétylcholine par millilitre). Diluez extemporanément 1 mL de la solution mère dans 25 mL d'*eau R* (solution de référence (2) contenant l'équivalent de 600 µg de chlorure d'acétylcholine par millilitre). Dans 4 tubes introduisez respectivement 2 fois 0,1 mL (essai et témoin), 2 fois 0,4 mL (essai et témoin) de la solution de référence (1) et dans 4 autres tubes introduisez respectivement 2 fois 0,6 mL (essai et témoin) et 2 fois 1,0 mL (essai et témoin) de la solution de référence (2).

Préparez un essai à blanc à partir de 1 mL d'*eau R*.

Complétez le volume de chaque tube à 1 mL avec de l'*eau R*. Ajoutez 1,0 mL d'*acide chlorhydrique 4 M* à chacun des tubes témoins et à l'essai à blanc. A tous les tubes, ajoutez 2,0 mL de *solution alcaline d'hydroxylamine R*. Laissez en contact 2 min exactement. Ajoutez 1,0 mL d'*acide chlorhydrique 4 M* à chacun des tubes essais. A tous les tubes, ajoutez 1,0 mL d'une solution de *chlorure ferrique R* à 100 g/L dans l'*acide chlorhydrique 0,1 M*. Agitez vigoureusement les tubes bouchés pour éliminer les bulles.

Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 540 nm en utilisant comme liquide de compensation l'essai à blanc. Pour chaque essai, retranchez la valeur de l'absorbance du témoin lui correspondant. Portez sur un graphique les différences d'absorbance calculées des 4 solutions de référence en fonction des quantités de chlorure d'acétylcholine qui y sont contenues, puis lisez sur la courbe d'étalonnage la quantité de chlorure d'acétylchloline dans la solution à examiner pour chacun des volumes testés. Calculez la moyenne des 3 valeurs.

1 mole de chlorure d'acétylcholine (181,7 g) correspond à 1 mole d'*O*-acétyle (43,05 g).

**01/2008:20520**

## 2.5.20. HEXOSAMINES DANS LES VACCINS POLYOSIDIQUES

*Solution à examiner.* Dans une fiole jaugée d'un volume approprié permettant d'obtenir une solution de concentration connue correspondant à 5 mg environ de polyoside sec par millilitre, transférez quantitativement le contenu d'un récipient et complétez au trait de jauge avec de l'*eau R.* Diluez la solution à examiner de façon que les volumes testés contiennent de 125 µg à 500 µg de glucosamine (hexosamine). Introduisez 1,0 mL de la solution diluée dans un tube jaugé.

*Solutions de référence.* Introduisez 60 mg de *chlorhydrate de glucosamine R* dans 100 mL d'*eau R* (solution de référence contenant l'équivalent de 0,500 g de glucosamine par litre). Dans 4 tubes jaugés, introduisez respectivement 0,25 mL, 0,50 mL, 0,75 mL et 1,0 mL de la solution de référence.

Préparez un essai à blanc à partir de 1 mL d'*eau R.*

Complétez le volume de chaque tube à 1 mL avec de l'*eau R.* A tous les tubes, ajoutez 1 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 292 g/L de HCl. Placez les tubes bouchés au bain-marie pendant 1 h. Ramenez-les à température ambiante. A tous les tubes, ajoutez 0,05 mL d'une solution de *thymolphtaléine R* à 5 g/L dans l'*alcool R* ; ajoutez de la solution d'*hydroxyde de sodium R* à 200 g/L jusqu'à coloration bleue puis de l'*acide chlorhydrique 1 M* jusqu'à décoloration. Complétez le volume de chaque tube à 10 mL avec de l'*eau R* (hydrolysats neutralisés).

Dans une deuxième série de tubes jaugés de 10 mL, introduisez 1 mL de chacun des hydrolysats neutralisés. Ajoutez à chaque tube 1 mL de réactif acétylacétone (un mélange, préparé immédiatement avant l'emploi, de 1 volume d'*acétylacétone R* et de 50 volumes d'une solution de *carbonate de sodium anhydre R* à 53 g/L). Placez les tubes bouchés au bain-marie à 90 °C pendant 45 min. Ramenez-les à température ambiante. A chaque tube, ajoutez 2,5 mL d'*alcool R,* 1,0 mL de solution de diméthylaminobenzaldéhyde (immédiatement avant l'emploi, dissolvez 0,8 g de *diméthylaminobenzaldéhyde R* dans 15 mL d'*alcool R* et ajoutez 15 mL d'*acide chlorhydrique R*) puis complétez le volume de chacun d'eux à 10 mL avec de l'*alcool R.* Placez les tubes, bouchés et agités par retournement, à l'obscurité pendant 90 min. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 530 nm en utilisant comme liquide de compensation l'essai à blanc.

Portez sur un graphique les absorbances des 4 solutions de référence en fonction des quantités d'hexosamine qui y sont contenues, puis lisez sur la courbe d'étalonnage la quantité d'hexosamine dans la solution à examiner.

**01/2008:20521**

## 2.5.21. MÉTHYLPENTOSES DANS LES VACCINS POLYOSIDIQUES

*Solution à examiner.* Dans une fiole jaugée d'un volume approprié permettant d'obtenir une solution de concentration connue correspondant à 5 mg environ de polyoside sec par millilitre, transférez quantitativement le contenu d'un récipient et complétez au trait de jauge avec de l'*eau R.* Diluez la solution à examiner de façon que les volumes testés contiennent 2 µg à 20 µg de rhamnose (méthylpentoses). Introduisez respectivement 0,25 mL, 0,50 mL et 1,0 mL de la solution diluée dans 3 tubes.

*Solutions de référence.* Introduisez 0,100 g de *rhamnose R* dans 100 mL d'*eau R* (solution mère contenant l'équivalent de 1 g de méthylpentose par litre). Diluez extemporanément 1 mL de la solution mère dans 50 mL d'*eau R* (solution de référence contenant l'équivalent de 20 mg de méthylpentose par litre). Dans 5 tubes, introduisez respectivement 0,10 mL, 0,25 mL, 0,50 mL, 0,75 mL et 1,0 mL de la solution de référence.

Préparez un essai à blanc à partir de 1 mL d'*eau R.*

Complétez le volume de chaque tube à 1 mL avec de l'*eau R.* A tous les tubes maintenus dans un bain de glace, ajoutez goutte à goutte 4,5 mL d'un mélange refroidi de 1 volume d'*eau R* et de 6 volumes d'*acide sulfurique R,* sous agitation continue. Ramenez les tubes à température ambiante puis placez-les dans un bain-marie pendant quelques minutes. Ramenez-les à nouveau à température ambiante. Ajoutez à tous les tubes 0,10 mL d'une solution de *chlorhydrate de cystéine R* à 30 g/L préparée immédiatement avant l'emploi. Agitez. Laissez reposer pendant 2 h.

Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 396 nm et à 430 nm en utilisant comme liquide de compensation l'essai à blanc. Calculez pour chaque solution la différence entre l'absorbance mesurée à 396 nm et celle mesurée à 430 nm. Portez sur un graphique les différences d'absorbance des 5 solutions de référence en fonction des quantités de méthylpentose qui y sont contenues, puis lisez sur la courbe d'étalonnage la quantité de méthylpentose dans la solution à examiner pour chacun des volumes testés. Calculez la moyenne des 3 valeurs.

**01/2008:20522**

## 2.5.22. ACIDES URONIQUES DANS LES VACCINS POLYOSIDIQUES

*Solution à examiner.* Dans une fiole jaugée d'un volume approprié permettant d'obtenir une solution de concentration connue correspondant à 5 mg environ de polyoside sec par millilitre, transférez quantitativement le contenu d'un récipient et complétez au trait de jauge avec de l'*eau R.* Diluez la solution à examiner de façon que les volumes testés contiennent 4 µg à 40 µg d'acide glucuronique (acides uroniques). Introduisez respectivement 0,25 mL, 0,50 mL et 1,0 mL de la solution diluée dans 3 tubes.

*Solutions de référence.* Introduisez 50 mg de *glucuronate de sodium R* dans 100 mL d'*eau R* (solution mère contenant l'équivalent de 0,4 g d'acide glucuronique par litre). Diluez extemporanément 5 mL de la solution mère dans 50 mL d'*eau R* (solution de référence contenant l'équivalent de 40 mg d'acide glucuronique par litre). Dans 5 tubes, introduisez respectivement 0,10 mL, 0,25 mL, 0,50 mL, 0,75 mL et 1,0 mL de la solution de référence.

Préparez un essai à blanc à partir de 1 mL d'*eau R.*

Complétez le volume de chaque tube à 1 mL avec de l'*eau R.* A tous les tubes maintenus dans un bain de glace, ajoutez goutte à goutte 5,0 mL de *solution boratée R* sous agitation continue. Bouchez les tubes, puis placez-les dans un bain-marie pendant 15 min. Ramenez-les à température ambiante. A tous les tubes, ajoutez 0,20 mL d'une solution de *carbazol R* à 1,25 g/L dans l'*éthanol R.* Bouchez les tubes, puis placez-les dans un bain-marie pendant 15 min. Ramenez-les à température ambiante. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 530 nm en utilisant comme liquide de compensation l'essai à blanc.

Portez sur un graphique les absorbances des 5 solutions de référence en fonction des quantités d'acide glucuronique qui y sont contenues, puis lisez sur la courbe d'étalonnage la quantité d'acide glucuronique dans la solution à examiner pour chacun des volumes testés. Calculez la moyenne des 3 valeurs.

**01/2008:20523**

## 2.5.23. ACIDE SIALIQUE DANS LES VACCINS POLYOSIDIQUES

*Solution à examiner.* Dans une fiole jaugée d'un volume approprié permettant d'obtenir une solution de concentration connue correspondant à 250 µg environ de polyoside par millilitre, transférez quantitativement le contenu d'un ou

plusieurs récipients et complétez au trait de jauge avec de l'*eau R*. Introduisez à l'aide d'une seringue 4,0 mL de cette solution dans une cuve à ultrafiltration d'une capacité de 10 mL, conçue pour le passage de molécules dont la masse moléculaire relative est inférieure à 50 000. Rincez 2 fois la seringue avec de l'*eau R* et transvasez les eaux de lavage dans la cuve à ultrafiltration. Effectuez l'ultrafiltration sous *azote R* sous une pression de 150 kPa environ en agitant continuellement. Chaque fois que le volume du liquide dans la cuve est réduit à 1 mL, diluez-le avec de l'*eau R* jusqu'à obtention de 200 mL de filtrat, le volume restant dans la cuve étant de 2 mL environ. A l'aide d'une seringue, transvasez le liquide résiduel dans une fiole jaugée de 10 mL. Lavez la cuve avec 3 fois 2 mL d'*eau R*, transvasez les eaux de lavage dans la fiole jaugée et complétez à 10,0 mL avec de l'*eau R* (solution à examiner). Dans 2 tubes à essai, introduisez 2,0 mL de solution à examiner.

*Solutions de référence*. Utilisez les solutions de référence prescrites dans la monographie.

Préparez 2 séries de 3 tubes à essai. Ajoutez respectivement aux tubes de chaque série 0,5 mL, 1,0 mL et 1,5 mL d'une des solutions de référence correspondant au type de vaccin à examiner. Complétez le volume de chaque tube à 2,0 mL avec de l'*eau R*.

Préparez un essai à blanc en introduisant dans 2 tubes à essai 2,0 mL d'*eau R*.

A tous les tubes, ajoutez 5,0 mL de *réactif au résorcinol R*. Chauffez à 105 °C pendant 15 min, refroidissez dans l'eau froide et placez les tubes dans un bain d'eau glacée. A chaque tube, ajoutez 5 mL d'*alcool isoamylique R* et mélangez soigneusement, puis laissez les tubes dans le bain d'eau glacée pendant 15 min. Centrifugez les tubes, puis gardez-les dans le bain d'eau glacée jusqu'au moment de l'examen par spectrophotométrie d'absorption. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) du liquide surnageant, prélevé dans chaque tube, à 580 nm et à 450 nm en utilisant comme liquide de compensation de l'*alcool isoamylique R*. Prenez, comme absorbance à chacune des 2 longueurs d'onde, la moyenne des lectures obtenues avec 2 solutions identiques. Soustrayez de chacune de ces valeurs l'absorbance moyenne des 2 essais à blanc.

Portez sur un graphique la différence entre les absorbances à 580 nm et à 450 nm des solutions de référence en fonction de leur teneur en acide *N*-acétylneuraminique et lisez sur la courbe d'étalonnage la quantité d'acide *N*-acétylneuraminique (acide sialique) dans la solution à examiner.

**01/2011:20524**

## 2.5.24. DIOXYDE DE CARBONE DANS LES GAZ

Les gaz absorbent la lumière à une ou plusieurs longueurs d'onde spécifiques. Cette propriété est souvent utilisée pour effectuer une mesure hautement sélective de leur concentration.

**Description et principe de mesure**. La concentration du dioxyde de carbone dans d'autres gaz peut être déterminée au moyen d'un analyseur infrarouge.

L'analyseur infrarouge se compose généralement d'une source lumineuse émettant un rayonnement infrarouge à large spectre, d'un dispositif optique, d'une cellule de mesure et d'un détecteur. Le dispositif optique peut être placé soit avant soit après la cellule de mesure ; il est constitué d'un ou plusieurs filtres optiques que traverse le rayonnement à large spectre. Dans ce cas, le dispositif optique utilisé est dédié au dioxyde de carbone. Le faisceau lumineux traverse la cellule de mesure ; il peut aussi traverser une cellule de référence si l'analyseur en comporte une (elle est remplacée par un système électronique dans certains analyseurs).

La présence de dioxyde de carbone dans la cellule de mesure entraîne une absorption d'énergie dans le faisceau lumineux, selon la loi de Beer-Lambert, et par suite une variation du signal parvenant au détecteur. La comparaison de ce signal à un signal de référence génère un signal de sortie qui est fonction de la concentration de dioxyde de carbone. La linéarisation du signal généré permet d'obtenir la concentration en dioxyde de carbone. Pour éviter l'entrée de particules dans les capteurs pouvant entraîner des phénomènes optiques parasites, l'appareil est équipé d'un filtre approprié.

**Spécifications techniques requises**. Lorsqu'il est utilisé dans un essai limite, l'analyseur infrarouge satisfait aux spécifications techniques suivantes :

- *limite de détection* : (généralement définie par un rapport signal/bruit de 2) au maximum 20 pour cent de la concentration maximale admissible,
- *répétabilité* : écart type relatif au maximum de 10 pour cent de la concentration maximale admissible, déterminé sur 6 mesures,
- *linéarité* : au maximum 10 pour cent de la concentration maximale admissible.

Ces exigences doivent être satisfaites en présence des autres impuretés gazeuses de l'échantillon.

**01/2011:20525**

## 2.5.25. MONOXYDE DE CARBONE DANS LES GAZ

PROCÉDÉ I

*Appareillage*. L'appareillage (figure 2.5.25.-1) est constitué par les dispositifs suivants, disposés en série :

- un tube en U ($U_1$) contenant du *gel de silice anhydre R* imprégné de *trioxyde de chrome R* ;
- un flacon laveur ($F_1$) contenant 100 mL d'une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 400 g/L ;

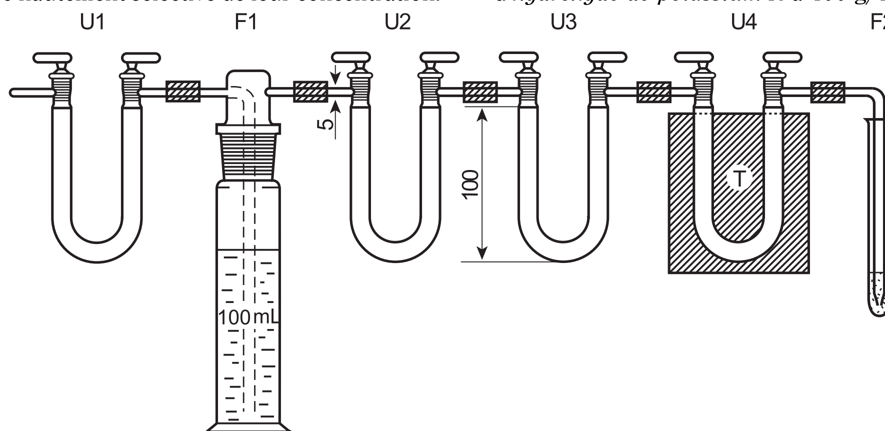



Figure 2.5.25.-1. - *Détermination du monoxyde de carbone*
*Dimensions en millimètres*

– un tube en U ($U_2$) contenant des pastilles d'*hydroxyde de potassium R* ;
– un tube en U ($U_3$) contenant du *pentoxyde de diphosphore R* dispersé sur de la pierre poreuse granulée et calcinée au préalable ;
– un tube en U ($U_4$) contenant 30 g d'*anhydride iodique recristallisé R* granulé, desséché au préalable à 200 °C et maintenu à 120 °C (*T*) pendant l'opération ; le réactif est disposé en disques de 1 cm d'épaisseur séparés par des disques de laine de verre de même épaisseur, de façon à former une colonne d'anhydride iodique de 5 cm de longueur effective ;
– un flacon à réaction ($F_2$) contenant 2,0 mL de *solution d'iodure de potassium R* additionnés de 0,15 mL de *solution d'amidon R*.

*Mode opératoire*. Purgez l'appareil avec 5,0 L d'*argon R* et, le cas échéant, faites disparaître la coloration bleue de la solution d'iodure par addition du volume strictement nécessaire d'une solution récemment préparée de *thiosulfate de sodium 0,002 M*. Poursuivez la purge jusqu'à ce que la valeur obtenue avec 5,0 L d'*argon R* ne dépasse pas 0,045 mL de *thiosulfate de sodium 0,002 M*. Faites passer ensuite dans l'appareil le gaz à examiner en utilisant le volume et le débit indiqués. Recueillez les dernières traces d'iode libéré dans le flacon à réaction en purgeant l'appareil avec 1,0 L d'*argon R*. Titrez l'iode libéré par le *thiosulfate de sodium 0,002 M*. Faites un essai à blanc en utilisant le volume prescrit d'*argon R*. La différence entre les volumes de *thiosulfate de sodium 0,002 M* utilisés dans les 2 titrages n'est pas supérieure à la limite indiquée.

PROCÉDÉ II

Les gaz absorbent la lumière à une ou plusieurs longueurs d'onde spécifiques. Cette propriété est souvent utilisée pour effectuer une mesure hautement sélective de leur concentration.

**Description et principe de mesure**. La concentration du monoxyde de carbone dans d'autres gaz peut être déterminée au moyen d'un analyseur infrarouge.

L'analyseur infrarouge se compose généralement d'une source lumineuse émettant un rayonnement infrarouge à large spectre, d'un dispositif optique, d'une cellule de mesure et d'un détecteur. Le dispositif optique peut être placé soit avant soit après la cellule de mesure ; il est constitué d'un ou plusieurs filtres optiques que traverse le rayonnement à large spectre. Dans ce cas, le dispositif optique utilisé est dédié au monoxyde de carbone. Le faisceau lumineux traverse la cellule de mesure, il peut aussi traverser une cellule de référence si l'analyseur en comporte une (elle est remplacée par un système électronique dans certains analyseurs).

La présence de monoxyde de carbone dans la cellule de mesure entraîne une absorption d'énergie dans le faisceau lumineux, selon la loi de Beer-Lambert, et par suite une variation du signal parvenant au détecteur. La comparaison de ce signal à un signal de référence génère un signal de sortie qui est fonction de la concentration de monoxyde de carbone. La linéarisation du signal généré permet d'obtenir la concentration en monoxyde de carbone. Pour éviter l'entrée de particules dans les capteurs pouvant entraîner des phénomènes optiques parasites, l'appareil est équipé d'un filtre approprié.

**Spécifications techniques requises**. Lorsqu'il est utilisé dans un essai limite, l'analyseur infrarouge satisfait aux spécifications techniques suivantes :
– *limite de détection* : (généralement définie par un rapport signal/bruit de 2) au maximum 20 pour cent de la concentration maximale admissible,
– *répétabilité* : écart type relatif au maximum de 10 pour cent de la concentration maximale admissible, déterminé sur 6 mesures,
– *linéarité* : au maximum 10 pour cent de la concentration maximale admissible.

Ces exigences doivent être satisfaites en présence des autres impuretés gazeuses de l'échantillon.

**01/2008:20526**

## 2.5.26. MONOXYDE D'AZOTE ET DIOXYDE D'AZOTE DANS LES GAZ

Le monoxyde et le dioxyde d'azote sont déterminés dans les gaz à l'aide d'un analyseur à chimiluminescence (figure 2.5.26-1).

L'appareil comporte :
– un dispositif de filtration, de contrôle et de régulation du débit de gaz à examiner,
– un convertisseur qui permet de réduire le dioxyde d'azote en monoxyde d'azote, pour déterminer la teneur en monoxyde d'azote et en dioxyde d'azote. L'efficacité du convertisseur doit être vérifiée avant l'utilisation,
– un système de génération d'ozone à débit contrôlé. L'ozone est produit par décharge électrique à haute tension entre 2 électrodes. L'ozoneur est alimenté par de l'oxygène pur ou par de l'air ambiant déshydraté. La concentration en ozone obtenue doit être en fort excès par rapport à la teneur maximale en oxydes d'azote susceptible d'être mesurée,
– une chambre de réaction entre le monoxyde d'azote et l'ozone,

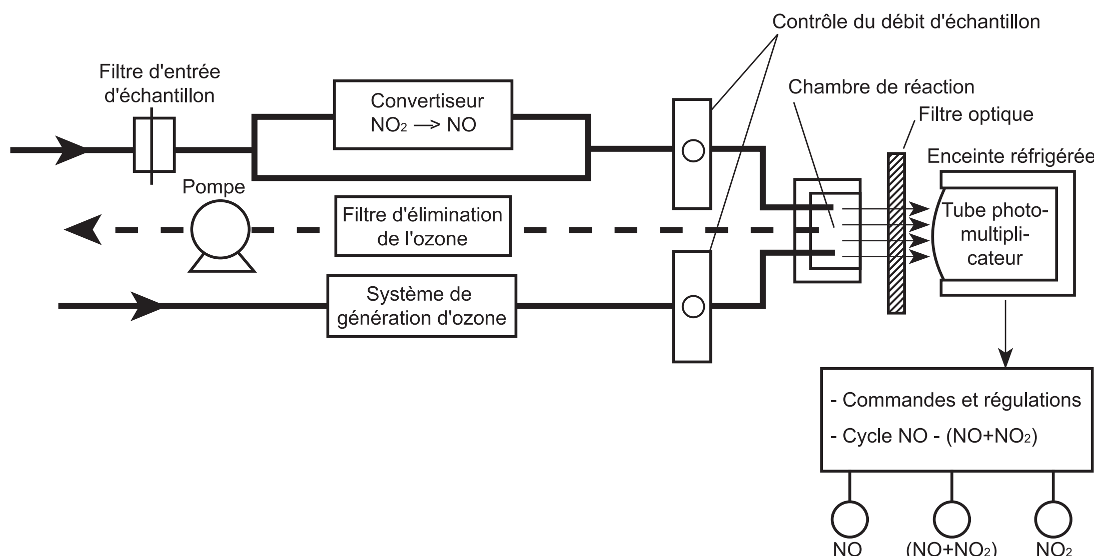



Figure 2.5.26.-1. – *Analyseur à chimiluminescence*

– un système de détection du rayonnement lumineux émis à la longueur d'onde de 1,2 µm, constitué par un filtre optique sélectif et un tube photomultiplicateur.

01/2009:20527

# 2.5.27. OXYGÈNE DANS LES GAZ

L'oxygène dans les gaz est déterminé à l'aide d'un analyseur paramagnétique.

Le principe de la méthode est fondé sur la sensibilité paramagnétique élevée de la molécule d'oxygène. L'oxygène exerce une forte interaction sur les champs magnétiques qui est mesurée électroniquement, amplifiée et convertie en une lecture de la concentration en oxygène. La mesure de la concentration en oxygène dépend de la pression et de la température : si l'analyseur n'est pas automatiquement compensé pour des variations de température et de pression, il doit être étalonné immédiatement avant l'emploi. Comme l'effet paramagnétique de l'oxygène est linéaire, l'instrument doit avoir une échelle appropriée permettant des lectures de 0,1 pour cent ou mieux.

*Etalonnage de l'instrument.* Procédez aux réglages de la manière suivante :

– réglez le zéro en faisant passer dans l'instrument de l'*azote R1* jusqu'à une lecture stable,
– réglez l'échelle à 100 pour cent en faisant passer dans l'instrument de l'*oxygène R* au même débit que celui utilisé pour l'*azote R1* jusqu'à une lecture stable,

*Dosage.* Faites passer dans l'instrument du gaz à examiner, à un débit constant, jusqu'à une lecture stable. Enregistrez la concentration en oxygène du gaz à examiner.

01/2008:20528

# 2.5.28. TENEUR EN EAU DANS LES GAZ

La teneur en eau dans les gaz est déterminée à l'aide d'un hygromètre électrolytique tel que décrit ci-après.

La cellule de mesure est constituée par un film mince de pentoxyde de diphosphore, déposé entre 2 fils de platine spiralés qui jouent le rôle d'électrodes. La vapeur d'eau présente dans le gaz à examiner est absorbée par le pentoxyde de diphosphore, qui se transforme en acide phosphorique, conducteur de l'électricité. Une tension continue, appliquée entre les électrodes, provoque l'électrolyse de l'eau et la régénération du pentoxyde de diphosphore. Le courant électrique ainsi généré, proportionnel à la teneur en eau dans le gaz à examiner, est mesuré. L'appareil est auto-étalonnable, puisqu'il met en application la loi de Faraday.

Effectuez un prélèvement du gaz à examiner. Laissez le gaz se stabiliser à température ambiante. Balayez la cellule sans interruption jusqu'à obtention d'une valeur stable. Mesurez la teneur en eau dans le gaz à examiner en veillant à ce que la température soit constante dans l'ensemble du dispositif utilisé pour l'introduction du gaz dans l'appareil.

01/2008:20529

# 2.5.29. DIOXYDE DE SOUFRE

Dans la fiole (*A*) (voir figure 2.5.29.-1), introduisez 150 mL d'*eau R*. Faites passer un courant de *dioxyde de carbone R* à travers l'appareillage pendant 15 min à un débit de 100 mL/min. A 10 mL de *solution diluée de peroxyde d'hydrogène R*, ajoutez 0,15 mL d'une solution de *bleu de bromophénol R* à 1 g/L dans de l'*alcool à 20 pour cent V/V R*. Ajoutez de l'*hydroxyde de sodium 0,1 M* jusqu'à obtention d'une couleur bleu-violet, sans dépasser le point de fin de titrage. Introduisez la solution dans le tube (*D*). Sans interrompre le courant de dioxyde de carbone, enlevez l'entonnoir (*B*) et introduisez à travers l'ouverture du ballon, dans la fiole (*A*), 25,0 g de substance à examiner (*m* g) à l'aide de 100 mL d'*eau R*. Ajoutez à travers l'entonnoir 80 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et chauffez à ébullition pendant 1 h. Ouvrez le robinet de l'entonnoir, arrêtez le courant de dioxyde de carbone ainsi que le chauffage et la réfrigération. Transvasez le contenu du tube avec un peu d'*eau R* dans une fiole conique de 200 mL à large col. Chauffez au bain-marie pendant 15 min et laissez refroidir. Ajoutez 0,1 mL d'une solution de *bleu de bromophénol R* à 1 g/L dans l'*alcool à 20 pour cent V/V R*. Titrez par l'*hydroxyde de sodium 0,1 M* jusqu'à virage du jaune au bleu-violet ($V_1$ mL). Procédez à un titrage à blanc ($V_2$ mL).

Calculez la teneur en dioxyde de soufre en parties par million à l'aide de l'expression :

$$32\,030 \times (V_1 - V_2) \times \frac{n}{m}$$

$n$ = molarité de la solution d'hydroxyde de sodium utilisée comme titrant.

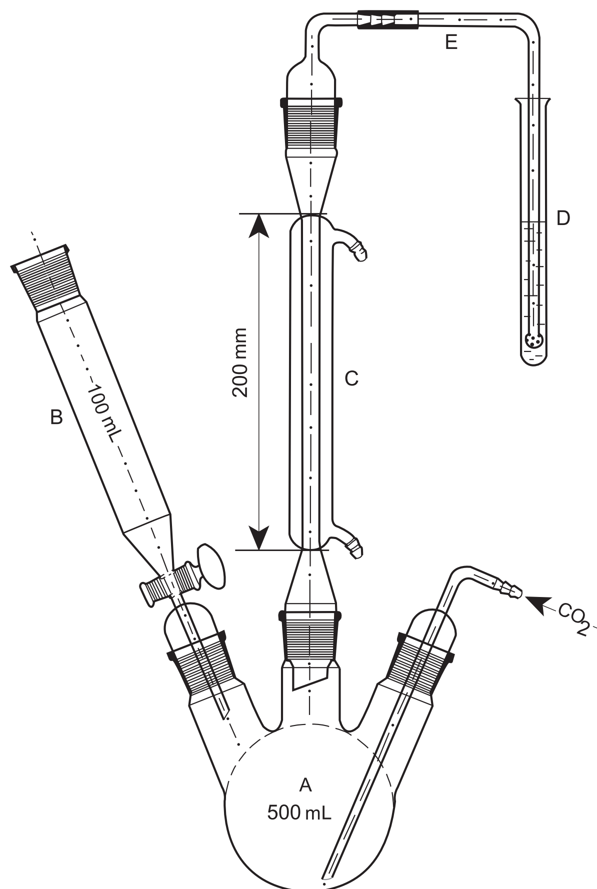



Figure 2.5.29.-1. – *Appareil pour la détermination du dioxyde de soufre*

01/2008:20530

# 2.5.30. SUBSTANCES OXYDANTES

Dans une fiole conique de 125 mL à bouchon de verre, introduisez 4,0 g de substance à examiner et ajoutez 50,0 mL d'*eau R*. Bouchez et agitez par un mouvement rotatoire pendant 5 min. Transférez dans un tube à centrifugation de 50 mL à bouchon de verre, puis centrifugez. Transvasez 30,0 mL du surnageant limpide dans une fiole conique de 125 mL à bouchon de verre. Ajoutez 1 mL d'*acide acétique glacial R* et 0,5 g à 1,0 g d'*iodure de potassium R*. Bouchez, agitez et laissez reposer à l'obscurité pendant 25 min à 30 min. Ajoutez 1 mL de *solution d'amidon R* et titrez par le *thiosulfate de sodium 0,002 M* jusqu'à disparition de la coloration de

l'iode. Effectuez un essai à blanc. Le virage de l'indicateur ne nécessite pas plus de 1,4 mL de *thiosulfate de sodium 0,002 M* (0,002 pour cent, calculé en $H_2O_2$).

1 mL de *thiosulfate de sodium 0,002 M* correspond à 34 µg de substances oxydantes, calculées en peroxyde d'hydrogène.

**01/2008:20531**

## 2.5.31. RIBOSE DANS LES VACCINS POLYOSIDIQUES

*Solution à examiner.* Dans une fiole jaugée d'un volume approprié permettant d'obtenir une solution de concentration connue correspondant à 5 mg environ de polyoside sec par millilitre, transférez quantitativement le contenu d'un récipient et complétez au trait de jauge avec de l'*eau R*. Diluez la solution à examiner de façon que les volumes testés contiennent 2,5 µg à 25 µg de ribose. Introduisez respectivement 0,20 mL et 0,40 mL de la solution diluée en triple dans des tubes.

*Solutions de référence.* Dissolvez 25 mg de *ribose R* dans de l'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant (solution mère à 0,25 g/L de ribose). Diluez extemporanément 1 mL de la solution mère à 10,0 mL avec de l'*eau R* (solution de référence à 25 mg/L de ribose). Dans 6 tubes, introduisez respectivement 0,10 mL, 0,20 mL, 0,40 mL, 0,60 mL, 0,80 mL et 1,0 mL de la solution de référence.

Préparez un essai à blanc à partir de 2 mL d'*eau R*.

Complétez le volume de chaque tube à 2 mL avec de l'*eau R*. Agitez. A tous les tubes ajoutez 2 mL d'une solution de *chlorure ferrique R* à 0,5 g/L dans l'*acide chlorhydrique R*. Agitez. Ajoutez à chaque tube 0,2 mL d'une solution d'*orcinol R* à 100 g/L dans de l'*éthanol R*. Placez les tubes dans un bain-marie pendant 20 min puis placez-les dans de l'eau glacée. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 670 nm en utilisant comme liquide de compensation l'essai à blanc. Portez sur un graphique les absorbances des 6 solutions de référence en fonction des quantités de ribose qui y sont contenues, puis lisez sur la courbe d'étalonnage la quantité de ribose dans la solution à examiner pour chacun des volumes testés. Calculez la moyenne des 3 valeurs.

**01/2008:20532**

## 2.5.32. MICRODOSAGE DE L'EAU

PRINCIPE

Le titrage coulométrique de l'eau repose sur la réaction quantitative de l'eau avec du dioxyde de soufre et de l'iode dans un milieu anhydre, en présence d'une base qui présente une capacité tampon suffisante. Par opposition à la méthode volumétrique décrite sous (*2.5.12*), l'iode est produit de manière électrochimique dans la cuve, par oxydation d'iodure. L'iode produit au niveau de l'anode réagit immédiatement avec l'eau et le dioxyde de soufre contenus dans la cuve. La quantité d'eau contenue dans la substance est directement proportionnelle à la quantité d'électricité jusqu'au point de fin de titrage. Lorsque toute l'eau contenue dans la cuve est consommée, le point de fin de titrage est atteint ; il apparaît alors un excès d'iode. 1 mole d'iode correspond à 1 mole d'eau, une quantité d'électricité de 10,71 C correspond à 1 mg d'eau.

L'humidité est éliminée du système par pré-électrolyse. Des dosages individuels peuvent être effectués successivement, dans le même mélange de réactifs, à condition que :

– chaque composant du mélange à examiner soit compatible avec les autres composants,
– aucune autre réaction ne se produise,
– le volume et la capacité de réaction à l'eau du réactif électrolytique utilisé soient suffisants.

Le titrage coulométrique est uniquement destiné à la détermination quantitative de faibles quantités d'eau (la quantité recommandée est comprise entre 10 µg et 10 mg).

L'exactitude et la précision de la méthode sont très fortement tributaires de la mesure dans laquelle l'humidité atmosphérique est exclue du système. La dérive de la ligne de base permet de contrôler le système.

APPAREILLAGE

Chaque instrument comporte une cuve à réaction, des électrodes et un agitateur magnétique. La cuve consiste en un grand compartiment anode et un compartiment cathode, plus petit. En fonction de la conception de l'électrode, les deux compartiments peuvent être séparés par un diaphragme. Chaque compartiment contient une électrode de platine. Les échantillons liquides ou solubilisés sont introduits au travers d'une membrane, à l'aide d'une seringue. En guise d'alternative, il est également possible d'avoir recours à une technique d'évaporation par laquelle l'échantillon est chauffé dans un tube (étuve), puis l'eau d'évaporation est dirigée vers la cuve au moyen d'un courant de gaz sec et inerte. L'introduction d'échantillons solides est à éviter. Si ce procédé s'avère néanmoins nécessaire, il s'effectue par une chambre pouvant être obturée. Afin d'éviter l'introduction de l'humidité atmosphérique, il est conseillé de prendre des mesures appropriées, en travaillant par exemple dans une boîte à gants sous atmosphère de gaz sec et inerte. Le processus analytique est contrôlé par un instrument approprié qui affiche également les résultats.

MODE OPÉRATOIRE

Remplissez les compartiments de la cuve avec du *réactif électrolytique pour microdosage de l'eau R* conformément aux instructions du fabricant et effectuez le titrage coulométrique jusqu'au point de fin de titrage stable. Introduisez la quantité prescrite de substance à examiner dans la cuve, agitez pendant 30 s, sauf indication contraire de la monographie, et effectuez de nouveau le titrage jusqu'au point de fin de titrage stable. En cas d'utilisation d'une étuve, introduisez la prise d'essai dans un tube et chauffez. Le titrage commence après l'évaporation de l'eau contenue dans l'échantillon et son transfert vers la cuve de titrage. Lisez la valeur à la sortie de l'instrument et calculez si nécessaire la teneur pour cent présente dans la substance. Effectuez un titrage à blanc, s'il est adapté au type et à la préparation de l'échantillon.

VÉRIFICATION DE L'EXACTITUDE

Entre deux titrages successifs ajoutez une quantité d'eau exactement pesée dans le même ordre de grandeur que la quantité d'eau dans l'échantillon, soit sous forme d'*eau R* soit sous forme de *solution étalon pour microdosage de l'eau R*, puis effectuez le titrage coulométrique. Le taux de recouvrement se situe dans un intervalle de 97,5 pour cent à 102,5 pour cent pour une quantité de $H_2O$ ajoutée de 1000 µg et de 90,0 pour cent à 110,0 pour cent pour une quantité ajoutée de $H_2O$ ajoutée de 100 µg.

**01/2008:20533**
**corrigé 6.0**

## 2.5.33. PROTÉINES TOTALES

De nombreuses méthodes de dosage décrites dans ce chapitre peuvent être réalisées à l'aide de kits disponibles dans le commerce.

MÉTHODE 1

Les protéines en solution absorbent la lumière ultraviolette à une longueur d'onde de 280 nm, en raison de la présence dans leur structure d'acides aminés aromatiques dont, principalement, la tyrosine et le tryptophane. Cette propriété peut être utilisée pour doser les protéines. Si le tampon utilisé pour dissoudre la protéine possède une absorbance élevée, par rapport à l'eau, il introduit une interférence, qu'il est possible de prévenir en utilisant le tampon comme liquide de compensation. Toutefois, si l'absorbance associée à cette interférence est élevée, le résultat des mesures peut être compromis. A faibles

2. Méthodes analytiques

concentrations, la protéine adsorbée sur la cuve peut entraîner une diminution significative de la teneur protéique en solution. Il est possible de prévenir ce phénomène en préparant des échantillons à teneur élevée ou en utilisant un détergent non ionique pendant la préparation.

*Solution à examiner*. Dissolvez une quantité appropriée de la substance à examiner dans le tampon spécifié de façon à obtenir une solution dont la concentration protéique se situe entre 0,2 mg/mL et 2 mg/mL.

*Solution témoin*. Préparez une solution d'une substance de référence appropriée correspondant à la protéine à doser, dans le même tampon que celui utilisé pour la solution à examiner, et de façon à obtenir la même concentration.

**Mode opératoire**. Maintenez la solution à examiner, la solution témoin, et le liquide de compensation à la même température pendant la durée de l'essai. Déterminez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner et de la solution témoin à 280 nm, dans des cuves en quartz, en utilisant le tampon spécifié comme liquide de compensation. Pour l'exactitude des résultats, la réponse doit être linéaire dans l'intervalle des concentrations protéiques à doser.

**Diffusion de la lumière**. La diffusion de la lumière par l'échantillon à examiner peut affecter la précision du dosage des protéines. Si les protéines en solution forment des particules dont la taille est du même ordre de grandeur que la longueur d'onde du faisceau de mesure (250-300 nm), la diffusion du faisceau lumineux se traduit par une augmentation de l'absorbance apparente de l'échantillon à examiner. Pour calculer la contribution de cet effet de diffusion à l'absorbance lue à 280 nm, déterminez l'absorbance de la solution à examiner à plusieurs longueurs d'onde (320 nm, 325 nm, 330 nm, 335 nm, 340 nm, 345 nm et 350 nm). Portez sur un graphique le logarithme de l'absorbance observée en fonction du logarithme de la longueur d'onde, puis déterminez, par analyse de la régression linéaire, la courbe d'étalonnage la mieux ajustée aux différents points portés sur le graphique. Déterminez, par extrapolation de la courbe, le logarithme de l'absorbance à 280 nm. L'absorbance due à l'effet de diffusion est l'antilogarithme de cette valeur. Corrigez les valeurs observées en soustrayant à l'absorbance totale à 280 nm l'absorbance due à l'effet de diffusion pour obtenir la valeur de l'absorbance due à la protéine en solution. Afin de réduire les effets de la diffusion de la lumière, notamment lorsque la solution est trouble, il est possible d'effectuer une filtration, à l'aide d'un filtre de 0,2 µm qui n'adsorbe pas les protéines, ou une clarification par centrifugation.

**Calculs**. Utilisez les valeurs corrigées pour les calculs. Calculez la teneur en protéine de la solution à examiner ($C_U$) à partir de l'équation suivante :

$$C_U = C_S\,(A_U/A_S)$$

où $C_S$ est la teneur en protéine de la solution témoin, et $A_U$ et $A_S$ sont les valeurs de l'absorbance corrigée de la solution à examiner et de la solution témoin, respectivement.

MÉTHODE 2

Cette méthode, communément appelée méthode de Lowry, repose sur la propriété que possèdent les protéines de réduire des acides phosphomolybdotungstiques contenus dans le réactif phosphomolybdotungstique ; cette réaction est chromogène et se traduit par l'existence d'un pic d'absorption à 750 nm. Le réactif phosphomolybdotungstique réagit principalement avec les résidus tyrosine de la protéine. Le développement de la coloration atteint un maximum au bout de 20-30 min d'incubation à température ambiante ; il se produit ensuite une décoloration progressive. La méthode étant sensible à des substances interférentes, un traitement entraînant la précipitation des protéines de l'échantillon à examiner peut être utilisé. La plupart des substances interférentes réduisent l'intensité de coloration obtenue, mais quelques détergents l'augmentent légèrement. Une forte concentration saline peut entraîner la formation d'un précipité. L'intensité de coloration obtenue pouvant varier selon l'espèce protéique considérée, la protéine à doser et la protéine de référence doivent être les mêmes. S'il est nécessaire de séparer les substances interférentes de la protéine dans l'échantillon à examiner, procédez comme indiqué ci-après sous Substances interférentes avant de préparer la solution à examiner. Il est possible de minimiser l'effet des substances interférentes par dilution, à condition que la teneur en protéine à doser reste assez élevée pour permettre une mesure précise.

Utilisez de l'*eau distillée R* pour la préparation de tous les tampons et réactifs utilisés pour cette méthode.

*Solution à examiner*. Dissolvez une quantité appropriée de la substance à examiner dans le tampon spécifié, de façon à obtenir une concentration comprise dans l'intervalle couvert par la courbe d'étalonnage. Le pH d'une solution préparée avec un tampon approprié sera de 10,0 à 10,5.

*Solutions de référence*. Dissolvez la substance de référence correspondant à la protéine à doser dans le tampon spécifié. Prélevez des échantillons de cette solution et complétez-les avec le même tampon de façon à obtenir au moins cinq solutions de référence différentes, de concentrations comprises entre 5 µg/mL et 100 µg/mL et uniformément réparties sur l'intervalle choisi.

*Solution à blanc*. Utilisez le même tampon que celui utilisé pour préparer la solution à examiner et les solutions de référence.

*Réactif au sulfate de cuivre*. Dissolvez 100 mg de *sulfate de cuivre R* et 0,2 g de *tartrate de sodium R* dans de l'*eau distillée R* et complétez à 50 mL avec le même solvant. Dissolvez 10 g de *carbonate de sodium anhydre R* dans de l'*eau distillée R* et complétez à 50 mL avec le même solvant. Versez lentement la solution de carbonate de sodium dans la solution de sulfate de cuivre, tout en mélangeant. Cette solution doit être utilisée dans les 24 h qui suivent sa préparation.

*Réactif alcalin au cuivre*. Préparez un mélange de 1 volume de réactif au sulfate de cuivre, de 2 volumes d'une solution de *dodécylsulfate de sodium R* à 50 g/L et de 1 volume d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 32 g/L. Conservez ce mélange à température ambiante. Le mélange doit être utilisé dans les 2 semaines qui suivent sa préparation.

*Réactif phosphomolybdotungstique dilué*. Mélangez 5 mL de *réactif phosphomolybdotungstique R* avec 55 mL d'*eau distillée R*. Conservez ce réactif à température ambiante dans un flacon de verre ambré.

**Mode opératoire**. A 1,0 mL de chaque solution de référence, de la solution à examiner et de la solution à blanc, ajoutez 1,0 mL de réactif alcalin au cuivre puis mélangez. Laissez reposer pendant 10 min. Ajoutez 0,5 mL du réactif phosphomolybdotungstique dilué, mélangez, et laissez reposer à température ambiante pendant 30 min. Déterminez l'absorbance (*2.2.25*) des solutions à 750 nm, en utilisant la solution à blanc comme liquide de compensation.

**Calculs**. La relation entre l'absorbance et la teneur en protéine est non linéaire ; cependant, si l'intervalle de concentration couvert par la courbe d'étalonnage est suffisamment étroit, la courbe obtenue sera sensiblement linéaire. Placez sur un graphique l'absorbance des solutions de référence en fonction de la teneur en protéine de ces solutions et déterminez la courbe d'étalonnage par analyse de la régression linéaire. A partir de la courbe d'étalonnage et de l'absorbance de la solution à examiner, déterminez la teneur en protéine de la solution à examiner.

**Substances interférentes**. Dans cette méthode, de l'acide désoxycholatotrichloracétique est ajouté à un échantillon à examiner pour précipiter les protéines et les séparer des substances interférentes, avant de les doser. Cette technique peut également être utilisée pour concentrer les protéines contenues dans une solution très diluée.

A 1 mL d'une solution de la substance à examiner, ajoutez 0,1 mL d'une solution de *désoxycholate de sodium R* à 1,5 g/L.

Agitez avec un mélangeur de type vortex et laissez reposer à température ambiante pendant 10 min. Ajoutez 0,1 mL d'une solution d'*acide trichloracétique R* à 720 g/L. Agitez avec un mélangeur de type vortex et centrifugez à 3000 *g* pendant 30 min. Jetez le surnageant liquide et éliminez le liquide résiduel avec une pipette. Remettez le culot protéique en solution dans 1 mL de réactif alcalin au cuivre.

MÉTHODE 3

Cette méthode, communément appelée méthode de Bradford, repose sur la propriété que possèdent les protéines de déplacer de 470 nm à 595 nm le maximum d'absorption du bleu acide 90, lorsqu'elles se lient à ce colorant. Le colorant bleu acide 90 présente une affinité marquée pour les résidus d'arginine et de lysine dans la protéine, ce qui peut entraîner des variations de la réponse du dosage à différentes protéines. La protéine utilisée comme substance de référence doit donc être la même que la protéine à doser. Il existe relativement peu de substances interférentes, mais il est préférable d'éviter les détergents et les ampholytes dans l'échantillon à examiner. Des échantillons très alcalins peuvent introduire des interférences avec le réactif acide.

Utilisez de l'*eau distillée R* pour la préparation de tous les tampons et réactifs utilisés pour cette méthode.

*Solution à examiner*. Dissolvez une quantité appropriée de la substance à examiner dans le tampon spécifié, de façon à obtenir une concentration comprise dans l'intervalle couvert par la courbe d'étalonnage.

*Solutions de référence*. Dissolvez la substance de référence correspondant à la protéine à doser dans le tampon spécifié. Prélevez des échantillons de cette solution et complétez-les avec le même tampon de façon à obtenir au moins cinq solutions de référence différentes, de concentrations protéiques comprises entre 0,1 mg/mL et 1 mg/mL et uniformément réparties sur l'intervalle choisi.

*Solution à blanc*. Utilisez le même tampon que celui utilisé pour préparer la solution à examiner et les solutions de référence.

*Réactif bleu acide 90*. Dissolvez 0,10 g d'*acide bleu 90 R* dans 50 mL d'*alcool R*. Ajoutez 100 mL d'*acide phosphorique R*, complétez à 1000 mL avec de l'*eau distillée R*, puis mélangez. Filtrez la solution, et conservez-la à température ambiante, dans un flacon de verre ambré. Il se produit une lente précipitation du colorant au cours du stockage. Le précipité doit être éliminé par filtration avant utilisation du réactif.

**Mode opératoire**. A 0,100 mL de chaque solution de référence, de la solution à examiner et de la solution à blanc, ajoutez 5 mL du réactif bleu acide 90. Homogénéisez le mélange par retournement, en évitant la formation de mousse qui peut poser des problèmes de reproductibilité. Déterminez l'absorbance (*2.2.25*) des solutions de référence et de la solution à examiner à 595 nm, en utilisant la solution à blanc comme liquide de compensation. L'emploi de cuves spectrophotométriques en quartz (silice) est à éviter car le colorant se lie à ce matériau.

**Calculs**. La relation entre l'absorbance et la teneur en protéine est non linéaire. Cependant, si l'intervalle de concentration couvert par la courbe d'étalonnage est suffisamment étroit, la courbe obtenue sera sensiblement linéaire. Placez sur un graphique l'absorbance des solutions de référence en fonction de la teneur en protéine de ces solutions et déterminez la courbe d'étalonnage par analyse de la régression linéaire. A partir de la courbe d'étalonnage et de l'absorbance de la solution à examiner, déterminez la teneur en protéine de la solution à examiner.

MÉTHODE 4

Cette méthode, communément appelée méthode à l'acide bicinchoninique (BCA), repose sur la propriété que possèdent les protéines de réduire l'ion cuivrique ($Cu^{2+}$) en ion cuivreux ($Cu^{1+}$). Le réactif à l'acide bicinchoninique sert à détecter les ions cuivreux. Il existe peu de substances interférentes. Si des substances interférentes sont présentes, il est possible de minimiser leurs effets par dilution, à condition que la teneur en protéine à doser reste assez élevée pour permettre une mesure précise. La technique de précipitation des protéines décrite dans la Méthode 2 peut également être utilisée pour éliminer les substances interférentes. L'intensité de la coloration en réponse au réactif pouvant varier d'un type de protéine à un autre, la protéine de référence et la protéine à doser doivent être les mêmes.

Utilisez de l'*eau distillée R* pour la préparation de tous les tampons et réactifs utilisés pour cette méthode.

*Solution à examiner*. Dissolvez une quantité appropriée de la substance à examiner dans le tampon spécifié, de façon à obtenir une concentration comprise dans l'intervalle de concentration des solutions de référence.

*Solutions de référence*. Dissolvez la substance de référence correspondant à la protéine à doser dans le tampon spécifié. Prélevez des échantillons de cette solution et complétez-les avec le même tampon de façon à obtenir au moins cinq solutions de référence différentes, de concentrations comprises entre 10 µg/mL et 1200 µg/mL et uniformément réparties sur l'intervalle choisi.

*Solution à blanc*. Utilisez le même tampon que celui utilisé pour préparer la solution à examiner et les solutions de référence.

*Réactif BCA*. Dissolvez 10 g de *bicinchoninate disodique R*, 20 g de *carbonate de sodium monohydraté R*, 1,6 g de *tartrate de sodium R*, 4 g d'*hydroxyde de sodium R* et 9,5 g de *bicarbonate de sodium R* dans de l'*eau distillée R*. Ajustez si nécessaire le pH à 11,25 avec une solution d'*hydroxyde de sodium R* ou de *bicarbonate de sodium R*. Complétez à 1000 mL avec de l'*eau distillée R* et mélangez.

*Réactif au cuivre-BCA*. Mélangez 1 mL d'une solution de *sulfate de cuivre R* à 40 g/L et 50 mL de réactif BCA.

**Mode opératoire**. Mélangez 0,1 mL de chaque solution de référence, de la solution à examiner et de la solution à blanc avec 2 mL du réactif au cuivre-BCA. Placez les solutions en incubation à 37 °C pendant 30 min, notez l'heure, puis laissez-les refroidir à la température ambiante. Dans les 60 min suivant la fin de la période d'incubation, déterminez l'absorbance (*2.2.25*) à 562 nm des solutions de référence et de la solution à examiner dans des cuves en quartz, en utilisant la solution à blanc comme liquide de compensation. Lorsque la température des solutions est redescendue à la température ambiante, l'intensité de coloration continue d'augmenter progressivement.

**Calculs**. La relation entre l'absorbance et la teneur en protéine est non linéaire. Cependant, si l'intervalle de concentration couvert par la courbe d'étalonnage est suffisamment étroit, la courbe obtenue sera sensiblement linéaire. Placez sur un graphique l'absorbance des solutions de référence en fonction de la teneur en protéine de ces solutions et déterminez la courbe d'étalonnage par analyse de la régression linéaire. A partir de la courbe d'étalonnage et de l'absorbance de la solution à examiner, déterminez la teneur en protéine de la solution à examiner.

MÉTHODE 5

Cette méthode, communément appelée méthode du biuret, repose sur la propriété que possèdent les protéines d'interagir avec l'ion cuivrique ($Cu^{2+}$), en milieu alcalin, en donnant un produit de réaction qui présente une absorbance à 545 nm. Cette méthode permet d'obtenir un écart minimal entre échantillons équivalents d'IgG et d'albumine. Par contre, l'addition simultanée de l'hydroxyde de sodium et du réactif au biuret (sous forme de mélange), une homogénéisation insuffisante après l'addition de l'hydroxyde de sodium, ou un intervalle de temps trop long entre l'addition de l'hydroxyde de sodium et celle du réactif au biuret conduisent à l'obtention d'une réponse plus élevée avec les échantillons d'IgG qu'avec ceux d'albumine. Le traitement à l'acide trichloracétique

utilisé pour réduire les interférences peut également permettre de quantifier la protéine lorsque sa concentration dans l'échantillon est inférieure à 500 µg/mL.

Utilisez de l'*eau distillée R* pour la préparation de tous les tampons et réactifs utilisés pour cette méthode.

*Solution à examiner*. Dissolvez une quantité appropriée de la substance à examiner dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, de façon à obtenir une concentration comprise dans l'intervalle de concentration des solutions de référence.

*Solutions de référence*. Dissolvez la substance de référence correspondant à la protéine à doser dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L. Prélevez des échantillons de cette solution et complétez-les avec une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L de façon à obtenir au moins trois solutions de référence différentes, de concentrations comprises entre 0,5 mg/mL et 10 mg/mL et uniformément réparties sur l'intervalle choisi.

*Solution à blanc*. Utilisez une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L.

*Réactif au biuret*. Dissolvez 3,46 g de *sulfate de cuivre R* dans 10 mL d'*eau distillée R* chaude, puis laissez refroidir (solution A). Dissolvez 34,6 g de *citrate de sodium R* et 20,0 g de *carbonate de sodium anhydre R* dans 80 mL d'*eau distillée R* chaude, puis laissez refroidir (solution B). Mélangez les solutions A et B, puis complétez à 200 mL avec de l'*eau distillée R*. Ce réactif doit être utilisé dans les 6 mois qui suivent sa préparation ; il ne doit pas être utilisé si le développement d'un trouble ou l'apparition d'un précipité sont observés.

**Mode opératoire**. A un volume de solution à examiner, ajoutez un volume égal d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 60 g/L et mélangez. Ajoutez immédiatement 0,4 volume (calculé par rapport à l'échantillon de solution à examiner) de réactif au biuret et mélangez rapidement. Maintenez les échantillons pendant 15 min au moins à une température comprise entre 15 °C et 25 °C. Dans les 90 min suivant l'addition du réactif au biuret, déterminez l'absorbance (*2.2.25*) au maximum à 545 nm des solutions de référence et de la solution à examiner, en utilisant la solution à blanc comme liquide de compensation. Si certaines solutions présentent un trouble ou un précipité, elles ne sont pas acceptables pour le calcul de la teneur en protéine.

**Calculs**. La relation entre l'absorbance et la teneur en protéine est sensiblement linéaire dans l'intervalle de concentration indiqué pour les solutions de référence. Portez sur un graphique l'absorbance des solutions de référence en fonction de la teneur en protéine de ces solutions et déterminez la courbe d'étalonnage par analyse de la régression linéaire. Calculez le coefficient de corrélation pour la courbe d'étalonnage. Le système convient s'il donne une droite dont le coefficient de corrélation est de 0,99 au moins. A partir de la courbe d'étalonnage et de l'absorbance de la solution à examiner, déterminez la teneur en protéine de la solution à examiner.

**Substances interférentes**. Il est possible de limiter l'effet des substances interférentes en précipitant, comme suit, la protéine de l'échantillon à examiner : ajoutez 0,1 volume d'une solution d'*acide trichloracétique R* à 500 g/L à 1 volume d'une solution de l'échantillon à examiner, éliminez le surnageant, puis dissolvez le précipité dans un petit volume d'*hydroxyde de sodium 0,5 M*. Utilisez la solution ainsi obtenue pour préparer la solution à examiner.

MÉTHODE 6

Cette méthode fluorimétrique repose sur une dérivatisation de la protéine par l'*o*-phtalaldéhyde, qui réagit avec les amines primaires de la protéine, c'est-à-dire l'acide aminé *N*-terminal et la fonction $\epsilon$-amine des résidus lysine. La sensibilité du dosage peut être améliorée par une hydrolyse préalable de la protéine, avant l'addition de l'*o*-phtalaldéhyde. L'hydrolyse libère la fonction $\alpha$-amine des acides aminés constituant la protéine et leur permet de réagir avec le réactif au phtalaldéhyde. Cette méthode est applicable à de très petites quantités de protéine. Les amines primaires contenues par exemple dans les tampons tris(hydroxyméthyl)aminométhane et dans les tampons aminoacides réagissent avec le phtalaldéhyde, et sont donc à éviter ou à éliminer. L'ammoniaque à forte concentration réagit également avec le phtalaldéhyde. La fluorescence résultant de la réaction amine-phtalaldéhyde peut être instable. L'emploi de procédures automatisées pour standardiser la méthode peut permettre d'en améliorer l'exactitude et la fidélité.

Utilisez de l'*eau distillée R* pour la préparation de tous les tampons et réactifs utilisés pour cette méthode.

*Solution à examiner*. Dissolvez une quantité appropriée de la substance à examiner dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, de façon à obtenir une concentration comprise dans l'intervalle de concentration des solutions de référence. Ajustez le pH de la solution à 8-10,5 avant d'ajouter le réactif au phtalaldéhyde.

*Solutions de référence*. Dissolvez la substance de référence correspondant à la protéine à doser dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L. Prélevez des échantillons de cette solution et complétez-les avec une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L de façon à obtenir au moins cinq solutions de référence différentes, de concentrations comprises entre 10 µg/mL et 200 µg/mL et uniformément réparties sur l'intervalle choisi. Ajustez le pH des solutions à 8-10,5 avant d'ajouter le réactif au phtalaldéhyde.

*Solution à blanc*. Utilisez une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L.

*Solution tampon borate*. Dissolvez 61,83 g d'*acide borique R* dans de l'*eau distillée R* et ajustez à pH 10,4 avec une solution d'*hydroxyde de potassium R*. Complétez à 1000 mL avec de l'*eau distillée R*, puis mélangez.

*Solution mère de phtalaldéhyde*. Dissolvez 1,20 g de *phtalaldéhyde R* dans 1,5 mL de *méthanol R*, ajoutez 100 mL de solution tampon borate, puis mélangez. Ajoutez 0,6 mL d'une solution d'*éther laurique de macrogol 23 R* à 300 g/L, puis mélangez. Conservez la solution à température ambiante et utilisez-la dans les 3 semaines qui suivent sa préparation.

*Réactif au phtalaldéhyde*. A 5 mL de la solution mère de phtalaldéhyde, ajoutez 15 µL de *2-mercaptoéthanol R*. Préparez le réactif 30 min au moins avant emploi et utilisez-le dans les 24 h qui suivent.

**Mode opératoire**. Mélangez 10 µL de la solution à examiner et de chacune des solutions de référence avec 0,1 mL de réactif au phtalaldéhyde et laissez reposer à température ambiante pendant 15 min. Ajoutez 3 mL d'*hydroxyde de sodium 0,5 M*, puis mélangez. Mesurez l'intensité de la fluorescence (*2.2.21*) des échantillons de solutions de référence et de la solution à examiner sous une longueur d'onde d'excitation de 340 nm et une longueur d'onde d'émission de 440 nm à 455 nm. Ne mesurez l'intensité de la fluorescence d'un échantillon donné qu'une seule fois car l'irradiation entraîne une diminution de l'intensité de fluorescence.

**Calculs**. La relation entre l'intensité de fluorescence et la teneur en protéine est linéaire. Portez sur un graphique les intensités de fluorescence obtenues avec les solutions de référence en fonction de la teneur en protéine de ces solutions et déterminez la courbe d'étalonnage par analyse de la régression linéaire. A partir de la courbe d'étalonnage et de l'intensité de fluorescence de la solution à examiner, déterminez la teneur en protéine de la solution à examiner.

MÉTHODE 7

Cette méthode repose sur une quantification des protéines par dosage de l'azote. La présence dans l'échantillon à examiner d'autres substances azotées peut affecter le résultat du dosage de la protéine. Les techniques utilisées pour doser l'azote conduisent à une destruction de l'échantillon à examiner au cours de l'analyse, mais ne se limitent pas à la détermination des protéines en milieu aqueux.

**Mode opératoire A**. Opérez comme indiqué pour le dosage de l'azote après minéralisation par l'acide sulfurique (*2.5.9*) ou utilisez des instruments disponibles dans le commerce adaptés au dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl.

**Mode opératoire B**. Des instruments adaptés au dosage de l'azote sont disponibles dans le commerce. La plupart d'entre eux utilisent la pyrolyse (combustion de l'échantillon dans l'oxygène à des températures approchant 1000 °C), qui entraîne la formation de monoxyde d'azote (NO) et d'autres oxydes de la forme $NO_x$ à partir de l'azote présent dans la substance à examiner. Certains instruments convertissent ces oxydes en azote gazeux, qui est quantifié par conductimétrie thermique. D'autres mélangent le monoxyde d'azote (NO) à de l'ozone ($O_3$) pour produire du dioxyde d'azote à l'état excité ($NO_2^*$), qui émet un rayonnement lumineux lors de sa décroissance et est quantifié par chimiluminescence. Un produit de référence relativement pur et semblable quant à sa composition à la protéine à doser est utilisé pour optimiser les paramètres d'injection et de pyrolyse et pour évaluer la reproductibilité de l'analyse.

**Calculs**. La teneur en protéine se calcule en divisant la teneur en azote de l'échantillon par la teneur en azote (connue) de la protéine, qui peut être déterminée soit à partir de la structure chimique de la protéine soit par comparaison avec une substance de référence appropriée.

**01/2008:20534**

## 2.5.34. ACIDE ACÉTIQUE DANS LES PEPTIDES SYNTHÉTIQUES

Opérez par chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Préparez la solution à examiner comme décrit dans la monographie. La concentration en peptide de la solution peut être adaptée en fonction de la quantité d'acide acétique attendue dans l'échantillon.

*Solution témoin.* Préparez une solution d'*acide acétique glacial R* à 0,10 g/L dans un mélange de 5 volumes de phase mobile B et 95 volumes de phase mobile A.

La chromatographie peut être réalisée en utilisant :

– une colonne d'acier inoxydable, d'une longueur de 0,25 m et d'un diamètre intérieur de 4,6 mm, remplie de *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
– comme phase mobile, à un débit de 1,2 mL/min :

  *Phase mobile A*. Prélevez 0,7 mL d'*acide phosphorique R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R* ; ajustez à pH 3,0 avec de la *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R*,

  *Phase mobile B. Méthanol R2*,

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 5 | 95 | 5 |
| 5 - 10 | 95 → 50 | 5 → 50 |
| 10 - 20 | 50 | 50 |
| 20 - 22 | 50 → 95 | 50 → 5 |
| 22 - 30 | 95 | 5 |

– comme détecteur, un spectrophotomètre réglé à 210 nm.

Injectez 10 µL de solution témoin et 10 µL de solution à examiner. Dans les chromatogrammes obtenus, le pic correspondant à l'acide acétique a un temps de rétention de 3-4 min. Après le début du gradient linéaire, la ligne de base présente une brusque ascension qui correspond à l'élution du peptide de la colonne. Déterminez la teneur en acide acétique du peptide.

**01/2011:20535**

## 2.5.35. PROTOXYDE D'AZOTE DANS LES GAZ

Les gaz absorbent la lumière à une ou plusieurs longueurs d'onde spécifiques. Cette propriété est souvent utilisée pour effectuer une mesure hautement sélective de leur concentration.

**Description et principe de mesure**. La concentration du protoxyde d'azote dans d'autres gaz peut être déterminée au moyen d'un analyseur infrarouge.

L'analyseur infrarouge se compose généralement d'une source lumineuse émettant un rayonnement infrarouge à large spectre, d'un dispositif optique, d'une cellule de mesure et d'un détecteur. Le dispositif optique peut être placé soit avant soit après la cellule de mesure ; il est constitué d'un ou plusieurs filtres optiques que traverse le rayonnement à large spectre. Dans ce cas, le dispositif optique utilisé est dédié au protoxyde d'azote. Le faisceau lumineux traverse la cellule de mesure ; il peut aussi traverser une cellule de référence si l'analyseur en comporte une (elle est remplacée par un système électronique dans certains analyseurs).

La présence de protoxyde d'azote dans la cellule de mesure entraîne une absorption d'énergie dans le faisceau lumineux, selon la loi de Beer-Lambert, et par suite une variation du signal parvenant au détecteur. La comparaison de ce signal à un signal de référence génère un signal de sortie qui est fonction de la concentration de protoxyde d'azote. La linéarisation du signal généré permet d'obtenir la concentration en protoxyde d'azote. Pour éviter l'entrée de particules dans les capteurs pouvant entraîner des phénomènes optiques parasites, l'appareil est équipé d'un filtre approprié.

**01/2008:20536**

## 2.5.36. INDICE D'ANISIDINE

L'indice d'anisidine est défini comme étant 100 fois la densité optique mesurée sous une épaisseur de 1 cm, d'une solution contenant 1 g de substance à examiner dans 100 mL d'un mélange de solvants et de réactifs conformément à la méthode suivante.

*Effectuez les manipulations aussi rapidement que possible en évitant toute exposition à la lumière actinique.*

*Solution à examiner (a).* Dissolvez 0,500 g de substance à examiner dans du *triméthylpentane R* et complétez à 25,0 mL avec le même solvant.

*Solution à examiner (b).* A 5,0 mL de solution à examiner (a) ajoutez 1,0 mL d'une solution de *p-anisidine R* à 2,5 g/L dans de l'*acide acétique glacial R*, agitez et conservez à l'abri de la lumière.

*Solution témoin.* A 5,0 mL de *triméthylpentane R*, ajoutez 1,0 mL d'une solution de *p-anisidine R* à 2,5 g/L dans de l'*acide acétique glacial R*, agitez et conservez à l'abri de la lumière.

Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner (a) au maximum à 350 nm en utilisant du *triméthylpentane R* comme liquide de compensation. 10 min exactement après sa préparation, mesurez l'absorbance de la solution à examiner (b) à 350 nm en utilisant la solution témoin comme liquide de compensation.

Calculez l'indice d'anisidine à l'aide de l'expression :

$$\frac{25 \times (1,2A_1 - A_2)}{m}$$

$A_1$ = absorbance de la solution à examiner (b) à 350 nm,

$A_2$ = absorbance de la solution à examiner (a) à 350 nm,

$m$ = masse de la substance à examiner dans la solution à examiner (a), en grammes.

2. Méthodes analytiques

# 2.6. MÉTHODES BIOLOGIQUES

# 2.6. MÉTHODES BIOLOGIQUES

**07/2010:20601**

## 2.6.1. STÉRILITÉ

*L'essai s'applique aux substances, préparations et produits qui doivent être stériles selon la Pharmacopée. Toutefois, un résultat favorable signifie seulement qu'aucun microorganisme contaminant n'a pu être décelé dans l'échantillon examiné, dans les conditions de l'essai.*

PRÉCAUTIONS CONCERNANT LA CONTAMINATION MICROBIENNE

L'essai de stérilité est réalisé dans des conditions aseptiques. Pour que ces conditions soient réalisées, l'environnement d'essai doit être adapté aux modalités de réalisation de l'essai de stérilité. Les précautions prises pour éviter une contamination microbienne ne doivent pas affecter les microorganismes recherchés. Les conditions dans lesquelles est réalisé l'essai sont régulièrement vérifiées par des prélèvements adéquats effectués dans la zone de travail et par des contrôles appropriés.

MILIEUX DE CULTURE ET TEMPÉRATURES D'INCUBATION

*Les milieux de culture utilisés peuvent être préparés comme décrit ci-après ; on peut également utiliser des milieux équivalents disponibles dans le commerce à condition qu'ils satisfassent à l'essai de fertilité.*

Les milieux de culture suivants conviennent pour la réalisation de l'essai de stérilité. Le milieu liquide au thioglycolate est principalement destiné à la recherche des bactéries anaérobies, mais il permet également la détection des bactéries aérobies. Le milieu à l'hydrolysat de caséine convient à la fois à la recherche des levures et moisissures et des bactéries aérobies.

**Milieu liquide au thioglycolate**

| | |
|---|---|
| L-Cystine | 0,5 g |
| Gélose | 0,75 g |
| Chlorure de sodium | 2,5 g |
| Glucose monohydraté/anhydre | 5,5 g/5,0 g |
| Extrait de levure (hydrosoluble) | 5,0 g |
| Hydrolysat pancréatique de caséine | 15,0 g |
| Thioglycolate de sodium ou | 0,5 g |
| Acide thioglycolique | 0,3 mL |
| Solution de résazurine sodique à 1 g/L, récemment préparée | 1,0 mL |
| *Eau R* | 1000 mL |

pH après stérilisation : 7,1 ± 0,2

Mélangez la L-cystine, la gélose, le chlorure de sodium, le glucose, l'extrait de levure hydrosoluble et l'hydrolysat pancréatique de caséine avec l'*eau R* et chauffez jusqu'à dissolution. Dissolvez le thioglycolate de sodium ou l'acide thioglycolique dans la solution et ajoutez si nécessaire de l'*hydroxyde de sodium 1 M* pour que le pH de la solution après stérilisation soit de 7,1 ± 0,2. Si une filtration s'avère nécessaire, réchauffez la solution sans la porter à ébullition puis filtrez à chaud sur un papier filtre humecté. Ajoutez la solution de résazurine sodique, mélangez et répartissez dans des récipients appropriés pour que le rapport surface/hauteur du milieu soit tel que la zone d'oxydation superficielle (zone de virage de l'indicateur coloré) ne représente pas plus de la moitié de la hauteur du milieu en fin d'incubation. Stérilisez par un procédé validé. Si le milieu est conservé, conservez-le dans un récipient stérile étanche à température comprise entre 2 °C et 25 °C. Si le milieu a pris une coloration rose sur plus du tiers supérieur de sa hauteur, il est admis de le régénérer une fois en plaçant le récipient dans un bain-marie ou dans de la vapeur circulante jusqu'à disparition de la coloration rose, puis en le refroidissant rapidement en veillant à éviter l'introduction d'air non stérile dans le récipient. N'utilisez pas le milieu au-delà de la durée de conservation validée.

La température d'incubation du milieu liquide au thioglycolate est de 30-35 °C.

Pour les produits contenant un conservateur mercuriel, auxquels la méthode de filtration sur membrane n'est pas applicable, le milieu liquide au thioglycolate incubé à 20-25 °C peut remplacer le milieu à l'hydrolysat de caséine et de soja, sous réserve de validation comme décrit dans l'essai de fertilité du milieu.

L'emploi d'un milieu au thioglycolate alternatif, tel que décrit ci-après, est possible dans des cas où cet emploi est prescrit ou justifié et autorisé. Préparez un mélange de même composition que celle du milieu liquide au thioglycolate, mais sans gélose ni solution de résazurine sodique, puis stérilisez comme indiqué ci-dessus. Le pH après stérilisation est de 7,1 ± 0,2. Chauffez dans un bain-marie avant emploi. L'incubation du milieu s'effectue à 30-35 °C dans des conditions anaérobies.

**Milieu à l'hydrolysat de caséine et de soja**

| | |
|---|---|
| Hydrolysat pancréatique de caséine | 17,0 g |
| Hydrolysat papaïque de farine de soja | 3,0 g |
| Chlorure de sodium | 5,0 g |
| Phosphate dipotassique | 2,5 g |
| Glucose monohydraté/anhydre | 2,5 g/2,3 g |
| *Eau R* | 1000 mL |

pH après stérilisation : 7,3 ± 0,2

Dissolvez les différents constituants dans de l'*eau R*, en chauffant doucement. Refroidissez la solution à température ambiante. Ajoutez si nécessaire de l'*hydroxyde de sodium 1 M* pour que le pH de la solution après stérilisation soit de 7,3 ± 0,2. Filtrez si nécessaire pour clarifier, puis répartissez dans des récipients appropriés et stérilisez par un procédé validé. Sauf s'il est utilisé immédiatement, conservez le milieu dans un récipient stérile bien fermé à température comprise entre 2 °C et 25 °C. N'utilisez pas le milieu au-delà de la durée de conservation validée.

La température d'incubation du milieu à l'hydrolysat de caséine et de soja est de 20-25 °C.

Les milieux utilisés satisfont aux essais suivants, effectués avant l'essai du produit à examiner ou en parallèle.

**Stérilité**. Incubez des échantillons des milieux pendant 14 jours. Aucune croissance microbienne n'est observée.

**Essai de fertilité du milieu pour les bactéries aérobies et anaérobies et les levures et moisissures**. Effectuez l'essai sur chaque lot de milieu, qu'il soit acheté prêt à l'emploi ou préparé à partir d'un milieu déshydraté ou des ingrédients décrits. Des souches de microorganismes appropriées sont indiquées dans le tableau 2.6.1.-1.

Ensemencez des échantillons du milieu liquide au thioglycolate avec un petit nombre (au maximum 100 UFC) des microorganismes suivants, en utilisant une fraction séparée du milieu pour chacune des espèces de microorganisme : *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Ensemencez des échantillons du milieu à l'hydrolysat de caséine et de soja avec un petit nombre (au maximum 100 UFC) des microorganismes suivants, en utilisant une fraction séparée du milieu pour chacune des espèces de microorganisme : *Aspergillus brasiliensis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*. Incubez pendant au maximum 3 jours pour les bactéries et pendant au maximum 5 jours pour les moisissures et levures.

Les cultures sont effectuées selon un système de lot de semence tel que les microorganismes utilisés pour l'inoculation n'aient pas subi plus de 5 passages à partir du lot de semence primaire.

Tableau 2.6.1.-1 – *Souches des microorganismes d'essai appropriées pour les essais de fertilité du milieu et d'applicabilité de la méthode*

| | |
|---|---|
| **Bactéries aérobies** | |
| *Staphylococcus aureus* | ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518, NBRC 13276 |
| *Bacillus subtilis* | ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054, NBRC 3134 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC 13275 |
| **Bactérie anaérobie** | |
| *Clostridium sporogenes* | ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532, ATCC 11437, NBRC 14293 |
| **Moisissures et levures** | |
| *Candida albicans* | ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179, NBRC 1594 |
| *Aspergillus brasiliensis* | ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007, NBRC 9455 |

Les milieux conviennent si une croissance des microorganismes est clairement observable.

## ESSAI D'APPLICABILITÉ DE LA MÉTHODE

Opérez comme décrit ci-après, sous Essai de stérilité du produit à examiner, en appliquant exactement la même méthode aux modifications suivantes près.

**Filtration sur membrane**. Après transfert sur la membrane du contenu du (des) récipient(s) à examiner, ajoutez un inoculum contenant un petit nombre de microorganismes viables (au maximum 100 UFC) au volume final du diluant stérile utilisé pour rincer le filtre.

**Ensemencement direct**. Après transfert dans le milieu de culture du contenu du (des) récipient(s) à examiner (ou des fils pour le catgut et les autres fils chirurgicaux à usage vétérinaire), ensemencez le milieu avec un inoculum contenant un petit nombre de microorganismes viables (au maximum 100 UFC).

Dans les deux cas, utilisez les mêmes microorganismes que ceux décrits sous Essai de fertilité du milieu pour les bactéries aérobies et anaérobies et les levures et moisissures, et effectuez en parallèle un essai de fertilité (témoin positif). Incubez tous les récipients contenant le milieu pendant au maximum 5 jours.

Si l'on obtient après incubation une croissance microbienne clairement observable et visuellement comparable à celle observée avec le témoin positif, le produit ne possède pas d'activité antimicrobienne dans les conditions de l'essai ou son activité antimicrobienne a été éliminée de façon satisfaisante. L'essai de stérilité peut alors être effectué sans autre modification.

Si l'on n'obtient pas, en présence du produit à examiner, une croissance microbienne clairement observable et visuellement comparable à celle observée avec le témoin positif, le produit possède une activité antimicrobienne qui n'a pas été éliminée de façon satisfaisante dans les conditions d'essai utilisées. Dans ce cas, modifiez les conditions pour éliminer l'activité antimicrobienne et répétez l'essai d'applicabilité de la méthode.

Cet essai est effectué :

a) lorsque l'essai de stérilité doit être appliqué à un nouveau produit,

b) chaque fois qu'une modification est apportée aux conditions expérimentales.

L'essai d'applicabilité de la méthode peut être réalisé au même moment que l'essai de stérilité du produit à examiner.

## ESSAI DE STÉRILITÉ DU PRODUIT À EXAMINER

L'essai peut être réalisé soit par la technique de filtration sur membrane, soit par ensemencement direct du milieu nutritif avec le produit à examiner. Il comprend dans tous les cas des témoins négatifs appropriés. La technique de filtration sur membrane est utilisée chaque fois que la nature du produit le permet : préparations aqueuses filtrables, préparations alcooliques ou huileuses, préparations solubles dans des solvants aqueux ou huileux ou miscibles à de tels solvants à condition que ceux-ci n'exercent pas d'effet antimicrobien dans les conditions de l'essai.

**Filtration sur membrane**. Utilisez des membranes d'une porosité nominale inférieure ou égale à 0,45 µm dont l'efficacité de rétention des microorganismes a été établie. Des membranes de nitrate de cellulose par exemple sont utilisées pour les solutions aqueuses, huileuses ou faiblement alcooliques, des membranes d'acétate de cellulose par exemple pour les solutions fortement alcooliques. L'emploi de membranes spéciales peut être nécessaire pour certains produits, par exemple les antibiotiques.

La technique décrite ci-après suppose l'utilisation de membranes d'un diamètre d'environ 50 mm. L'emploi de membranes d'un diamètre différent nécessite d'adapter en conséquence le volume des dilutions et solutions de rinçage utilisées. L'appareil de filtration et la membrane sont stérilisés par des moyens appropriés. L'appareil doit permettre l'introduction et la filtration de la solution à examiner dans des conditions aseptiques ; il doit également être compatible avec un transfert aseptique de la membrane dans le milieu de culture, ou avec une incubation directe dans l'appareil après addition du milieu de culture.

*Solutions aqueuses*. Si besoin est, introduisez dans l'appareil muni d'une membrane une petite quantité d'un diluant stérile approprié, par exemple une solution neutre de peptone de viande ou de caséine à 1 g/L, de pH 7,1 ± 0,2, puis filtrez. Le diluant peut contenir des substances neutralisantes et/ou inactivantes appropriées, par exemple dans le cas des antibiotiques.

Transvasez dans un ou plusieurs appareils ainsi préparés le contenu du ou des récipients à examiner, après l'avoir si nécessaire complété au volume utilisé dans l'essai d'applicabilité de la méthode avec le diluant stérile choisi, mais en utilisant dans tous les cas au minimum la quantité de produit prescrite dans le tableau 2.6.1.-2. Filtrez immédiatement. Si le produit possède des propriétés antimicrobiennes, rincez la membrane au moins 3 fois, en filtrant à chaque fois le volume de diluant stérile utilisé dans l'essai d'applicabilité de la méthode. Ne dépassez pas un volume de rinçage de 5 fois 100 mL par filtre, même s'il a été démontré lors de l'essai d'applicabilité de la méthode qu'un tel cycle ne permet pas d'éliminer totalement l'activité antimicrobienne. Transférez la membrane entière dans le milieu de culture, ou découpez-la en 2 parties égales dans des conditions aseptiques et placez chaque moitié dans un milieu différent. Utilisez chaque fois le même volume de milieu que celui employé pour l'essai d'applicabilité de la méthode. Le milieu peut aussi être introduit dans l'appareil directement sur la membrane. Incubez pendant au minimum 14 jours.

*Poudres solubles*. Utilisez au minimum, pour chaque milieu de culture, la quantité de produit indiquée dans le tableau 2.6.1.-2, après dissolution dans un solvant approprié, par exemple le solvant fourni avec la préparation, de l'eau pour préparations injectables, une solution saline, ou une solution neutre de

Tableau 2.6.1.-2 – *Quantités minimales à utiliser pour chaque milieu*

| **Quantité par récipient** | **Quantité minimale de préparation à utiliser pour chaque milieu, sauf exception justifiée et autorisée** |
|---|---|
| *Liquides* | |
| – < 1 mL | Contenu total de chaque récipient |
| – 1-40 mL | La moitié du contenu de chaque récipient, mais pas moins de 1 mL |
| – > 40 mL mais ≤ 100 mL | 20 mL |
| – >100 mL | 10 pour cent du contenu du récipient, mais pas moins de 20 mL |
| *Liquides antibiotiques* | 1 mL |
| *Préparations insolubles, crèmes et pommades à mettre en suspension ou en émulsion* | Contenu total de chaque récipient, de façon à obtenir une masse minimale de 200 mg |
| *Solides* | |
| – < 50 mg | Contenu total de chaque récipient |
| – ≥ 50 mg mais < 300 mg | La moitié du contenu de chaque récipient, mais pas moins de 50 mg |
| – 300 mg à 5 g | 150 mg |
| – > 5 g | 500 mg |
| *Catgut et autres fils chirurgicaux à usage vétérinaire* | 3 segments de fil de 30 cm chacun |

peptone de viande ou de caséine à 1 g/L, puis procédez comme décrit précédemment pour les solutions aqueuses en utilisant une membrane adaptée au solvant choisi.

*Huiles et solutions huileuses.* Utilisez, pour chaque milieu de culture, au minimum la quantité de produit indiquée dans le tableau 2.6.1.-2. Les huiles et solutions huileuses de viscosité suffisamment faible peuvent être filtrées sans dilution préalable sur une membrane sèche. Les huiles visqueuses peuvent être diluées avec un diluant stérile approprié (par exemple du myristate d'isopropyle) dont l'absence d'activité antimicrobienne dans les conditions de l'essai aura été démontrée. Laissez pénétrer l'huile dans la membrane par gravité, puis filtrez en appliquant lentement le vide ou en augmentant la pression. Rincez la membrane au moins 3 fois, en filtrant à chaque fois environ 100 mL d'une solution stérile appropriée, par exemple une solution neutre de peptone de viande ou de caséine à 1 g/L, contenant un agent émulsionnant approprié à une concentration appropriée, déterminée lors de l'essai d'applicabilité de la méthode (par exemple du polysorbate 80 à concentration de 10 g/L). Transférez la (les) membrane(s) dans le (les) milieu(x) de culture, ou inversement, comme décrit ci-dessus pour les solutions aqueuses, et incubez à la même température et pendant le même temps.

*Pommades et crèmes.* Utilisez au minimum, pour chaque milieu de culture, la quantité de produit indiquée dans le tableau 2.6.1.-2. Les pommades à excipient gras et les émulsions du type eau dans huile peuvent être diluées au 1/100 avec du myristate d'isopropyle comme décrit ci-dessus, en chauffant si nécessaire à une température ne dépassant pas 40 °C. Dans certains cas exceptionnels, il peut être nécessaire de chauffer jusqu'à au maximum 44 °C. Filtrez aussi rapidement que possible et procédez comme décrit ci-dessus pour les huiles et solutions huileuses.

**Ensemencement direct du milieu de culture**. Ensemencez directement le milieu de culture avec la quantité de préparation indiquée dans le tableau 2.6.1.-2, de façon que le volume de produit utilisé ne dépasse pas 10 pour cent du volume du milieu, sauf indication contraire.

Si le produit à examiner possède une activité antimicrobienne, effectuez l'essai après neutralisation de cette activité au moyen d'un neutralisant approprié ou par dilution avec une quantité suffisante de milieu de culture. Lorsque le volume de produit requis pour l'essai est important, il peut être préférable de se servir de milieux de culture concentrés, préparés de façon à tenir compte de la dilution qui va suivre. Dans certains cas, le milieu de culture concentré peut être ajouté directement au produit dans son récipient.

*Liquides huileux.* Utilisez des milieux additionnés d'un agent émulsionnant approprié à une concentration appropriée, déterminée lors de l'essai d'applicabilité de la méthode, par exemple du polysorbate 80 à la concentration de 10 g/L.

*Pommades et crèmes.* Emulsionnez avec un diluant stérile approprié, par exemple une solution neutre de peptone de viande ou de caséine à 1 g/L, contenant l'agent émulsionnant choisi, de façon à obtenir environ une dilution au 1/10. Transvasez l'émulsion obtenue dans un milieu ne contenant pas d'agent émulsionnant.

Incubez les milieux ensemencés pendant au minimum 14 jours. Examinez les cultures à plusieurs reprises au cours de la période d'incubation. Les cultures contenant des préparations huileuses doivent être agitées doucement chaque jour ; toutefois, pour la détection des microorganismes anaérobies dans le milieu liquide au thioglycolate, réduisez autant que possible l'agitation afin de maintenir les conditions d'anaérobiose.

*Catgut et autres fils chirurgicaux à usage vétérinaire.* Utilisez, pour chaque milieu de culture, au minimum la quantité de produit indiquée dans le tableau 2.6.1.-2. Ouvrez l'emballage scellé en respectant les conditions d'asepsie et prélevez, pour chaque milieu de culture, 3 segments de fil d'une longueur de 30 cm situés en début, milieu et fin du fil. Utilisez des fils entiers provenant de paquets récemment ouverts. Transférez chaque segment dans le milieu de culture choisi pour l'essai. Utilisez une quantité de milieu suffisante pour immerger complètement l'échantillon à examiner (20-150 mL).

## OBSERVATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

A plusieurs reprises au cours de l'incubation, puis en fin d'incubation, examinez les milieux pour détecter des signes macroscopiques de prolifération microbienne. Si le produit à examiner induit une turbidité du milieu qui rend difficile la détection visuelle d'une éventuelle croissance microbienne, prélevez 14 jours après la mise en incubation des échantillons du milieu (d'au minimum 1 mL chacun), transférez-les dans de nouveaux récipients contenant le même milieu et incubez pendant au minimum 4 jours le milieu initial et les milieux transférés.

S'il n'est pas observé de signes de croissance microbienne, le produit à examiner satisfait à l'essai. Si une croissance microbienne est observée, le produit à examiner ne satisfait pas à l'essai à moins qu'il ne puisse être clairement démontré que l'essai est non valable pour des raisons indépendantes du produit. L'essai peut être considéré comme non valable si et seulement si une ou plusieurs des conditions suivantes sont réalisées :

a) les résultats du contrôle microbiologique des équipements servant aux essais de stérilité font apparaître une anomalie,

b) l'examen de la procédure expérimentale utilisée pour effectuer l'essai en question fait apparaître une anomalie,

c) une croissance microbienne est observée pour les témoins négatifs,

d) après identification des microorganismes isolés au terme de l'essai, il apparaît que la croissance de cette (ces) espèce(s) est sans aucun doute possible imputable au matériel ou à la technique utilisés pour la réalisation de l'essai de stérilité.

Si l'essai est déclaré non valable, il est répété sur le même nombre d'unités que l'essai initial.

S'il n'est pas observé de signes de croissance microbienne lors de la répétition de l'essai, le produit à examiner satisfait à l'essai. Si une croissance microbienne est observée lors de la répétition de l'essai, le produit à examiner ne satisfait pas à l'essai.

## APPLICATION DE L'ESSAI AUX PRÉPARATIONS PARENTÉRALES ET AUX PRÉPARATIONS OPHTALMIQUES OU AUTRES PRÉPARATIONS NON INJECTABLES OBLIGATOIREMENT STÉRILES

Pour la technique de filtration sur membrane, utilisez chaque fois que possible le contenu total du récipient mais en respectant les quantités minimales indiquées dans le tableau 2.6.1.-2. Complétez si nécessaire à environ 100 mL avec un diluant stérile approprié, par exemple une solution neutre de peptone de viande ou de caséine à 1 g/L.

Pour la technique d'ensemencement direct, utilisez les quantités indiquées dans le tableau 2.6.1.-2, sauf exception justifiée et autorisée. Les recherches de contamination bactérienne et de contamination fongique sont effectuées sur le même échantillon de produit. Si le contenu d'un récipient ne suffit pas, utilisez le contenu de plusieurs récipients pour ensemencer les différents milieux.

## NOMBRE MINIMAL D'UNITÉS À CONTRÔLER

Le nombre minimal d'unités à contrôler, en fonction de la taille du lot, est indiqué dans le tableau 2.6.1.-3.

*Des recommandations sur l'essai de stérilité sont données dans le chapitre général 5.1.9.*

Tableau 2.6.1.-3 – *Nombre minimal d'unités à examiner*

| **Nombre d'unités dans le lot*** | **Nombre minimal d'unités à examiner par milieu, sauf exception justifiée et autorisée**** |
|---|---|
| *Préparations parentérales* | |
| – nombre de récipients ≤ 100 | 10 pour cent des récipients, avec un minimum de 4 |
| – 100 < nombre de récipients ≤ 500 | 10 récipients |
| – nombre de récipients > 500 | 2 pour cent des récipients, avec un maximum de 20 (10 dans le cas des préparations parentérales de grand volume) |
| *Préparations ophtalmiques et autres préparations non injectables* | |
| – nombre de récipients ≤ 200 | 5 pour cent des récipients, avec un minimum de 2 |
| – nombre de récipients > 200 | 10 récipients |
| – Si le produit est conditionné en récipients unidoses, appliquez le plan indiqué ci-dessus pour les préparations parentérales | |
| *Catgut et autres fils chirurgicaux à usage vétérinaire* | 2 pour cent des emballages, avec un minimum de 5 et un maximum de 20 |
| *Produits solides en vrac* | |
| – nombre de récipients ≤ 4 | Tous les récipients |
| – 4 < nombre de récipients ≤ 50 | 20 pour cent des récipients, avec un minimum de 4 |
| – nombre de récipients > 50 | 2 pour cent des récipients, avec un minimum de 10 |

* Si la taille des lots n'est pas connue, utilisez le nombre maximal d'unités spécifié.

** Si le contenu d'un seul récipient suffit à ensemencer les 2 milieux, cette colonne indique le nombre de récipients à utiliser pour l'ensemble des 2 milieux.

**01/2008:20602**

## 2.6.2. MYCOBACTÉRIES

Si l'échantillon à examiner est susceptible d'être contaminé par des microorganismes autres que les mycobactéries, traitez-le avec une solution de décontamination appropriée, telle qu'une solution d'acétylcystéine et d'hydroxyde de sodium ou une solution de laurilsulfate de sodium.

Ensemencez 0,2 mL de l'échantillon en triple sur 2 milieux solides appropriés (on considère que les milieux Löwenstein-Jensen et Middlebrook 7H10 sont appropriés). Ensemencez 0,5 mL en triple sur un milieu liquide approprié. Laissez incuber tous les milieux à 37 °C pendant 56 jours.

Vérifiez la fertilité des milieux nutritifs en présence du produit par ensemencement d'une souche appropriée d'une espèce du genre *Mycobacterium*, par exemple une souche BCG, et si nécessaire, utilisez une substance neutralisante appropriée.

Si pendant les 8 premiers jours de l'incubation, il y a croissance de microorganismes contaminants, répétez l'essai et effectuez un essai supplémentaire de stérilité bactérienne.

Si à la fin de l'incubation, aucun milieu ne présente de croissance de mycobactéries, le produit à examiner satisfait à l'essai.

**01/2008:20607**
**corrigé 6.1**

## 2.6.7. MYCOPLASMES

Lorsque l'essai des mycoplasmes est prescrit pour une banque de cellules primaires, une banque de cellules de travail, un lot de semence virale ou des cultures de cellules témoins, il est effectué et par culture et par fluorescence en culture cellulaire. Lorsque l'essai des mycoplasmes est prescrit pour une récolte virale, un vaccin en vrac ou un lot final, il est réalisé par culture. La fluorescence en culture cellulaire peut également être utilisée, si nécessaire, pour le contrôle des milieux.

Les techniques d'amplification des acides nucléiques peuvent être utilisées comme alternative à l'une ou aux 2 autres méthodes après une validation appropriée.

### MÉTHODE PAR CULTURE

*CHOIX DES MILIEUX DE CULTURE*

L'essai est effectué en utilisant des milieux liquides et solides ; un nombre suffisant de milieux est utilisé pour permettre la croissance des mycoplasmes potentiellement présents, même en petit nombre, dans le produit à examiner. Les milieux liquides doivent contenir du rouge de phénol. Il convient de démontrer, au moins pour les microorganismes suivants, que les milieux choisis possèdent des propriétés nutritives satisfaisantes pour la croissance des microorganismes. Les propriétés nutritives de chaque nouveau lot de milieu sont vérifiées pour les microorganismes appropriés repris dans la liste. Lors de la recherche des mycoplasmes dans le produit à examiner, au moins 1 des espèces suivantes sera utilisée comme témoin positif :

– *Acholeplasma laidlawii* (vaccins pour usages humain ou vétérinaire, lorsqu'un antibiotique a été utilisé pendant la production),
– *Mycoplasma gallisepticum* (lorsqu'une substance d'origine aviaire est utilisée en production ou lorsque le vaccin est destiné à des volailles),
– *Mycoplasma hyorhinis* (vaccins pour usage vétérinaire, non aviaires),
– *Mycoplasma orale* (vaccins pour usages humain ou vétérinaire),
– *Mycoplasma pneumoniae* (vaccins pour usage humain), ou une autre espèce appropriée qui utilise le D-glucose telle que *Mycoplasma fermentans*,
– *Mycoplasma synoviae* (lorsqu'une substance d'origine aviaire est utilisée en production ou lorsque le vaccin est destiné à des volailles).

Les souches utilisées sont des isolats sauvages ayant subi un nombre limité de subcultures (au maximum 15) ; elles sont conservées congelées ou cryodesséchées. Les isolats sont identifiés selon l'espèce, après le clonage, par comparaison à des souches de collection, par exemple :

| | | | |
|---|---|---|---|
| *A. laidlawii* | NCTC 10116 | CIP 75.27 | ATCC 23206 |
| *M. gallisepticum* | NCTC 10115 | CIP 104967 | ATCC 19610 |
| *M. fermentans* | NCTC 10117 | CIP 105680 | ATCC 19989 |
| *M. hyorhinis* | NCTC 10130 | CIP 104968 | ATCC 17981 |
| *M. orale* | NCTC 10112 | CIP 104969 | ATCC 23714 |
| *M. pneumoniae* | NCTC 10119 | CIP 103766 | ATCC 15531 |
| *M. synoviae* | NCTC 10124 | CIP 104970 | ATCC 25204 |

*Acholeplasma laidlawii BRP*, *Mycoplasma fermentans BRP*, *Mycoplasma hyorhinis BRP*, *Mycoplasma orale BRP* et *Mycoplasma synoviae BRP* conviennent comme souches de référence ayant subi peu de passages.

*CONDITIONS D'INCUBATION*

Faites incuber les milieux liquides dans des récipients bien fermés à 35-38 °C. Faites incuber les milieux solides en microaérophilie (atmosphère d'azote contenant 5-10 pour cent de dioxyde de carbone et ayant un taux d'humidité suffisant pour empêcher la dessiccation de la surface de la plaque) à 35-38 °C.

*PROPRIÉTÉS NUTRITIVES*

*Effectuez l'essai des propriétés nutritives pour chaque nouveau lot de milieu.* Ensemencez les milieux choisis avec les microorganismes d'essai appropriés ; utilisez au maximum 100 UFC (unités formant colonie) par boîte d'un diamètre de 60 mm contenant 9 mL de milieu solide et par 100 mL de milieu liquide, en employant une boîte et un récipient séparés pour chaque espèce de microorganisme. Faites incuber les milieux et effectuez des subcultures de 0,2 mL des milieux liquides vers les milieux solides aux intervalles spécifiés (voir ci-après sous Recherche des mycoplasmes dans le produit à examiner). Le milieu solide satisfait à l'essai si une croissance adéquate est observée pour chaque microorganisme d'essai (la croissance obtenue ne diffère pas de plus d'un facteur 5 de la valeur calculée par rapport à l'inoculum). Le milieu liquide satisfait à l'essai si une croissance après subculture sur milieu solide est notée pour au moins 1 des subcultures pour chaque microorganisme d'essai.

*SUBSTANCES INHIBITRICES*

L'essai des substances inhibitrices est effectué 1 fois pour un produit donné et répété chaque fois qu'il y a une modification de la méthode de production pouvant avoir une influence sur la détection des mycoplasmes.

Afin de démontrer l'absence d'effet inhibiteur, effectuez l'essai des propriétés nutritives en présence et en l'absence du produit à examiner. Si la croissance d'un microorganisme d'essai se manifeste plus de 1 subculture plus tôt en l'absence du produit à examiner qu'en sa présence, ou si des plaques sur lesquelles le produit à examiner est inoculé directement présentent moins de 1/5 du nombre de colonies que celles inoculées sans le produit à examiner, celui-ci contient des substances inhibitrices qui doivent être neutralisées ou leur effet doit être éliminé par d'autres moyens, par exemple, par passage sur des substrats ne contenant pas de substances inhibitrices ou par dilution avant le test dans un volume de milieu plus important. Si l'on procède à une dilution, des volumes de milieu plus importants peuvent être utilisés ou le volume à inoculer peut être réparti entre plusieurs récipients de 100 mL. Vérifiez l'efficacité du procédé de neutralisation en répétant l'essai des substances inhibitrices après neutralisation.

*RECHERCHE DES MYCOPLASMES DANS LE PRODUIT À EXAMINER*

Ensemencez 100 mL de chaque milieu liquide avec 10 mL du produit à examiner. Si l'addition du produit à examiner entraîne une modification significative du pH, ramenez le milieu liquide à son pH initial par addition d'une solution d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique. Ensemencez 0,2 mL du produit à examiner sur chaque plaque de chaque milieu solide. Faites incuber les milieux liquides pendant 20-21 jours. Faites incuber les milieux solides pendant au minimum 14 jours, sauf ceux correspondant à la subculture du 20e ou 21e jour qui sont placés en incubation pendant 7 jours. Faites incuber en même temps 100 mL de chaque milieu liquide et des plaques de milieu solide, sans les ensemencer, en tant que témoin négatif. Du 2e au 4e jour après l'inoculation, effectuez une subculture de chaque milieu liquide en inoculant 0,2 mL sur au moins 1 plaque de chaque milieu solide. Répétez cette opération entre les 6e et 8e jours, les 13e et 15e jours et les 19e et 21e jours de l'essai. Observez les milieux liquides chaque 2e ou 3e jour et effectuez une subculture si un changement de coloration est observé. Si un milieu liquide présente une contamination bactérienne ou fongique, l'essai n'est pas valable. L'essai est valable si au moins 1 plaque peut être lue pour chaque milieu et pour chaque jour où une inoculation est pratiquée. Préparez des témoins positifs en ensemençant les milieux solide et liquide avec au maximum 100 UFC d'au moins 1 microorganisme d'essai. Si l'essai des mycoplasmes est effectué régulièrement, il est recommandé, si cela est possible, d'utiliser les différents microorganismes d'essai par rotation pour la préparation des témoins positifs. Les microorganismes d'essai utilisés sont ceux dont la liste figure sous Choix des milieux de culture.

*INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS*

A la fin de la période d'incubation prescrite, examinez au microscope tous les milieux solides ensemencés pour rechercher les colonies de mycoplasmes. Le produit à examiner satisfait à l'essai si aucune colonie typique de mycoplasmes n'est observée. Le produit à examiner ne satisfait pas à l'essai si la croissance de colonies typiques de mycoplasmes est observée sur 1 ou plusieurs milieux. L'essai n'est pas valable si 1 ou plusieurs des témoins positifs ne présentent pas de croissance de mycoplasmes sur au moins 1 des plaques de subculture. L'essai n'est pas valable si 1 ou plusieurs des témoins négatifs présentent une croissance de mycoplasmes. S'il y a un doute sur la nature des colonies observées, une méthode validée appropriée peut être utilisée pour déterminer s'il s'agit de mycoplasmes.

*La section suivante est publiée à titre d'information.*

MILIEUX RECOMMANDÉS POUR LA MÉTHODE PAR CULTURE

Les milieux suivants sont recommandés. Cependant d'autres milieux peuvent être utilisés à condition que leur aptitude à assurer la croissance des mycoplasmes ait été démontrée sur chaque lot du milieu choisi en présence et en l'absence du produit à examiner.

*MILIEUX DE CULTURE DE HAYFLICK (RECOMMANDÉS POUR LA DÉTECTION DES MYCOPLASMES EN GÉNÉRAL)*

**Milieu liquide**

| | |
|---|---|
| Bouillon d'infusion de coeur de boeuf (1) | 90,0 mL |
| Sérum de cheval (non chauffé) | 20,0 mL |
| Extrait de levure à 250 g/L | 10,0 mL |
| Rouge de phénol (solution à 0,6 g/L) | 5,0 mL |
| Pénicilline (20 000 UI/mL) | 0,25 mL |
| Acide désoxyribonucléique (solution à 2 g/L) | 1,2 mL |

Ajustez à pH 7,8.

**Milieu solide**

Il est préparé comme indiqué ci-dessus, en remplaçant le bouillon d'infusion de coeur de boeuf par de la gélose d'infusion de coeur de boeuf contenant 15 g/L de gélose.

*MILIEUX DE CULTURE DE FREY (RECOMMANDÉS POUR LA DÉTECTION DE M. SYNOVIAE)*

**Milieu liquide**

| | |
|---|---|
| Bouillon d'infusion de coeur de boeuf (1) | 90,0 mL |
| Vitamines essentielles (2) | 0,025 mL |
| Glucose monohydraté (solution à 500 g/L) | 2,0 mL |
| Sérum de porc (inactivé à 56 °C pendant 30 min) | 12,0 mL |
| β-Nicotinamide-adénine dinucléotide (solution à 10 g/L) | 1,0 mL |
| Chlorhydrate de cystéine (solution à 10 g/L) | 1,0 mL |
| Rouge de phénol (solution à 0,6 g/L) | 5,0 mL |
| Pénicilline (20 000 UI/mL) | 0,25 mL |

Mélangez la solution de β-nicotinamide-adénine dinucléotide et celle de chlorhydrate de cystéine. Laissez reposer le mélange pendant 10 min, puis ajoutez-le aux autres ingrédients. Ajustez à pH 7,8.

**Milieu solide**

| | |
|---|---|
| Bouillon d'infusion de coeur de boeuf (1) | 90,0 mL |
| Gélose purifiée (3) | 1,4 g |

Ajustez à pH 7,8 puis stérilisez à l'autoclave. Ajoutez ensuite les ingrédients suivants :

| | |
|---|---|
| Vitamines essentielles (2) | 0,025 mL |
| Glucose monohydraté (solution à 500 g/L) | 2,0 mL |
| Sérum de porc (non chauffé) | 12,0 mL |
| β-Nicotinamide-adénine dinucléotide (solution à 10 g/L) | 1,0 mL |
| Chlorhydrate de cystéine (solution à 10 g/L) | 1,0 mL |
| Rouge de phénol (solution à 0,6 g/L) | 5,0 mL |
| Pénicilline (20 000 UI/mL) | 0,25 mL |

*MILIEUX DE CULTURE DE FRIIS (RECOMMANDÉS POUR LA DÉTECTION DE MYCOPLASMES NON AVIAIRES)*

**Milieu liquide**

| | |
|---|---|
| Solution équilibrée d'électrolytes de Hanks (modifiée) (4) | 800 mL |
| Eau distillée | 67 mL |
| Infusion coeur-cerveau (5) | 135 mL |
| Bouillon PPLO (6) | 248 mL |
| Extrait de levure (170 g/L) | 60 mL |
| Bacitracine | 250 mg |
| Méticilline | 250 mg |
| Rouge de phénol (5 g/L) | 4,5 mL |
| Sérum de cheval | 165 mL |
| Sérum de porc | 165 mL |

Ajustez à pH 7,40-7,45.

**Milieu solide**

| | |
|---|---|
| Solution équilibrée d'électrolytes de Hanks (modifiée) (4) | 200 mL |
| DEAE-dextran | 200 mg |
| Gélose purifiée (3) | 15,65 g |

Mélangez soigneusement et stérilisez à l'autoclave. Faites refroidir la solution à 100 °C, puis ajoutez-la à 1740 mL du milieu liquide décrit ci-dessus.

(1) *Bouillon d'infusion de coeur de boeuf*

| | |
|---|---|
| Coeur de boeuf (destiné à préparer l'infusion) | 500 g |
| Peptone | 10 g |
| Chlorure de sodium | 5 g |
| Eau distillée *q.s.p.* | 1000 mL |

Stérilisez à l'autoclave.

(2) *Vitamines essentielles*

| | |
|---|---|
| Biotine | 100 mg |
| Pantothénate de calcium | 100 mg |
| Chlorure de choline | 100 mg |
| Acide folique | 100 mg |
| *i*-Inositol | 200 mg |
| Nicotinamide | 100 mg |
| Chlorhydrate de pyridoxal | 100 mg |
| Riboflavine | 10 mg |
| Chlorhydrate de thiamine | 100 mg |
| Eau distillée *q.s.p.* | 1000 mL |

(3) *Gélose purifiée*

Gélose hautement purifiée, utilisée en microbiologie et en immunologie, préparée par un procédé d'échange d'ions qui permet d'obtenir un produit très pur, limpide, susceptible de former un gel cohérent. Elle contient environ :

| | |
|---|---|
| Eau | 12,2 pour cent |
| Cendres | 1,5 pour cent |
| Cendres insolubles dans l'acide | 0,2 pour cent |
| Chlore | 0 |
| Phosphates (exprimés en $P_2O_5$) | 0,3 pour cent |
| Azote total | 0,3 pour cent |
| Cuivre | 8 ppm |
| Fer | 170 ppm |
| Calcium | 0,28 pour cent |
| Magnésium | 0,32 pour cent |

(4) *Solution équilibrée d'électrolytes de Hanks (modifée)*

| | |
|---|---|
| Chlorure de sodium | 6,4 g |
| Chlorure de potassium | 0,32 g |
| Sulfate de magnésium heptahydraté | 0,08 g |
| Chlorure de magnésium hexahydraté | 0,08 g |
| Chlorure de calcium anhydre | 0,112 g |
| Phosphate disodique dihydraté | 0,0596 g |
| Phosphate monopotassique anhydre | 0,048 g |
| Eau distillée *q.s.p.* | 800 mL |

(5) *Infusion coeur-cerveau*

| | |
|---|---|
| Infusion de cerveau de veau | 200 g |
| Infusion de coeur de boeuf | 250 g |
| Peptone protéose | 10 g |
| Glucose monohydraté | 2 g |
| Chlorure de sodium | 5 g |
| Phosphate disodique anhydre | 2,5 g |
| Eau distillée *q.s.p.* | 1000 mL |

(6) *Bouillon PPLO*

| | |
|---|---|
| Infusion de coeur de boeuf | 50 g |
| Peptone | 10 g |
| Chlorure de sodium | 5 g |
| Eau distillée *q.s.p.* | 1000 mL |

FLUORESCENCE EN CULTURE CELLULAIRE

Les cultures cellulaires sont colorées avec un produit fluorescent qui se lie à l'ADN. Les mycoplasmes sont détectés grâce à l'aspect caractéristique (particulaire ou filamenteux) de la fluorescence observée à la surface des cellules et, si la contamination est importante, dans l'espace environnant. Les mitochondries dans le cytoplasme peuvent être colorées mais il est possible de facilement les différencier des mycoplasmes.

Si dans le cas de suspensions virales, l'interprétation des résultats est gênée par l'existence d'effets cytopathogènes importants, il est admis de neutraliser le virus au moyen d'un immunosérum spécifique n'ayant pas d'effet inhibiteur pour les mycoplasmes ou d'employer un substrat de culture cellulaire ne permettant pas la croissance du virus. Afin de démontrer l'absence d'effet inhibiteur, effectuez l'essai avec les témoins positifs en l'absence et en présence de l'immunosérum à utiliser.

*VÉRIFICATION DU SUBSTRAT*

Utilisez des cellules Vero ou une autre culture cellulaire (par exemple, la lignée de production) qui possède une capacité équivalente pour déceler les mycoplasmes. La capacité des cellules à déceler les mycoplasmes est démontrée avec la méthode d'essai décrite ci-après en ensemençant au maximum 100 UFC ou un nombre de microorganismes équivalant à 100 UFC de souches de référence appropriées de *M. hyorhinis* et de *M. orale*. Les souches suivantes se sont avérées appropriées :

| | | | |
|---|---|---|---|
| *M. hyorhinis* | | | ATCC 29052 |
| *M. orale* | NCTC 10112 | CIP 104969 | ATCC 23714 |

Les cellules utilisées sont appropriées si les 2 souches de référence sont retrouvées dans l'essai.

Effectuez une subculture des cellules indicatrices sans antibiotique avant de les utiliser dans l'essai.

*MODE OPÉRATOIRE*

1. Ensemencez les cellules à une densité appropriée (par exemple, $2 \times 10^4$ à $2 \times 10^5$ cellules/mL, $4 \times 10^3$ à $2{,}5 \times 10^4$ cellules/cm$^2$) qui arrivera à confluence après 3 jours de croissance. Ensemencez 1 mL de produit à examiner dans le récipient à culture cellulaire et faites incuber à 35-38 °C.

2. Après au minimum 3 jours d'incubation, lorsque les cellules ont atteint la confluence, effectuez une subculture sur des lamelles ou sur une autre surface (par exemple, des lames à compartiments) qui convient à la méthode d'examen. Ensemencez les cellules à une faible densité de façon à ce qu'elles atteignent 50 pour cent de confluence après 3-5 jours d'incubation. Une confluence complète gêne la visualisation des mycoplasmes après coloration et doit être évitée.

3. Eliminez le milieu, rincez les cellules avec de la *solution saline tamponnée phosphate pH 7,4 R*, puis ajoutez une solution de fixation appropriée (un mélange extemporané de 1 volume d'*acide acétique glacial R* et de 3 volumes de *méthanol R* convient si le *bisbenzimide R* est utilisé pour la coloration).

4. Eliminez la solution de fixation et lavez les cellules avec de l'*eau R* stérile. Desséchez les lames complètement si elles doivent être colorées plus de 1 h après (une attention particulière est nécessaire si l'on veut colorer les lames après dessiccation, en raison des artéfacts qui peuvent se produire).

5. Ajoutez un colorant de l'ADN approprié et laissez reposer pendant une durée appropriée (la *solution de travail de bisbenzimide R* et un temps de repos de 10 min conviennent).

6. Eliminez le colorant et laver le tapis cellulaire avec de l'*eau R*.

7. Montez chaque lamelle, le cas échéant (un mélange à volumes égaux de *glycérol R* et de *solution tampon phosphate-citrate pH 5,5 R* convient pour monter les lamelles). Examinez par fluorescence à un grossissement de 400 × ou plus (si le bisbenzimide est utilisé comme colorant, un filtre de lumière excitatrice 330 nm/380 nm et un filtre de lumière excitatrice non absorbée LP 440 nm conviennent).

8. Comparez l'aspect microscopique des cultures d'essai à celui des témoins positifs et négatifs. Recherchez une fluorescence extranucléaire. Les mycoplasmes apparaissent sous forme de points ou de filaments dans l'espace intercellulaire. Examinez plusieurs champs microscopiques selon le protocole établi pendant la validation.

*INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS*

Le produit à examiner satisfait à l'essai si une fluorescence typique des mycoplasmes n'est pas présente. L'essai n'est pas valable si les témoins positifs ne présentent pas de fluorescence typique des mycoplasmes. L'essai n'est pas valable si les témoins négatifs présentent une fluorescence typique des mycoplasmes.

AMPLIFICATION DES ACIDES NUCLÉIQUES

Les techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) peuvent être utilisées pour la détection des mycoplasmes par amplification des acides nucléiques extraits d'un échantillon à examiner avec des amorces spécifiques permettant de révéler la présence de l'acide nucléique cible. Elles fournissent une indication sur la présence d'une séquence d'acide nucléique particulière, mais pas nécessairement sur celle de mycoplasmes viables. Plusieurs techniques sont disponibles. Le présent chapitre général ne prescrit pas l'emploi d'une méthode d'essai particulière. La procédure employée doit être validée comme décrit, en tenant compte des recommandations présentées à la fin de cette section. Lorsque l'on utilise une trousse du commerce, certains aspects de la validation peuvent être assurés par le fabricant et communiqués à l'utilisateur, mais il faut prendre garde au fait que les informations complètes relatives aux amorces ne sont pas toujours disponibles et que la production de la trousse peut être modifiée ou interrompue.

La recherche des mycoplasmes par amplification des acides nucléiques est effectuée lorsque la monographie le prescrit. Elle peut également être utilisée, après validation appropriée, en remplacement de la méthode par culture et de la méthode de fluorescence en culture cellulaire.

L'*amplification directe* peut être appliquée en présence de matériel cytotoxique et lorsqu'il est nécessaire de recourir à une méthode rapide.

L'*amplification après enrichissement en culture cellulaire* consiste à cultiver ensemble, pendant une durée convenable, l'échantillon à examiner et un substrat cellulaire approprié (comme décrit pour la méthode de fluorescence en culture cellulaire) ; la détection est ensuite effectuée par amplification des acides nucléiques extraits des cellules et du surnageant.

*VALIDATION*

L'emploi d'étalons de référence est requis à diverses étapes de la validation, et ils interviennent également comme témoins lors de l'application de l'essai en routine. Ils peuvent être constitués de mycoplasmes ou d'acides nucléiques.

Pour la validation de la limite de détection, la gamme d'espèces suivante constitue une sélection optimale en termes de fréquence d'occurrence comme contaminants et de parenté phylogénétique :

– *A. laidlawii,*
– *M. fermentans,*
– *M. hyorhinis* (en cas d'enrichissement en culture cellulaire, une souche exigeante telle que ATCC 29052 est incluse),
– *M. orale,*
– *M. pneumoniae* ou *M. gallisepticum,*
– *M. synoviae* (en cas d'utilisation de matériel aviaire ou d'exposition à ce type de matériel en cours de production),
– *Mycoplasma arginini,*
– *Spiroplasma citri* (en cas d'utilisation de matériel provenant d'insectes ou de plantes ou d'exposition à ce type de matériel en cours de production).

La démonstration de la spécificité requiert l'emploi d'une gamme appropriée d'espèces bactériennes autres que mycoplasmiques. Les genres bactériens présentant une étroite parenté phylogénétique avec les mycoplasmes sont les mieux appropriés à cette validation ; ce sont notamment les genres *Clostridium, Lactobacillus* et *Streptococcus.*

*Etudes de comparabilité pour l'emploi de l'amplification des acides nucléiques comme méthode alternative.* Il faut démontrer pour chaque espèce mycoplasmique d'essai :

– que le système d'amplification permet la détection de 10 UFC/mL, si la méthode alternative remplace la méthode par culture,
– que le système d'amplification permet la détection de 100 UFC/mL, si la méthode alternative remplace la méthode de fluorescence en culture cellulaire,

*ou* l'équivalence de la limite de détection en termes de nombre d'exemplaires de l'acide nucléique mycoplasmique dans l'échantillon à examiner (au moyen d'étalons d'acide nucléique mycoplasmique appropriés).

*TÉMOINS*

**Témoins internes**. Les témoins internes interviennent dans la vérification en routine de l'absence d'inhibition. Le témoin interne peut être une séquence nucléotidique contenant les sites de liaison de l'amorce, ou une autre séquence appropriée. Il est de préférence ajouté au matériel à examiner avant isolement de l'acide nucléique et joue par conséquent un rôle polyvalent dans le contrôle du processus (extraction, transcription inverse, amplification, détection).

**Témoins externes**. Le témoin externe positif contient un nombre défini de copies de la séquence cible ou d'UFC de 1 ou plusieurs espèces mycoplasmiques appropriées choisies parmi celles utilisées pour valider les conditions d'essai. L'un des témoins positifs, proche du seuil de réponse positive, sert à démontrer que la sensibilité attendue est atteinte. Le témoin externe négatif ne contient pas de séquence cible ; il n'est pas nécessairement constitué de la même matrice que le produit à examiner.

*INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS*

Les amorces utilisées peuvent également conduire à l'amplification d'acides nucléiques bactériens non mycoplasmiques, donc à l'obtention de résultats faussement positifs. Des procédures sont établies si nécessaire au moment de la validation pour la confirmation des résultats positifs.

*La section suivante est publiée à titre d'information.*

## Recommandations pour la validation des techniques d'amplification des acides nucléiques pour la détection des mycoplasmes

1. *OBJET*

Les techniques d'amplification des acides nucléiques sont des essais qualitatifs ou quantitatifs visant à détecter la présence d'acides nucléiques. Les essais qualitatifs conviennent pour la détection de contaminations par les mycoplasmes de divers échantillons comme des vaccins ou des substrats cellulaires, et peuvent être considérés comme des essais limites.
Les présentes recommandations décrivent des méthodes de validation des procédures d'amplification des acides nucléiques applicables aux procédures qualitatives destinées à la détection des mycoplasmes. Elles sont en outre applicables aux techniques d'amplification des acides nucléiques en temps réel servant d'essais limites pour le contrôle des contaminants.

Les 2 paramètres de validation considérés comme les plus importants sont la spécificité et la limite de détection. Il convient également d'évaluer la robustesse.

Aux fins du présent document, une procédure analytique est définie comme l'ensemble des opérations effectuées depuis l'extraction de l'acide nucléique jusqu'à la détection des produits d'amplification.

Lorsque la procédure analytique est, en totalité ou partie, mise en oeuvre à l'aide de trousses du commerce, les aspects de la validation déjà pris en charge par le fabricant, documentation à l'appui, peuvent être omis par l'utilisateur. Néanmoins, celui-ci doit démontrer les performances de la trousse par rapport à l'usage qui en est prévu (limite de détection, robustesse, détection croisée d'autres classes de bactéries, par exemple).

Les techniques d'amplification des acides nucléiques peuvent être utilisées comme :

– un essai complémentaire (pour les suspensions virales cytotoxiques, par exemple) ou à des fins de contrôle en cours de production ;
– une méthode alternative en remplacement d'une méthode officielle (fluorescence en culture cellulaire ou méthode par culture).

Les présentes recommandations distingueront donc ces 2 objectifs en présentant une première recommandation relative à la validation des techniques d'amplification des acides nucléiques elles-mêmes, et une seconde recommandation relative à l'étude de comparabilité entre techniques d'amplification des acides nucléiques et méthodes officielles.

2. *RECOMMANDATIONS POUR LA VALIDATION DES TECHNIQUES D'AMPLIFICATION DES ACIDES NUCLÉIQUES POUR LA DÉTECTION DES MYCOPLASMES*

3 paramètres doivent être évalués : la spécificité, la limite de détection et la robustesse.

2-1. **Spécificité**. La spécificité de la procédure est la capacité à permettre l'évaluation univoque de l'acide nucléique recherché, en présence des composés susceptibles de l'accompagner.

La spécificité des techniques d'amplification des acides nucléiques est fonction du choix des amorces, de celui des sondes utilisées pour l'analyse du produit final, et de la rigueur des conditions opératoires (à la fois pour les étapes d'amplification et de détection).

L'aptitude des techniques d'amplification des acides nucléiques à détecter une gamme importante d'espèces de mycoplasmes dépend elle aussi du choix des amorces, des sondes et des paramètres opératoires. Il convient de démontrer cette aptitude au moyen de collections de référence caractérisées (les souches de référence fournies par la DEQM, par exemple). Etant donné que les systèmes d'amplification des acides nucléiques se basent généralement sur un mélange d'amorces, l'analyse théorique des amorces et des sondes par comparaison avec des bases de données n'est pas recommandée car l'interprétation des résultats pourrait être relativement complexe et ne pas refléter les résultats expérimentaux.

En outre, étant donné qu'il est probable que les amorces décèleront d'autres espèces bactériennes, la détection croisée potentielle devra être documentée dans l'étude de validation. Les genres bactériens en relation phylogénétique étroite avec les mycoplasmes, comme les bactéries gram-positives, sont les plus appropriés pour cette validation ; ils comprennent *Clostridium, Lactobacillus* et *Streptococcus*. Cette liste n'est cependant pas exhaustive et les espèces à examiner dépendront de l'aptitude théorique (basée sur les séquences amorces/sondes) du système d'amplification des acides nucléiques à déceler ces autres espèces.

Sur la base des résultats de cette validation de la spécificité, si une faille dans la spécificité de la méthode est identifiée (comme la détection d'acides nucléiques bactériens non mycoplasmiques), une stratégie appropriée devra être proposée dans l'étude de validation pour permettre l'interprétation des résultats positifs en routine. Par exemple, un deuxième essai pourra être effectué en utilisant une méthode alternative sans cette faille de spécificité ou en utilisant une méthode officielle.

2-2. **Limite de détection**. La limite de détection de la procédure est la plus petite quantité d'acide nucléique recherché qui peut être détectée dans un échantillon, sans forcément pouvoir être quantifiée de façon exacte.

Pour établir la limite de détection, un seuil de réponse positive doit être déterminé pour la procédure analytique utilisant des techniques d'amplification des acides nucléiques. Le seuil de réponse positive (comme défini dans le chapitre général *2.6.21*) est le nombre minimum de séquences cibles par unité de volume qui peut être détecté dans 95 pour cent des essais. L'influence sur ce seuil de réponse positive de la répartition des génomes mycoplasmiques dans les échantillons individuels examinés, et de facteurs comme l'efficacité enzymatique peut entraîner l'obtention de différentes valeurs seuils à 95 pour cent entre les essais analytiques individuels.

Pour déterminer le seuil de réponse positive, une série de dilutions de souches de travail obtenues en interne, caractérisées et calibrées (en UFC ou en copies d'acide nucléique) ou d'étalons de la DEQM doit être examinée à des jours différents pour examiner la variation entre les essais.

Pour la validation de la limite de détection, les espèces suivantes constituent une sélection optimale en terme de fréquence de présence comme contaminants et de relation phylogénétique :

– *A. laidlawii,*
– *M. fermentans,*
– *M. hyorhinis,*
– *M. orale,*
– *M. pneumoniae* or *M. gallisepticum,*
– *M. synoviae* (en cas d'utilisation de matières d'origine aviaire ou d'exposition de telles matières en cours de production),
– *M. arginini,*
– *S. citri* (en cas d'utilisation de matières provenant de plantes ou d'insectes ou d'exposition de telles matières en cours de production).

Pour chaque souche, au moins 3 séries indépendantes de dilutions au 1/10 doivent être contrôlées avec un nombre suffisant d'exemplaires par dilution pour parvenir à un nombre total de 24 résultats d'essai pour chaque dilution et permettre une analyse statistique des résultats.

A titre d'exemple, un laboratoire peut examiner 3 séries de dilutions à des jours différents avec 8 exemplaires par dilution, ou 4 séries de dilutions à des jours différents avec 6 exemplaires par dilution, ou 6 séries de dilutions à des jours différents avec 4 exemplaires par dilution. Pour que le nombre de dilutions utilisées reste gérable, il convient d'effectuer un essai préliminaire pour avoir une première estimation du seuil de réponse positive (c'est-à-dire la plus haute dilution donnant un signal positif). On peut alors procéder aux dilutions de façon à encadrer cette valeur préestimée. La teneur en mycoplasmes (UFC ou copies) qui peut être détectée lors de 95 pour cent des analyses peut alors être calculée par une méthode statistique appropriée.

Ces résultats peuvent également servir à établir la variabilité de la procédure analytique.

2-3. **Robustesse**. La robustesse de la procédure mesure sa capacité à ne pas être affectée par des modifications faibles, mais délibérées, de paramètres opératoires ; elle donne une indication de la fiabilité de la procédure dans les conditions normales d'application.

L'évaluation de la robustesse est un aspect à considérer lors de la phase de développement. Elle permet d'établir la fiabilité de la procédure analytique face à des variations délibérées de paramètres opératoires. Dans les techniques d'amplification des acides nucléiques, de légères variations de certains paramètres peuvent avoir une importance cruciale. Néanmoins, il est possible de démontrer la robustesse de la méthode lors de son développement, lorsque l'on étudie l'influence de petites variations de concentration de certains réactifs ($MgCl_2$, amorces ou désoxyribonucléotides par exemple). Les modifications des

trousses d'extraction ou des procédures d'extraction ainsi que différents types de thermocycleurs peuvent également être évalués.

Enfin, l'évaluation de la robustesse de la méthode peut se faire à travers des études collaboratives.

3. *RECOMMANDATIONS POUR L'ÉTUDE DE COMPARABILITÉ*

Les techniques d'amplification des acides nucléiques peuvent être utilisées en remplacement des méthodes officielles (fluorescence en culture cellulaire et/ou méthode par culture). Dans ce cas, une étude de comparabilité doit être menée. Cette étude doit principalement comprendre une comparaison des limites de détection respectives de la méthode alternative et des méthodes officielles. Cependant, il convient également de prendre la spécificité en considération (gamme des mycoplasmes décelés, faux positifs présumés).

En ce qui concerne la limite de détection, les critères d'acceptation sont définis comme suit :

– si la méthode alternative est proposée en remplacement de la méthode par culture, il doit être démontré que le système de techniques d'amplification des acides nucléiques permet de déceler 10 UFC/mL pour chacune des espèces de mycoplasmes à examiner décrites dans le paragraphe 2-2 ;
– si la méthode alternative est proposée en remplacement de la fluorescence en culture cellulaire, il doit être démontré que le système de techniques d'amplification des acides nucléiques permet de déceler 100 UFC/mL pour chacune des espèces de mycoplasmes à examiner décrites dans le paragraphe 2-2.

Dans les 2 cas, des étalons appropriés calibrés en fonction du nombre de copies d'acide nucléique et du nombre d'UFC peuvent être utilisés pour démontrer le respect des critères d'acceptation. La relation entre les UFC et les copies d'acide nucléique pour les préparations de référence devra préalablement être établie pour comparer la performance de la méthode alternative utilisant les techniques d'amplification des acides nucléiques avec la performance des méthodes officielles.

Cette étude de comparabilité peut être menée selon 2 stratégies :

– soit en effectuant en parallèle la méthode alternative utilisant les techniques d'amplification des acides nucléiques et la/les méthode(s) officielle(s) pour évaluer simultanément la limite de détection des 2 méthodes, en utilisant les mêmes échantillons de souches calibrées ;
– soit en comparant la performance de la méthode alternative utilisant les techniques d'amplification des acides nucléiques avec des données obtenues préalablement lors de la validation de la méthode officielle. Dans ce cas, une documentation minutieuse devra détailler le calibrage des étalons utilisés pour les 2 validations ainsi que leur stabilité.

Les rapports d'étude de comparabilité doivent décrire tous les éléments de validation décrits dans la section 2 (spécificité, limite de détection et variabilité, ainsi que robustesse), pour pouvoir évaluer l'ensemble des avantages et désavantages de la méthode alternative utilisant les techniques d'amplification des acides nucléiques par rapport aux méthodes officielles.

**01/2008:20608**

## 2.6.8. PYROGÈNES

L'essai consiste à mesurer l'élévation de température provoquée chez le lapin par l'injection intraveineuse d'une solution stérile du produit à examiner.

*Sélection des animaux.* L'essai est pratiqué sur des lapins adultes, en bonne santé, mâles ou femelles, dont la masse n'est pas inférieure à 1,5 kg, nourris suivant un régime complet, équilibré et exempt d'antibiotiques, et dont la masse corporelle n'a subi aucune diminution au cours de la semaine précédant l'essai. Ne pas retenir les lapins :

a) qui ont été utilisés dans une recherche négative de pyrogènes pendant les 3 jours précédents,

b) qui ont été utilisés dans les 3 semaines précédentes dans un essai ayant révélé la présence de pyrogènes.

*Stabulation des animaux.* Maintenez les lapins individuellement dans un lieu tranquille à une température uniforme appropriée. Privez les lapins de nourriture pendant la nuit précédant l'essai et jusqu'à la fin de celui-ci ; privez-les également d'eau pendant l'essai. Effectuez l'essai dans un lieu tranquille où aucune perturbation ne risque d'exciter les animaux et dont la température ambiante ne s'écarte pas de plus de 3 °C de celle de la pièce où les lapins ont séjourné pendant au moins les 18 h qui précèdent l'essai.

*Appareillage.* Verrerie, seringues et aiguilles. La verrerie, les seringues et les aiguilles utilisées dans l'essai sont lavées soigneusement avec de l'eau pour préparations injectables et stérilisées dans un four à air chaud à 250 °C pendant 30 min ou à 200 °C pendant 1 h.

*Dispositif de fixation.* Les lapins, dont la température est mesurée au moyen d'un appareil électrique, sont placés dans des boîtes munies d'un dispositif qui maintient l'animal par la nuque à l'aide d'un collier spécial non serré. Ce dispositif laissant libre le reste du corps du lapin, lui permet de garder une position normale. Les animaux ne sont pas immobilisés par des courroies ou par des moyens analogues, susceptibles de présenter un danger pour eux. Ils sont placés dans les boîtes 1 h au moins avant le premier enregistrement de la température et y restent jusqu'à ce que l'essai soit achevé.

*Thermomètres.* Le thermomètre ou le dispositif électrique utilisé indique la température avec une précision de 0,1 °C. Il est introduit dans le rectum du lapin à une profondeur de 5 cm environ, cette profondeur restant constante pour chaque lapin dans un essai donné. S'il s'agit d'un dispositif électrique, il peut être maintenu en position pendant toute la durée de l'essai.

*Essai préliminaire.* Un à trois jours avant l'essai du produit, traitez, parmi les animaux sélectionnés au préalable, ceux qui n'ont pas été utilisés pendant les 2 dernières semaines, en leur injectant par voie intraveineuse et par kilogramme de masse corporelle, 10 mL d'une solution apyrogène de *chlorure de sodium R* à 9 g/L chauffée à une température voisine de 38,5 °C. Mesurez la température de chaque lapin à partir de 90 min au moins avant l'injection et pendant les 3 h qui suivent. L'animal accusant une variation de température supérieure à 0,6 °C n'est pas utilisé.

*Essai définitif.* Effectuez l'essai sur un groupe de 3 lapins.

Préparation et inoculation de l'échantillon. Chauffez au préalable à 38,5 °C environ les liquides à examiner. L'échantillon à examiner peut être dissous ou dilué dans une solution apyrogène de *chlorure de sodium R* à 9 g/L ou autre liquide prescrit. Injectez lentement la solution dans la veine marginale de l'oreille du lapin, la durée de l'injection ne dépassant pas 4 min sauf autre indication dans la monographie. La quantité à injecter varie suivant le produit à examiner et est indiquée dans la monographie. Cette quantité n'est pas inférieure à 0,5 mL, ni supérieure à 10 mL par kilogramme de masse corporelle de l'animal.

Détermination des températures initiale et maximale. La « température initiale » de chaque lapin est la moyenne de 2 valeurs déterminées à un intervalle de 30 min dans les 40 min précédant l'injection de la solution à examiner ; la « température maximale » est la température la plus élevée notée dans les 3 h suivant l'injection de la solution à examiner. Mesurez la température de chaque lapin à des intervalles réguliers de 30 min au maximum à partir de 90 min au moins avant l'injection de la solution à examiner et pendant les 3 h qui suivent. La réponse de l'animal est définie par la différence entre la température maximale et la température initiale moyenne de chaque lapin. Lorsque cette différence de température est négative, le résultat doit être considéré comme étant zéro.

Excluez de l'essai les lapins accusant une variation de température dépassant 0,2 °C entre 2 lectures successives dans la détermination de la température initiale et utilisez seulement les lapins dont les températures initiales ne s'écartent pas les

unes des autres de plus de 1 °C. Tout lapin dont la température initiale est supérieure à 39,8 °C ou inférieure à 38,0 °C doit être exclu de l'essai.

*Interprétation des résultats.* Selon les résultats obtenus, l'essai effectué d'abord sur un groupe de 3 lapins peut être répété sur d'autres groupes de 3 lapins jusqu'à concurrence de 4 groupes. La substance satisfait à l'essai si la somme des réponses du premier groupe n'est pas supérieure à la valeur indiquée dans la deuxième colonne du tableau 2.6.8.-1. ci-après. Si la somme des réponses se situe au-delà de la valeur indiquée dans la deuxième colonne mais en-deçà de la valeur indiquée dans la troisième colonne du tableau, répétez l'essai comme indiqué ci-dessus. Si la somme des réponses est supérieure à la valeur donnée dans la troisième colonne, le produit ne satisfait pas à l'essai.

Les animaux utilisés dans un essai des pyrogènes où l'augmentation moyenne de la température est supérieure à 1,2 °C sont éliminés définitivement.

Tableau 2.6.8.-1

| Nombre de lapins | Le produit satisfait à l'essai si la somme des réponses n'est pas supérieure à : | Le produit ne satisfait pas à l'essai si la somme des réponses est supérieure à : |
|---|---|---|
| 3 | 1,15 °C | 2,65 °C |
| 6 | 2,80 °C | 4,30 °C |
| 9 | 4,45 °C | 5,95 °C |
| 12 | 6,60 °C | 6,60 °C |

**01/2008:20609**

## 2.6.9. TOXICITÉ ANORMALE

ESSAI GÉNÉRAL

Dissolvez la substance à examiner dans 0,5 mL d'*eau pour préparations injectables R* ou d'une solution stérile de *chlorure de sodium R* à 9 g/L. Injectez par voie intraveineuse à 5 souris saines pesant chacune de 17 g à 24 g, la quantité de substance à examiner indiquée dans la monographie. La durée de l'injection est de 15 s à 30 s sauf indication contraire dans la monographie.

Le résultat est satisfaisant si aucun des animaux ne meurt dans les 24 h ou pendant la période d'observation indiquée dans la monographie. Si plus d'un animal meurt, le produit examiné doit être rejeté. Si l'un des animaux meurt, répétez l'essai. Le résultat est satisfaisant si aucun des animaux du 2$^{nd}$ groupe ne meurt au cours de la période d'observation prescrite.

ESSAI PARTICULIER AUX IMMUNOSÉRUMS ET VACCINS POUR USAGE HUMAIN

Sauf indication contraire dans la monographie, injectez par voie intrapéritonéale à 5 souris saines, pesant chacune de 17 g à 24 g, une dose humaine de la préparation à examiner (la dose humaine est la dose de la préparation à examiner indiquée sur l'étiquette ou dans une notice jointe à l'emballage) sans dépasser 1,0 mL par animal. Observez les animaux pendant 7 jours.

Le résultat est satisfaisant si aucun des animaux ne manifeste de signes de maladie. Si plus d'un animal meurt, le produit examiné doit être rejeté. Si l'un des animaux meurt ou manifeste des signes de maladie, répétez l'essai. Le produit satisfait à l'essai si aucun des animaux du 2$^{nd}$ groupe ne meurt ou ne manifeste de signes de maladie au cours de la période d'observation prescrite.

Effectuez également un essai sur 2 cobayes en bonne santé pesant chacun de 250 g à 400 g en injectant par voie intrapéritonéale, à chacun d'entre eux, une dose humaine, sans toutefois dépasser 5,0 mL par animal. Observez les animaux pendant 7 jours.

Le résultat est satisfaisant si aucun des animaux ne manifeste de signes de maladie. Si plus d'un animal meurt, le produit examiné doit être rejeté. Si l'un des animaux meurt ou manifeste des signes de maladie, répétez l'essai. Le produit satisfait à l'essai si aucun des animaux du 2$^{nd}$ groupe ne meurt ou ne manifeste de signes de maladie au cours de la période d'observation prescrite.

**01/2008:20610**

## 2.6.10. HISTAMINE

Euthanasiez un cobaye pesant de 250 g à 350 g, à jeun depuis 24 h. Prélevez un fragment de 2 cm de longueur de la partie distale de l'intestin grêle et videz le fragment isolé de son contenu en le rinçant soigneusement au moyen d'une seringue avec la solution B décrite ci-après. Liez à l'aide d'un fil mince les 2 extrémités et pratiquez une légère incision transversale à mi-hauteur du fragment. Introduisez-le dans un bain à organes de 10 mL à 20 mL de capacité, rempli de solution B maintenue à une température constante de 34 °C à 36 °C, et soumise à un barbotage d'un gaz composé d'un mélange de 95 parties d'oxygène et de 5 parties de dioxyde de carbone. Fixez l'un des fils près du fond du bain à organes. Fixez l'autre fil à un myographe isotonique permettant d'inscrire les contractions sur un kymographe ou sur un autre dispositif capable d'enregistrer des données de façon permanente. Si un levier est utilisé, sa longueur doit être telle que les contractions se trouvent amplifiées 20 fois environ. La tension exercée sur l'organe est de 9,8 mN (1 g) environ et elle doit être modifiée suivant sa sensibilité. Renouvelez la solution B dans le bain à organes. Laissez reposer pendant 10 min, puis renouvelez 2 ou 3 fois la solution B. Provoquez une série de contractions par addition de volumes mesurés de 0,2 mL à 0,5 mL de solution de *dichlorhydrate d'histamine R* en concentration appropriée de façon à obtenir des réponses submaximales et reproductibles. Cette dose est la « dose supérieure ». Avant chaque addition d'histamine, lavez le bain à organes à 3 reprises avec la solution B (de préférence en le laissant déborder au lieu de le laisser se vider). Ajoutez les doses successives d'histamine à des intervalles réguliers qui permettent un relâchement complet entre 2 additions (2 min environ). Ajoutez des volumes égaux d'une solution de *dichlorhydrate d'histamine R* en concentration plus faible que celle déjà mentionnée, de façon à provoquer des réponses reproductibles d'environ la moitié de celles provoquées par la dose supérieure. Cette dose est la « dose inférieure ». Continuez d'ajouter à intervalles réguliers les doses supérieure et inférieure comme indiqué ci-dessus, et, entre chaque addition, ajoutez le même volume d'une dilution de la solution à examiner, la concentration de la dilution étant ajustée de façon à ce que la contraction éventuelle provoquée dans l'iléon soit plus faible que celle provoquée par la dose supérieure d'histamine. Assurez-vous que la contraction éventuelle provoquée par la substance à examiner est reproductible et que les réponses de l'iléon aux doses supérieure et inférieure d'histamine restent constantes. Calculez l'activité de la substance à examiner en équivalent de microgrammes d'histamine base à partir de la dilution déterminée dans l'expérience susmentionnée. La quantité ainsi déterminée n'est pas supérieure à la limite prescrite dans la monographie.

Si la substance à examiner ne provoque pas de contraction de l'iléon, préparez une nouvelle solution de la substance à examiner en ajoutant une quantité d'histamine qui corresponde au maximum toléré dans la monographie et notez si la contraction provoquée par cette dernière solution correspond à la quantité d'histamine qu'elle contient. Si ce n'est pas le cas ou si les contractions de l'iléon provoquées par la substance à examiner ne sont pas reproductibles ou si les réponses de l'iléon aux doses supérieure et inférieure d'histamine diminuent, les résultats de l'expérience ne sont pas significatifs. Procédez alors à la recherche des substances hypotensives (*2.6.11*).

La solution B doit être utilisée dans les 24 h qui suivent sa préparation.

**Solution A**

| | |
|---|---|
| Chlorure de sodium | 160,0 g |
| Chlorure de potassium | 4,0 g |
| Chlorure de calcium anhydre | 2,0 g |
| Chlorure de magnésium anhydre | 1,0 g |
| Phosphate disodique dodécahydraté | 0,10 g |
| *Eau pour préparations injectables R* | *q.s.p.* 1000 mL |

**Solution B**

| | |
|---|---|
| Solution A | 50,0 mL |
| Sulfate d'atropine | 0,5 mg |
| Bicarbonate de sodium | 1,0 g |
| Glucose monohydraté | 0,5 g |
| *Eau pour préparations injectables R* | *q.s.p.* 1000 mL |

**01/2008:20611**

# 2.6.11. SUBSTANCES HYPOTENSIVES

Effectuez l'essai sur un chat pesant au moins 2 kg, anesthésié avec du chloralose ou avec un barbiturique permettant de maintenir une pression sanguine uniforme. Protégez l'animal contre d'éventuelles pertes de chaleur afin de maintenir sa température rectale dans les limites physiologiques. Introduisez une canule dans la trachée du chat et une canule remplie d'une solution héparinée de chlorure de sodium à 9 g/L dans l'artère carotide commune, et reliez-la à un dispositif susceptible de donner un enregistrement continu de la pression du sang. Introduisez dans la veine fémorale un autre tube rempli de solution héparinée de chlorure de sodium à 9 g/L à travers lequel peuvent être injectées les solutions d'histamine et de la substance à examiner. Déterminez la sensibilité de l'animal à l'histamine en injectant par voie intraveineuse à des intervalles réguliers, des doses de *solution d'histamine R* qui correspondent à 0,1 µg et à 0,15 µg d'histamine base par kilogramme de masse corporelle. Répétez au moins 3 fois l'injection de la dose inférieure. Effectuez la deuxième injection et les suivantes au moins 1 min après que la pression sanguine est revenue au niveau qu'elle occupait immédiatement avant l'injection précédente. L'animal n'est utilisé pour l'essai que si l'on obtient une chute de la pression sanguine facilement discernable et constante pour la dose inférieure et si une dose plus élevée provoque des réponses plus fortes. Dissolvez la substance à examiner dans une quantité suffisante d'une solution de chlorure de sodium à 9 g/L ou dans tout autre solvant prescrit, pour obtenir la concentration indiquée. Injectez par voie intraveineuse, par kilogramme de masse corporelle, 1,0 mL de *solution d'histamine R,* puis successivement à 2 reprises, la quantité prescrite de la solution à examiner et, finalement 1,0 mL de *solution d'histamine R.* Effectuez les deuxième, troisième et quatrième injections 1 min au minimum après que la pression sanguine est revenue au niveau qu'elle occupait immédiatement avant l'injection précédente. Répétez 2 fois cette série d'injections et, pour terminer, injectez 1,5 mL de *solution d'histamine R* par kilogramme de masse corporelle.

L'essai n'est significatif que si la réponse obtenue après l'addition de 1,5 mL de *solution d'histamine R* par kilogramme de masse corporelle de l'animal est plus grande que celle obtenue après l'administration de 1,0 mL. La substance à examiner ne satisfait pas à l'essai si la moyenne des séries de réponses à la substance à examiner est supérieure à la moyenne des réponses à 1,0 mL de *solution d'histamine R,* par kilogramme de masse corporelle, ou si une des doses administrées provoque une hypotension plus marquée que celle provoquée par la dernière dose d'histamine. Dans ce dernier cas, l'animal ne doit plus être employé dans les recherches des substances hypotensives. Il en est de même lorsque la réponse de l'animal à la dose supérieure d'histamine injectée, après la substance à examiner, est inférieure à la moyenne des réponses aux doses inférieures d'histamine administrées auparavant.

**07/2010:20612**

# 2.6.12. CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE DES PRODUITS NON STÉRILES : ESSAIS DE DÉNOMBREMENT MICROBIEN(1)

1. INTRODUCTION

Les essais décrits ci-après permettent le dénombrement des bactéries mésophiles et des moisissures et levures capables de croître en aérobiose.

Ces essais sont en premier lieu destinés à déterminer si une substance ou préparation satisfait à une spécification préétablie en matière de qualité microbiologique. Il convient dans ce cas de se conformer aux indications données ci-après, notamment en ce qui concerne le nombre d'échantillons à prélever et l'interprétation des résultats.

Les méthodes décrites ne sont pas applicables aux produits contenant des microorganismes viables en tant qu'ingrédients actifs.

D'autres méthodes microbiologiques, notamment des méthodes automatisées, peuvent être utilisées à condition que leur équivalence avec la méthode de la Pharmacopée ait été démontrée.

2. PRÉCAUTIONS GÉNÉRALES

Réalisez le dénombrement dans des conditions permettant d'éviter toute contamination microbienne extrinsèque du produit à examiner. Les précautions prises pour éviter la contamination ne doivent pas affecter les microorganismes susceptibles d'être mis en évidence.

Si le produit à examiner possède une activité antimicrobienne, celle-ci est autant que possible éliminée ou neutralisée. Si des neutralisants de l'activité antimicrobienne sont utilisés à cet effet, leur efficacité et leur absence de toxicité à l'égard des microorganismes considérés doivent être démontrées.

Si des substances tensioactives sont utilisées pour la préparation des échantillons, leur absence de toxicité à l'égard des microorganismes considérés et leur compatibilité avec les neutralisants utilisés doivent être démontrées.

3. MÉTHODES DE DÉNOMBREMENT

Utilisez la filtration sur membrane ou le dénombrement sur plaque, selon que l'une ou l'autre méthode est prescrite. La méthode dite du nombre le plus probable (NPP), bien que généralement moins exacte que les autres méthodes de dénombrement microbien, peut néanmoins être la plus adaptée pour certains groupes de produits présentant une biocharge très faible.

Le choix de la méthode est déterminé par des facteurs tels que la nature du produit et la limite spécifiée pour le nombre de microorganismes. Quelle que soit la méthode choisie, elle doit permettre d'effectuer l'essai sur un échantillon de taille suffisante pour permettre l'évaluation de la conformité aux spécifications, et il convient d'établir l'applicabilité de cette méthode.

4. FERTILITÉ DES MILIEUX, APPLICABILITÉ DE LA MÉTHODE DE DÉNOMBREMENT ET TÉMOINS NÉGATIFS

4-1. *CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES*

L'aptitude de l'essai à permettre la détection des microorganismes en présence du produit doit être établie.

(1) Ce chapitre a fait l'objet du processus d'harmonisation des pharmacopées. Voir chapitre *5.8. Harmonisation des pharmacopées.*

L'applicabilité de la méthode d'essai doit être confirmée chaque fois qu'un changement susceptible d'affecter le résultat de l'essai est apporté au mode opératoire ou au produit.

4-2. *PRÉPARATION DES SOUCHES DE RÉFÉRENCE*

Utilisez des suspensions standardisées stables des souches de référence ou préparez des suspensions comme indiqué ci-après. Les cultures sont effectuées selon un système de lot de semence tel que les microorganismes viables utilisés pour l'inoculation n'aient pas subi plus de 5 passages à partir du lot de semence primaire d'origine. Cultivez séparément chacune des souches bactériennes et fongiques de référence comme indiqué dans le tableau 2.6.12.-1.

Utilisez de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0 ou de la solution tampon phosphate pH 7,2 pour préparer les suspensions témoins ; pour mettre en suspension les spores d'*A. brasiliensis*, 0,05 pour cent de polysorbate 80 peuvent être ajoutés au tampon. Utilisez les suspensions dans les 2 h, ou dans les 24 h si elles sont conservées à 2-8 °C. On peut également, plutôt que de préparer puis diluer une suspension fraîche de cellules végétatives d'*A. brasiliensis* ou de *B. subtilis*, préparer une suspension de spores stable puis en utiliser un volume approprié pour l'inoculation. Cette suspension peut être maintenue à 2-8 °C pendant une durée validée.

4-3. *TÉMOIN NÉGATIF*

Pour vérifier les conditions opératoires, effectuez un contrôle sur un témoin négatif préparé en substituant le diluant choisi à la préparation à examiner. Aucune croissance microbienne n'est observée. Un contrôle sur un témoin négatif est également effectué lors de l'examen du produit comme décrit dans la section 5. L'obtention d'un résultat non conforme nécessite une investigation.

Tableau 2.6.12.-1. – *Préparation et emploi des microorganismes de référence*

| **Microorganisme** | **Préparation de la souche de référence** | **Fertilité des milieux** | | **Applicabilité de la méthode de dénombrement en présence du produit** | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **Germes aérobies totaux** | **Moisissures et levures** | **Germes aérobies totaux** | **Moisissures et levures** |
| *Staphylococcus aureus*<br>par exemple :<br>ATCC 6538<br>NCIMB 9518<br>CIP 4.83<br>NBRC 13276 | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ou milieu liquide aux peptones de caséine et de soja<br>30-35 °C<br>18-24 h | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja et milieu liquide aux peptones de caséine et de soja<br>≤ 100 UFC<br>30-35 °C<br>≤ 3 jours | - | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja/NPP : milieu liquide aux peptones de caséine et de soja<br>≤ 100 UFC<br>30-35 °C<br>≤ 3 jours | - |
| *Pseudomonas aeruginosa*<br>par exemple :<br>ATCC 9027<br>NCIMB 8626<br>CIP 82.118<br>NBRC 13275 | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ou milieu liquide aux peptones de caséine et de soja<br>30-35 °C<br>18-24 h | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja et milieu liquide aux peptones de caséine et de soja<br>≤ 100 UFC<br>30-35 °C<br>≤ 3 jours | - | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja/NPP : milieu liquide aux peptones de caséine et de soja<br>≤ 100 UFC<br>30-35 °C<br>≤ 3 jours | - |
| *Bacillus subtilis*<br>par exemple :<br>ATCC 6633<br>NCIMB 8054<br>CIP 52.62<br>NBRC 3134 | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ou milieu liquide aux peptones de caséine et de soja<br>30-35 °C<br>18-24 h | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja et milieu liquide aux peptones de caséine et de soja<br>≤ 100 UFC<br>30-35 °C<br>≤ 3 jours | - | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja/NPP : milieu liquide aux peptones de caséine et de soja<br>≤ 100 UFC<br>30-35 °C<br>≤ 3 jours | - |
| *Candida albicans*<br>par exemple :<br>ATCC 10231<br>NCPF 3179<br>IP 48.72<br>NBRC 1594 | Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé ou milieu liquide Sabouraud dextrosé<br>20-25 °C<br>2-3 jours | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja<br>≤ 100 UFC<br>30-35 °C<br>≤ 5 jours | Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé<br>≤ 100 UFC<br>20-25 °C<br>≤ 5 jours | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja<br>≤ 100 UFC<br>30-35 °C<br>≤ 5 jours<br>NPP : non applicable | Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé<br>≤ 100 UFC<br>20-25 °C<br>≤ 5 jours |
| *Aspergillus brasiliensis*<br>par exemple :<br>ATCC 16404<br>IMI 149007<br>IP 1431.83<br>NBRC 9455 | Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé ou milieu dextrosé-gélosé à la pomme de terre<br>20-25 °C<br>5-7 jours, ou jusqu'à sporulation satisfaisante | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja<br>≤ 100 UFC<br>30-35 °C<br>≤ 5 jours | Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé<br>≤ 100 UFC<br>20-25 °C<br>≤ 5 jours | Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja<br>≤ 100 UFC<br>30-35 °C<br>≤ 5 jours<br>NPP : non applicable | Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé<br>≤ 100 UFC<br>20-25 °C<br>≤ 5 jours |

4-4. *FERTILITÉ DES MILIEUX*

Effectuez ce contrôle sur chaque lot de milieu, qu'il soit acheté prêt à l'emploi ou préparé à partir d'un milieu déshydraté ou des ingrédients décrits.

Ensemencez des fractions/plaques de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja et de milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja avec un petit nombre (au maximum 100 UFC) des microorganismes indiqués dans le tableau 2.6.12.-1, en utilisant pour chacun une fraction/plaque de milieu séparée. Ensemencez des plaques de milieu Sabouraud dextrosé-gélosé avec un petit nombre (au maximum 100 UFC) des microorganismes indiqués dans le tableau 2.6.12.-1, en utilisant pour chacun une plaque de milieu séparée. Incubez dans les conditions spécifiées dans le tableau 2.6.12.-1.

Pour les milieux solides, la croissance obtenue ne doit pas différer de plus d'un facteur 2 de la valeur calculée pour un inoculum standardisé. Pour les inoculums récemment préparés, la croissance des microorganismes doit être comparable à celle observée avec un lot de milieu précédemment contrôlé et approuvé. Les milieux liquides conviennent si l'on observe une croissance clairement visible des microorganismes, comparable à celle obtenue sur un lot de milieu précédemment contrôlé et approuvé.

4-5. *APPLICABILITÉ DE LA MÉTHODE DE DÉNOMBREMENT EN PRÉSENCE DU PRODUIT*

4-5-1. **Préparation des échantillons**. La méthode de préparation des échantillons dépend des caractéristiques physiques du produit à examiner. Si aucune des procédures décrites ci-après ne s'avère satisfaisante, il est nécessaire de développer une autre procédure.

*Produits hydrosolubles.* Dissolvez ou diluez le produit à examiner (on prépare généralement une dilution au 1/10) dans de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0, de la solution tampon phosphate pH 7,2 ou du milieu liquide aux peptones de caséine et de soja. Ajustez si nécessaire à pH 6-8. Les dilutions suivantes, le cas échéant, sont préparées avec le même diluant.

*Produits de nature non lipidique insolubles dans l'eau.* Mettez le produit à examiner en suspension (on prépare généralement une dilution au 1/10) dans de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0, de la solution tampon phosphate pH 7,2 ou du milieu liquide aux peptones de caséine et de soja. Un agent tensioactif tel que du polysorbate 80 à la concentration de 1 g/L peut être ajouté pour faciliter la mise en suspension des substances difficilement mouillables. Ajustez si nécessaire à pH 6-8. Les dilutions suivantes, le cas échéant, sont préparées avec le même diluant.

*Produits de nature lipidique.* Dissolvez le produit à examiner dans du myristate d'isopropyle stérilisé par filtration, ou mélangez-le avec la quantité minimum requise de polysorbate 80 stérile ou d'un autre agent tensioactif non inhibiteur stérile, chauffé si nécessaire à une température ne dépassant pas 40 °C ou dans certains cas exceptionnels 45 °C. Mélangez soigneusement et maintenez si nécessaire à la température voulue, dans un bain-marie. Ajoutez le diluant choisi, préalablement chauffé, en quantité requise pour obtenir une dilution au 1/10 du produit initial. Mélangez soigneusement tout en maintenant à la même température pendant le temps minimum nécessaire à la formation d'une émulsion. Les dilutions au 1/10 suivantes peuvent être préparées avec le diluant choisi additionné d'une quantité appropriée de polysorbate 80 stérile ou d'un autre agent tensioactif non inhibiteur stérile.

*Produits liquides ou solides sous forme d'aérosols.* Transférez aseptiquement le produit dans une membrane filtrante ou dans un récipient stérile, pour les échantillonnages suivants. Utilisez pour chacun des récipients à examiner soit la totalité du contenu, soit un nombre défini de doses (aérosols à valve doseuse).

*Dispositifs transdermiques.* Retirez le film protecteur des dispositifs transdermiques et placez ces derniers, face adhésive vers le haut, sur des plateaux de verre ou de plastique stériles. Couvrez la face adhésive avec une matière poreuse stérile, par exemple de la gaze stérile, pour éviter que les dispositifs transdermiques ne collent les uns aux autres, et transférez les dispositifs dans un volume approprié du diluant choisi contenant des inactivateurs tels que du polysorbate 80 et/ou de la lécithine. Agitez énergiquement pendant au moins 30 min.

4-5-2. **Inoculation et dilution**. Ajoutez à l'échantillon préparé comme décrit ci-dessus (4-5-1) et à un témoin (ne contenant pas le produit à examiner) un volume de la suspension microbienne suffisant pour obtenir un inoculum d'au maximum 100 UFC. Le volume de suspension utilisé ne doit pas dépasser 1 pour cent du volume du produit dilué.

Pour démontrer que le recouvrement microbien est acceptable, il faut effectuer l'essai sur l'échantillon préparé avec le plus bas facteur de dilution possible. Si l'activité antimicrobienne ou la faible solubilité du produit l'interdit, un protocole spécifique doit être développé. S'il est impossible d'éviter autrement une inhibition de la croissance par l'échantillon, on peut procéder à une neutralisation, dilution ou filtration avant addition de la suspension microbienne.

4-5-3. **Neutralisation/élimination de l'activité antimicrobienne**. Comparez le recouvrement microbien respectivement obtenu à partir de l'échantillon préparé, dilué comme décrit en 4-5-2 et incubé selon la procédure décrite en 4-5-4, et de la préparation témoin.

En cas d'inhibition de la croissance (réduction de plus d'un facteur 2), apportez à la procédure suivie pour l'essai de dénombrement concerné les modifications nécessaires pour garantir la validité des résultats. Ces modifications peuvent par exemple consister en (1) une augmentation du volume du diluant ou du milieu de culture, (2) l'incorporation au diluant d'agents neutralisants spécifiques ou généraux, (3) une filtration sur membrane ou (4) une combinaison des modifications précitées.

*Agents neutralisants.* Des agents peuvent être utilisés pour neutraliser l'activité de substances antimicrobiennes interférentes (tableau 2.6.12.-2). Ils peuvent être ajoutés au diluant choisi ou au milieu, de préférence avant la stérilisation. L'efficacité de tout neutralisant utilisé et son absence de toxicité à l'égard des microorganismes doivent être démontrées au moyen d'un blanc comportant le neutralisant mais non le produit.

Tableau 2.6.12.-2. – *Agents usuels de neutralisation des substances interférentes*

| Substance interférente | Méthode de neutralisation possible |
|---|---|
| Glutaraldéhyde, mercuriels | Hydrogénosulfite de sodium (bisulfite de sodium) |
| Phénoliques, alcool, aldéhydes, sorbate | Dilution |
| Aldéhydes | Glycine |
| Ammoniums quaternaires (QAC), parahydroxybenzoates (parabènes), bis-biguanides | Lécithine |
| QAC, iode, parabènes | Polysorbate |
| Mercuriels | Thioglycolate |
| Mercuriels, halogènes, aldéhydes | Thiosulfate |
| EDTA (édétate) | Ions $Mg^{2+}$ ou $Ca^{2+}$ |

Si aucune méthode de neutralisation appropriée ne peut être identifiée, on peut présumer que l'impossibilité d'isoler le microorganisme inoculé est imputable à l'activité microbicide du produit. Cette information tend à indiquer que le produit n'est pas susceptible d'être contaminé par l'espèce considérée du microorganisme. Il est cependant possible que le produit inhibe certains des microorganismes spécifiés ici, mais n'en inhibe pas d'autres qui ne figurent pas parmi les souches de référence ou dont ces dernières ne sont pas représentatives. Il convient donc d'effectuer l'essai au plus haut facteur de dilution qui soit compatible avec une croissance microbienne et le critère d'acceptation spécifique.

4-5-4. **Recouvrement de microorganismes en présence du produit**. Effectuez des essais séparés pour chacun de microorganismes cités. Seuls sont dénombrés les microorganismes de la souche d'ensemencement.

4-5-4-1. *Filtration sur membrane.* Utilisez des membranes filtrantes ayant un diamètre nominal des pores d'au maximum 0,45 µm. Le matériau constituant les membranes est choisi de telle sorte que l'efficacité de rétention bactérienne ne soit pas affectée par les constituants de l'échantillon à examiner. Une membrane filtrante est utilisée pour chacun des microorganismes cités.

Introduisez dans la membrane filtrante une quantité appropriée de l'échantillon préparé comme décrit sous 4-5-1 à 4-5-3 (de préférence l'équivalent de 1 g de produit, ou moins si le nombre présumé d'UFC est élevé), filtrez immédiatement et rincez le filtre avec un volume approprié de diluant.

Pour le dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT), transférez la membrane sur du milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja. Pour le dénombrement des

moisissures/levures totales (DMLT), transférez la membrane sur du milieu Sabouraud dextrosé-gélosé. Incubez les boîtes comme indiqué dans le tableau 2.6.12.-1. Procédez au dénombrement.

4-5-4-2. *Dénombrement sur plaques.* Effectuez le dénombrement sur plaque au moins 2 fois pour chaque milieu et utilisez la moyenne des 2 résultats.

4-5-4-2-1. Ensemencement en profondeur

Pour des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre, introduisez dans la boîte 1 mL de l'échantillon préparé comme décrit sous 4-5-1 à 4-5-3, puis 15-20 mL de milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ou de milieu Sabouraud dextrosé-gélosé, à une température ne dépassant pas 45 °C. Si les boîtes de Pétri utilisées sont plus grandes, augmentez en conséquence le volume de milieu gélosé. Utilisez au minimum 2 boîtes de Pétri pour chacun des microorganismes cités dans le tableau 2.6.12.-1. Incubez les boîtes comme indiqué dans le tableau 2.6.12.-1. Prenez la moyenne arithmétique des dénombrements par milieu et calculez le nombre d'UFC dans l'inoculum initial.

4-5-4-2-2. Etalement en surface

Pour des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre, introduisez dans la boîte 15-20 mL de milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ou de milieu Sabouraud dextrosé-gélosé, à une température d'environ 45 °C, puis laissez solidifier. Si les boîtes de Pétri utilisées sont plus grandes, augmentez en conséquence le volume de milieu gélosé. Faites sécher les boîtes, par exemple dans une hotte à flux laminaire ou un incubateur. Utilisez au minimum 2 boîtes de Pétri pour chacun des microorganismes cités dans le tableau 2.6.12.-1. Etalez à la surface du milieu un volume mesuré, d'au moins 0,1 mL, de l'échantillon préparé comme décrit sous 4-5-1 à 4-5-3. Procédez à l'incubation et au dénombrement comme indiqué sous 4-5-4-2-1.

4-5-4-3. *Méthode du nombre le plus probable (NPP).* La méthode du NPP présente une fidélité et une exactitude inférieures à celles de la filtration sur membrane ou du dénombrement sur plaques. Elle donne notamment des résultats peu fiables pour le dénombrement des moisissures. Elle est donc à réserver aux DGAT pour lesquels le recours aux autres méthodes est impossible. Si l'emploi de cette méthode est justifié, procédez comme suit.

Préparez au moins 3 dilutions en série au 1/10 du produit comme décrit sous 4-5-1 à 4-5-3. Prélevez 3 fois 1 g ou 1 mL à chaque niveau de dilution et transférez dans 3 tubes contenant chacun 9-10 mL de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja, si nécessaire additionné d'un agent tensioactif tel que le polysorbate 80 ou d'un neutralisant de l'activité antimicrobienne. Pour une série de 3 dilutions, il faut par conséquent ensemencer 9 tubes.

Incubez tous les tubes à 30-35 °C pendant au maximum 3 jours. Si la nature du produit à examiner rend la lecture des résultats difficile ou incertaine, effectuez une subculture dans le même milieu liquide ou sur du milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja, incubez à la même température pendant 1-2 jours et utilisez les résultats ainsi obtenus. Déterminez le nombre le plus probable de microorganismes par gramme ou millilitre de produit à examiner à l'aide du tableau 2.6.12.-3.

4-6. *RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION*

Lors de la vérification de l'applicabilité de la méthode de filtration sur membrane ou de dénombrement sur plaques, le nombre moyen obtenu pour chacun des microorganismes de référence ne doit pas différer de plus d'un facteur 2 de la valeur obtenue en l'absence du produit pour le témoin défini en 4-5-2. Lors de la vérification de l'applicabilité de la méthode NPP, la valeur calculée à partir de l'inoculum doit se situer dans les limites de confiance à 95 pour cent des résultats obtenus avec le témoin.

Si ces critères sont impossibles à satisfaire pour un ou plusieurs des microorganismes soumis à l'essai par l'une des méthodes décrites, il y a lieu d'utiliser pour examiner le produit la méthode et les conditions d'essai qui permettent de s'en approcher le plus.

Tableau 2.6.12.-3. – *Valeurs du nombre le plus probable (NPP) de microorganismes*

| **Combinaisons observées du nombre de tubes présentant une croissance dans chaque série** | | | **NPP par gramme ou millilitre de produit** | **Limites de confiance à 95 pour cent** |
|---|---|---|---|---|
| **Nombre de grammes ou millilitres de produit par tube** | | | | |
| **0,1** | **0,01** | **0,001** | | |
| 0 | 0 | 0 | < 3 | 0-9,4 |
| 0 | 0 | 1 | 3 | 0,1-9,5 |
| 0 | 1 | 0 | 3 | 0,1-10 |
| 0 | 1 | 1 | 6,1 | 1,2-17 |
| 0 | 2 | 0 | 6,2 | 1,2-17 |
| 0 | 3 | 0 | 9,4 | 3,5-35 |
| 1 | 0 | 0 | 3,6 | 0,2-17 |
| 1 | 0 | 1 | 7,2 | 1,2-17 |
| 1 | 0 | 2 | 11 | 4-35 |
| 1 | 1 | 0 | 7,4 | 1,3-20 |
| 1 | 1 | 1 | 11 | 4-35 |
| 1 | 2 | 0 | 11 | 4-35 |
| 1 | 2 | 1 | 15 | 5-38 |
| 1 | 3 | 0 | 16 | 5-38 |
| 2 | 0 | 0 | 9,2 | 1,5-35 |
| 2 | 0 | 1 | 14 | 4-35 |
| 2 | 0 | 2 | 20 | 5-38 |
| 2 | 1 | 0 | 15 | 4-38 |
| 2 | 1 | 1 | 20 | 5-38 |
| 2 | 1 | 2 | 27 | 9-94 |
| 2 | 2 | 0 | 21 | 5-40 |
| 2 | 2 | 1 | 28 | 9-94 |
| 2 | 2 | 2 | 35 | 9-94 |
| 2 | 3 | 0 | 29 | 9-94 |
| 2 | 3 | 1 | 36 | 9-94 |
| 3 | 0 | 0 | 23 | 5-94 |
| 3 | 0 | 1 | 38 | 9-104 |
| 3 | 0 | 2 | 64 | 16-181 |
| 3 | 1 | 0 | 43 | 9-181 |
| 3 | 1 | 1 | 75 | 17-199 |
| 3 | 1 | 2 | 120 | 30-360 |
| 3 | 1 | 3 | 160 | 30-380 |
| 3 | 2 | 0 | 93 | 18-360 |
| 3 | 2 | 1 | 150 | 30-380 |
| 3 | 2 | 2 | 210 | 30-400 |
| 3 | 2 | 3 | 290 | 90-990 |
| 3 | 3 | 0 | 240 | 40-990 |
| 3 | 3 | 1 | 460 | 90-1980 |
| 3 | 3 | 2 | 1100 | 200-4000 |
| 3 | 3 | 3 | > 1100 | |

5. CONTRÔLE DES PRODUITS

5-1. *PRISE D'ESSAI*

Sauf indication contraire, utilisez 10 g ou 10 mL du produit à examiner, prélevés avec les précautions mentionnées plus haut. Pour les liquides ou solides en aérosols, effectuez l'échantillonnage sur 10 récipients. Pour les dispositifs transdermiques, effectuez l'échantillonnage sur 10 dispositifs.

La prise d'essai peut être réduite pour les substances actives qui seront formulées dans les conditions suivantes : quantité par unité (par exemple comprimé, capsule, préparation injectable) inférieure ou égale à 1 mg, ou quantité par gramme ou millilitre (pour les préparations non présentées par unités) inférieure à 1 mg. Dans ces cas, la prise d'essai sera au moins égale à la quantité contenue dans 10 unités ou dans 10 g ou 10 mL de produit.

Dans le cas de produits utilisés comme substances actives et pour lesquels la quantité d'échantillon est limitée ou la taille de lot extrêmement petite (moins de 1000 mL ou 1000 g), la prise d'essai devra représenter 1 pour cent du lot, à moins que l'emploi d'une quantité moindre ne soit prescrite ou justifiée et autorisée.

Dans le cas de produits pour lesquels le nombre total d'entités constituant un lot est inférieur à 200 (par exemple échantillons utilisés dans des essais cliniques), la taille de l'échantillon peut être réduite à 2 unités, ou à 1 unité si la taille du lot est inférieure à 100.

Effectuez les prélèvements au hasard dans le produit en vrac ou les récipients dans lesquels est conditionnée la préparation. Pour obtenir la quantité requise, mélangez le contenu d'un nombre de récipients suffisant pour former l'échantillon.

5-2. *EXAMEN DU PRODUIT*

5-2-1. **Filtration sur membrane**. Utilisez un appareil de filtration permettant le transfert de la membrane sur le milieu. Préparez l'échantillon par une méthode dont l'applicabilité a été établie comme décrit dans la section 4, et introduisez la quantité appropriée d'échantillon dans 2 membranes filtrantes. Filtrez immédiatement. Lavez chaque filtre selon la procédure préalablement établie.

Transférez l'une des membranes sur du milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja, pour le DGAT, et l'autre membrane sur du milieu Sabouraud dextrosé-gélosé, pour le DMLT. Incubez la boîte de milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja à 30-35 °C pendant 3-5 jours, et la boîte de milieu Sabouraud dextrosé-gélosé à 20-25 °C pendant 5-7 jours. Calculez le nombre d'UFC par gramme ou par millilitre de produit.

Pour l'examen de dispositifs transdermiques, filtrez séparément 10 pour cent du volume de la préparation décrite sous 4-5-1 sur 2 membranes stériles. Transférez l'une des membranes sur du milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja, pour le DGAT, et l'autre sur du milieu Sabouraud dextrosé-gélosé, pour le DMLT.

5-2-2. **Dénombrement sur plaques**

5-2-2-1. Ensemencement en profondeur

Préparez l'échantillon par une méthode dont l'applicabilité a été établie comme décrit dans la section 4. Préparez au moins 2 boîtes de Pétri par milieu et par niveau de dilution. Incubez les boîtes de milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja à 30-35 °C pendant 3-5 jours et les boîtes de milieu Sabouraud dextrosé-gélosé à 20-25 °C pendant 5-7 jours. Sélectionnez les boîtes correspondant à une dilution donnée et présentant le plus grand nombre de colonies inférieur à 250 pour le DGAT et à 50 pour le DMLT. Prenez la moyenne arithmétique par milieu des dénombrements et calculez le nombre d'UFC par gramme ou par millilitre de produit.

5-2-2-2. Etalement en surface

Préparez l'échantillon par une méthode dont l'applicabilité a été établie comme décrit dans la section 4. Préparez au moins 2 boîtes de Pétri par milieu et par niveau de dilution. Pour l'incubation et le calcul du nombre d'UFC, procédez comme décrit pour l'ensemencement en profondeur.

5-2-3. **Méthode du nombre le plus probable**

Préparez et diluez l'échantillon par une méthode dont l'applicabilité a été établie comme décrit dans la section 4. Incubez tous les tubes à 30-35 °C pendant 3-5 jours. Effectuez si nécessaire une subculture, selon la procédure préalablement établie. Pour chaque niveau de dilution, notez le nombre de tubes présentant une croissance microbienne. Déterminez le nombre le plus probable de microorganismes par gramme ou millilitre de produit à examiner à l'aide du tableau 2.6.12.-3.

5-3. *INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS*

Le nombre de germes aérobies totaux (DGAT) est considéré comme égal au nombre d'UFC obtenues avec le milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ; si des colonies de moisissures ou levures sont détectées sur ce milieu, elles sont comptabilisées dans le DGAT. Le nombre total de moisissures et levures (DMLT) est considéré comme égal au nombre d'UFC obtenues avec le milieu Sabouraud dextrosé-gélosé ; si des colonies de bactéries sont détectées sur ce milieu, elles sont comptabilisées dans le DMLT. Si l'on prévoit que le DMLT risque de dépasser le critère d'acceptation du fait de la croissance bactérienne, du milieu Sabouraud dextrosé-gélosé contenant des antibiotiques peut être utilisé. Si le dénombrement est effectué par la méthode du NPP, la valeur calculée est le DGAT.

Lorsqu'un critère d'acceptation est prescrit en matière de qualité microbiologique, il est interprété comme suit :

– $10^1$ UFC : nombre maximal acceptable = 20 ;
– $10^2$ UFC : nombre maximal acceptable = 200 ;
– $10^3$ UFC : nombre maximal acceptable = 2000, et ainsi de suite.

Les solutions et milieux recommandés sont décrits dans le chapitre général *2.6.13.*

**04/2010:20613**

# 2.6.13. CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE DES PRODUITS NON STÉRILES : RECHERCHE DE MICROORGANISMES SPÉCIFIÉS[(2)]

1. INTRODUCTION

Les essais décrits ci-après permettent de contrôler l'absence, ou la présence limitée, de microorganismes spécifiés pouvant être décelés dans les conditions décrites.

Ces essais sont en premier lieu destinés à déterminer si une substance ou préparation satisfait à une spécification préétablie en matière de qualité microbiologique. Il convient dans ce cas de se conformer aux indications données ci-après, notamment en ce qui concerne le nombre d'échantillons à prélever et l'interprétation des résultats.

D'autres méthodes microbiologiques, notamment des méthodes automatisées, peuvent être utilisées à condition que leur équivalence avec la méthode de la pharmacopée ait été démontrée.

2. PRÉCAUTIONS GÉNÉRALES

Préparez les échantillons comme décrit dans le chapitre *2.6.12.*

Si le produit à examiner possède une activité antimicrobienne, celle-ci est autant que possible éliminée ou neutralisée comme décrit dans le chapitre *2.6.12.*

(2) Ce chapitre a fait l'objet du processus d'harmonisation des pharmacopées. Voir chapitre *5.8. Harmonisation des pharmacopées.*

Si des substances tensioactives sont utilisées pour la préparation des échantillons, leur absence de toxicité à l'égard des microorganismes considérés et leur compatibilité avec les neutralisants utilisés doivent être démontrées comme décrit dans le chapitre *2.6.12*.

## 3. FERTILITÉ ET PROPRIÉTÉS INHIBITRICES DES MILIEUX, APPLICABILITÉ DE LA MÉTHODE D'ESSAI ET TÉMOINS NÉGATIFS

L'aptitude de l'essai à permettre la détection des microorganismes en présence du produit à examiner doit être établie. L'applicabilité de la méthode d'essai doit être confirmée chaque fois qu'un changement susceptible d'affecter le résultat de l'essai est apporté au mode opératoire ou au produit.

### 3-1. *PRÉPARATION DES SOUCHES DE RÉFÉRENCE*

Utilisez des suspensions standardisées stables des souches de référence ou préparez des suspensions comme indiqué ci-après. Les cultures sont effectuées selon un système de lot de semence tel que les microorganismes viables utilisés pour l'inoculation n'aient pas subi plus de 5 passages à partir du lot de semence primaire d'origine.

3-1-1. **Microorganismes aérobies**. Cultivez séparément chacune des souches bactériennes de référence dans du milieu liquide aux peptones de caséine et de soja ou sur du milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja, à 30-35 °C pendant 18-24 h, et la souche de référence de *Candida albicans* sur du milieu Sabouraud dextrosé-gélosé ou dans du milieu liquide Sabouraud dextrosé, à 20-25 °C pendant 2-3 jours.

– *Staphylococcus aureus* : par exemple ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, NBRC 13276 ;

– *Pseudomonas aeruginosa* : par exemple ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC 13275 ;

– *Escherichia coli* : par exemple ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126, NBRC 3972 ;

– *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium : par exemple ATCC 14028 ; ou *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Abony : par exemple NBRC 100797, NCTC 6017, CIP 80.39 ;

– *Candida albicans* : par exemple ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72, NBRC 1594.

Utilisez de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0 ou de la solution tampon phosphate pH 7,2 pour préparer des suspensions témoins. Utilisez les suspensions dans les 2 h ou dans les 24 h si elles sont conservées à 2-8 °C.

3-1-2. **Clostridies**. Utilisez une souche de *Clostridium sporogenes*, par exemple ATCC 11437 (NBRC 14293, NCIMB 12343, CIP 100651) ou ATCC 19404 (NCTC 532 ou CIP 79.03). Cultivez la souche clostridienne de référence dans des conditions anaérobies dans du milieu renforcé pour clostridies à 30-35 °C pendant 24-48 h. On peut également, plutôt que de préparer puis diluer une suspension fraîche de cellules végétatives de *Cl. sporogenes*, utiliser pour l'inoculation une suspension de spores stable. Cette suspension peut être maintenue à 2-8 °C pendant une durée validée.

### 3-2. *TÉMOIN NÉGATIF*

Pour vérifier les conditions opératoires, effectuez un contrôle sur un témoin négatif préparé en substituant le diluant choisi à la préparation à examiner. Aucune croissance microbienne n'est observée. Un contrôle sur un témoin négatif est également effectué lors de l'examen du produit comme décrit dans la section 4. L'obtention d'un résultat non conforme nécessite une investigation.

### 3-3. *FERTILITÉ ET PROPRIÉTÉS INHIBITRICES DES MILIEUX*

Effectuez ce contrôle sur chaque lot de milieu, qu'il soit acheté prêt à l'emploi ou préparé à partir d'un milieu déshydraté ou des ingrédients décrits.
Vérifiez que les milieux concernés présentent les propriétés voulues (voir tableau 2.6.13.-1).

*Contrôle de la fertilité, milieux liquides* : ensemencez un échantillon du milieu approprié avec une petite quantité (au maximum 100 UFC) du microorganisme approprié. Incubez à la température spécifiée pendant une durée inférieure ou égale à la

Tableau 2.6.13.-1. – *Fertilité, propriétés inhibitrices et propriétés indicatives des milieux*

| | **Milieu** | **Propriétés** | **Microorganisme de référence** |
|---|---|---|---|
| Recherche des bactéries gram-négatives résistantes aux sels biliaires | Milieu d'enrichissement pour les entérobactéries Mossel | Fertilité | *E. coli*<br>*P. aeruginosa* |
| | | Inhibition | *S. aureus* |
| | Milieu gélosé à la bile-violet-rouge avec glucose | Fertilité + indication | *E. coli*<br>*P. aeruginosa* |
| Recherche d'*Escherichia coli* | Milieu liquide de MacConkey | Fertilité | *E. coli* |
| | | Inhibition | *S. aureus* |
| | Milieu gélosé de MacConkey | Fertilité + indication | *E. coli* |
| Recherche des salmonelles | Milieu liquide d'enrichissement pour les salmonelles Rappaport-Vassiliadis | Fertilité | *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium ou *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Abony |
| | | Inhibition | *S. aureus* |
| | Milieu gélosé xylose-lysine-désoxycholate | Fertilité + indication | *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium ou *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Abony |
| Recherche de *Pseudomonas aeruginosa* | Milieu gélosé-cétrimide | Fertilité | *P. aeruginosa* |
| | | Inhibition | *E. coli* |
| Recherche de *Staphylococcus aureus* | Milieu gélosé mannitol-sel | Fertilité + indication | *S. aureus* |
| | | Inhibition | *E. coli* |
| Recherche des clostridies | Milieu renforcé pour clostridies | Fertilité | *Cl. sporogenes* |
| | Gélose Columbia | Fertilité | *Cl. sporogenes* |
| Recherche de *Candida albicans* | Milieu liquide Sabouraud dextrosé | Fertilité | *C. albicans* |
| | Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé | Fertilité + indication | *C. albicans* |

durée minimale spécifiée pour l'essai. Une croissance clairement visible du microorganisme, comparable à celle obtenue sur un lot de milieu précédemment contrôlé et approuvé, est observée.

*Contrôle de la fertilité, milieux solides* : opérez par la méthode d'ensemencement en surface, en ensemençant chaque plaque avec une petite quantité (au maximum 100 UFC) du microorganisme approprié. Incubez à la température spécifiée pendant une durée inférieure ou égale à la durée minimale spécifiée pour l'essai. Une croissance du microorganisme comparable à celle obtenue sur un lot de milieu précédemment contrôlé et approuvé est observée.

*Contrôle des propriétés inhibitrices, milieux liquides ou solides* : ensemencez le milieu approprié avec au moins 100 UFC du microorganisme approprié. Incubez à la température spécifiée pendant une durée égale ou supérieure à la durée maximale spécifiée pour l'essai. Aucune croissance du microorganisme n'est observée.

*Contrôle des propriétés indicatives* : opérez par la méthode d'ensemencement en surface, en ensemençant chaque plaque avec une petite quantité (au maximum 100 UFC) du microorganisme approprié. Incubez à la température spécifiée pendant une durée comprise dans l'intervalle spécifié pour l'essai. Les colonies sont comparables, quant à leur aspect et aux réactions indicatives observées, à celles obtenues sur un lot de milieu précédemment contrôlé et approuvé.

3-4. *APPLICABILITÉ DE LA MÉTHODE D'ESSAI*

Pour chaque produit à examiner, procédez à la préparation de l'échantillon comme décrit dans le paragraphe approprié de la section 4. Ajoutez chaque souche de référence au moment du mélange, dans le milieu prescrit. Effectuez l'essai individuellement avec chaque souche de référence. Utilisez un nombre de microorganismes équivalant, au maximum, à 100 UFC dans la préparation à examiner après ensemencement. Effectuez l'essai comme décrit dans le paragraphe approprié de la section 4, en incubant pendant la durée minimale prescrite.

Les réactions indicatives décrites dans la section 4 doivent montrer la présence des microorganismes spécifiés.

Si le produit présente une activité antimicrobienne, il faut apporter les modifications voulues à la procédure d'essai (voir chapitre *2.6.12*, paragraphe 4-5-3).

S'il s'avère impossible de neutraliser l'activité antimicrobienne exercée par un produit donné sur un microorganisme dont la recherche est prescrite, ce microorganisme sera présumé ne plus être présent dans le produit.

4. CONTRÔLE DES PRODUITS

4-1. *BACTÉRIES GRAM-NÉGATIVES RÉSISTANTES AUX SELS BILIAIRES*

4-1-1. **Préparation de l'échantillon et pré-incubation**. Préparez un échantillon comme décrit dans le chapitre *2.6.12*, en utilisant une dilution au 1/10 d'au moins 1 g du produit à examiner, mais avec comme diluant du milieu liquide aux peptones de caséine et de soja. Mélangez, puis incubez à 20-25 °C pendant un temps suffisant pour assurer la revivification des bactéries, mais insuffisant pour permettre leur multiplication (généralement 2 h mais pas plus de 5 h).

4-1-2. **Absence de ces bactéries**. Sauf indication contraire, utilisez le volume d'inoculum correspondant à 1 g du produit, préparé comme décrit sous 4-1-1, pour ensemencer du milieu d'enrichissement pour les entérobactéries-Mossel. Incubez à 30-35 °C pendant 24-48 h. Repiquez sur du milieu gélosé à la bile-violet-rouge avec glucose et incubez 30-35 °C pendant 18-24 h.

Le produit satisfait à l'essai s'il n'est pas observé de croissance de colonies.

4-1-3. **Essai quantitatif**

4-1-3-1. *Sélection et subculture.* Ensemencez des quantités appropriées de milieu d'enrichissement pour les entérobactéries-Mossel avec la préparation décrite sous 4-1-1 et/ou des dilutions de cette préparation contenant respectivement 0,1 g, 0,01 g et 0,001 g (ou 0,1 mL, 0,01 mL et 0,001 mL) du produit à examiner. Incubez à 30-35 °C pendant 24-48 h. Repiquez chacune des cultures sur du milieu gélosé à la bile-violet-rouge avec glucose. Incubez à 30-35 °C pendant 18-24 h.

4-1-3-2. *Interprétation*. La croissance de colonies constitue un résultat positif. Notez la plus petite quantité de produit qui donne un résultat positif et la plus grande quantité de produit qui donne un résultat négatif. Déterminez le nombre probable de bactéries à l'aide du tableau 2.6.13.-2.

Tableau 2.6.13.-2. – *Interprétation des résultats*

| Résultats obtenus avec une quantité de produit de | | | Nombre probable de bactéries par gramme ou millilitre de produit |
|---|---|---|---|
| 0,1 g ou 0,1 mL | 0,01 g ou 0,01 mL | 0,001 g ou 0,001 mL | |
| + | + | + | > $10^3$ |
| + | + | – | < $10^3$ et > $10^2$ |
| + | – | – | < $10^2$ et > 10 |
| – | – | – | < 10 |

4-2. *ESCHERICHIA COLI*

4-2-1. **Préparation de l'échantillon et pré-incubation**. Préparez un échantillon comme décrit dans le chapitre *2.6.12*, en utilisant une dilution au 1/10 d'au moins 1 g du produit à examiner, et ensemencez une quantité appropriée (déterminée comme décrit sous 3-4) de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja avec 10 mL d'échantillon ou la quantité correspondant à 1 g ou 1 mL de produit. Mélangez, puis incubez à 30-35 °C pendant 18-24 h.

4-2-2. **Sélection et subculture**. Agitez le récipient, puis transférez 1 mL du milieu liquide aux peptones de caséine et de soja dans 100 mL de milieu liquide de MacConkey et incubez à 42-44 °C pendant 24-48 h. Repiquez sur du milieu gélosé de MacConkey et incubez à 30-35 °C pendant 18-72 h.

4-2-3. **Interprétation**. La croissance de colonies indique la présence possible d'*E. coli*, à confirmer par des essais d'identification.

Le produit satisfait à l'essai si l'on n'observe la présence d'aucune colonie ou si les essais de confirmation de l'identification sont négatifs.

4-3. *SALMONELLES*

4-3-1. **Préparation de l'échantillon et pré-incubation**. Préparez le produit à examiner comme décrit dans le chapitre *2.6.12* et ensemencez une quantité appropriée (déterminée comme décrit sous 3-4) de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja avec une quantité d'échantillon correspondant à au moins 10 g ou 10 mL de produit. Mélangez, puis incubez à 30-35 °C pendant 18-24 h.

4-3-2. **Sélection et subculture**. Transférez 0,1 mL du milieu liquide aux peptones de caséine et de soja dans 10 mL de milieu liquide d'enrichissement pour les salmonelles Rappaport-Vassiliadis et incubez à 30-35 °C pendant 18-24 h. Repiquez sur du milieu gélosé xylose-lysine-désoxycholate et incubez à 30-35 °C pendant 18-48 h.

4-3-3. **Interprétation**. La croissance de colonies rouges bien développées, avec ou sans centre noir, indique la présence possible de salmonelles, à confirmer par des essais d'identification.

Le produit satisfait à l'essai si l'on n'observe la présence d'aucune colonie du type décrit ou si les essais de confirmation de l'identification sont négatifs.

4-4. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

4-4-1. **Préparation de l'échantillon et pré-incubation**. Préparez un échantillon comme décrit dans le chapitre *2.6.12*, en utilisant une dilution au 1/10 d'au moins 1 g du produit à examiner, et ensemencez une quantité appropriée (déterminée comme

décrit sous 3-4) de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja avec 10 mL d'échantillon ou la quantité correspondant à 1 g ou 1 mL de produit. Mélangez. Pour les dispositifs transdermiques, filtrez sur une membrane stérile le volume d'échantillon correspondant à 1 dispositif, préparé comme décrit dans le paragraphe 4-5-1 du chapitre *2.6.12,* puis transférez la membrane dans 100 mL de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja. Incubez à 30-35 °C pendant 18-24 h.

4-4-2. **Sélection et subculture**. Repiquez sur du milieu gélosé-cétrimide et incubez à 30-35 °C pendant 18-72 h.

4-4-3. **Interprétation**. La croissance de colonies indique la présence possible de *P. aeruginosa,* à confirmer par des essais d'identification.

Le produit satisfait à l'essai si l'on n'observe la présence d'aucune colonie ou si les essais de confirmation de l'identification sont négatifs.

4-5. *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

4-5-1. **Préparation de l'échantillon et pré-incubation**. Préparez un échantillon comme décrit dans le chapitre *2.6.12,* en utilisant une dilution au 1/10 d'au moins 1 g du produit à examiner, et ensemencez une quantité appropriée (déterminée comme décrit sous 3-4) de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja avec 10 mL d'échantillon ou la quantité correspondant à 1 g ou 1 mL de produit. Mélangez. Pour les dispositifs transdermiques, filtrez sur une membrane stérile le volume d'échantillon correspondant à 1 dispositif, préparé comme décrit dans le paragraphe 4-5-1 du chapitre *2.6.12,* puis transférez la membrane dans 100 mL de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja. Incubez à 30-35 °C pendant 18-24 h.

4-5-2. **Sélection et subculture**. Repiquez sur du milieu gélosé mannitol-sel et incubez à 30-35 °C pendant 18-72 h.

4-5-3. **Interprétation**. La croissance de colonies jaunes/blanches entourées d'une zone jaune indique la présence possible de *S. aureus,* à confirmer par des essais d'identification.

Le produit satisfait à l'essai si l'on n'observe la présence d'aucune colonie du type décrit ou si les essais de confirmation de l'identification sont négatifs.

4-6. *CLOSTRIDIES*

4-6-1. **Préparation de l'échantillon et traitement à la chaleur**. Préparez un échantillon comme décrit dans le chapitre *2.6.12,* en utilisant une dilution au 1/10 (avec un volume total minimal de 20 mL) d'au moins 2 g ou 2 mL du produit à examiner. Divisez l'échantillon en 2 fractions d'au moins 10 mL. Chauffez l'une d'elles à 80 °C pendant 10 min, puis refroidissez rapidement. Ne chauffez pas l'autre.

4-6-2. **Sélection et subculture**. Ensemencez une quantité appropriée (déterminée comme décrit sous 3-4) de milieu renforcé pour clostridies avec 10 mL de chacune des fractions, ou la quantité correspondant à 1 g ou 1 mL de produit. Incubez en anaérobiose à 30-35 °C pendant 48 h. Après incubation, effectuez à partir de chaque récipient un repiquage sur de la gélose Columbia, puis incubez en anaérobiose à 30-35 °C pendant 48-72 h.

4-6-3. **Interprétation**. La croissance anaérobie de bâtonnets (avec ou sans endospores) donnant une réaction catalase négative indique la présence de clostridies, à confirmer par des essais d'identification.

Le produit satisfait à l'essai si l'on n'observe la présence d'aucune colonie du type décrit ou si les essais de confirmation de l'identification sont négatifs.

4-7. *CANDIDA ALBICANS*

4-7-1. **Préparation de l'échantillon et pré-incubation**. Préparez le produit à examiner comme décrit dans le chapitre *2.6.12* et ensemencez 100 mL de milieu liquide Sabouraud dextrosé avec 10 mL d'échantillon ou la quantité correspondant à 1 g ou 1 mL de produit. Mélangez, puis incubez à 30-35 °C pendant 3-5 jours.

4-7-2. **Sélection et subculture**. Repiquez sur du milieu Sabouraud dextrosé-gélosé et incubez à 30-35 °C pendant 24-48 h.

4-7-3. **Interprétation**. La croissance de colonies blanches indique la présence possible de *C. albicans,* à confirmer par des essais d'identification.

Le produit satisfait à l'essai si l'on n'observe la présence d'aucune colonie du type décrit ou si les essais de confirmation de l'identification sont négatifs.

*La section suivante est donnée à titre d'information.*

## 5. SOLUTIONS ET MILIEUX DE CULTURE RECOMMANDÉS

Les solutions et milieux de culture suivants se sont avérés satisfaisants pour la réalisation des essais de contamination microbienne prescrits dans la Pharmacopée. D'autres milieux peuvent être utilisés dès lors que leur applicabilité peut être démontrée.

*Solution tampon mère.* Transférez 34 g de phosphate monopotassique dans une fiole jaugée de 1000 mL, dissolvez dans 500 mL d'eau purifiée, ajustez à pH 7,2 ± 0,2 avec de l'hydroxyde de sodium, complétez à 1000.0 mL avec de l'eau purifiée et mélangez. Répartissez en récipients et stérilisez. Conservez à une température de 2-8 °C.

*Solution tampon phosphate pH 7,2.* Préparez un mélange de solution tampon mère et d'eau purifiée (1:800 *V/V*) et stérilisez.

**Solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0**

| | |
|---|---|
| Phosphate monopotassique | 3,6 g |
| Phosphate disodique dihydraté | 7,2 g équivalant à 0,067 M de phosphate |
| Chlorure de sodium | 4,3 g |
| Peptone de viande ou de caséine | 1,0 g |
| Eau purifiée | 1000 mL |

Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

**Milieu liquide aux peptones de caséine et de soja**

| | |
|---|---|
| Peptone pancréatique de caséine | 17,0 g |
| Peptone papaïque de soja | 3,0 g |
| Chlorure de sodium | 5,0 g |
| Phosphate dipotassique | 2,5 g |
| Glucose monohydraté | 2,5 g |
| Eau purifiée | 1000 mL |

Ajustez le pH pour qu'il soit de 7,3 ± 0,2 à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

**Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja**

| | |
|---|---|
| Peptone pancréatique de caséine | 15,0 g |
| Peptone papaïque de soja | 5,0 g |
| Chlorure de sodium | 5,0 g |
| Gélose | 15,0 g |
| Eau purifiée | 1000 mL |

Ajustez le pH pour qu'il soit de 7,3 ± 0,2 à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

**Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé**

| | |
|---|---|
| Dextrose | 40,0 g |
| Mélange de peptone peptique de tissu animal et de peptone pancréatique de caséine (1:1) | 10,0 g |
| Gélose | 15,0 g |
| Eau purifiée | 1000 mL |

Ajustez le pH pour qu'il soit de 5,6 ± 0,2 à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

**Milieu dextrosé-gélosé à la pomme de terre**

| | |
|---|---|
| Infusion de pomme de terre | 200 g |
| Dextrose | 20,0 g |
| Gélose | 15,0 g |
| Eau purifiée | 1000 mL |

Ajustez le pH pour qu'il soit de 5,6 ± 0,2 à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

**Milieu liquide Sabouraud dextrosé**

| | |
|---|---|
| Dextrose | 20,0 g |
| Mélange de peptone peptique de tissu animal et de peptone pancréatique de caséine (1:1) | 10,0 g |
| Eau purifiée | 1000 mL |

Ajustez le pH pour qu'il soit de 5,6 ± 0,2 à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

**Milieu d'enrichissement pour les entérobactéries-Mossel**

| | |
|---|---|
| Hydrolysat pancréatique de gélatine | 10,0 g |
| Glucose monohydraté | 5,0 g |
| Bile de boeuf déshydratée | 20,0 g |
| Phosphate monopotassique | 2,0 g |
| Phosphate disodique dihydraté | 8,0 g |
| Vert brillant | 15 mg |
| Eau purifiée | 1000 mL |

Ajustez le pH pour qu'il soit de 7,2 ± 0,2 à 25 °C après chauffage. Chauffez à 100 °C pendant 30 min et refroidissez immédiatement.

**Milieu gélosé à la bile-violet-rouge avec glucose**

| | |
|---|---|
| Extrait de levure | 3,0 g |
| Hydrolysat pancréatique de gélatine | 7,0 g |
| Sels biliaires | 1,5 g |
| Chlorure de sodium | 5,0 g |
| Glucose monohydraté | 10,0 g |
| Gélose | 15,0 g |
| Rouge neutre | 30 mg |
| Violet cristallisé | 2 mg |
| Eau purifiée | 1000 mL |

Ajustez le pH pour qu'il soit de 7,4 ± 0,2 à 25 °C après chauffage. Chauffez à ébullition ; ne chauffez pas en autoclave.

**Milieu liquide de MacConkey**

| | |
|---|---|
| Hydrolysat pancréatique de gélatine | 20,0 g |
| Lactose monohydraté | 10,0 g |
| Bile de boeuf déshydratée | 5,0 g |
| Pourpre de bromocrésol | 10 mg |
| Eau purifiée | 1000 mL |

Ajustez le pH pour qu'il soit de 7,3 ± 0,2 à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

**Milieu gélosé de MacConkey**

| | |
|---|---|
| Hydrolysat pancréatique de gélatine | 17,0 g |
| Peptones de viande et de caséine | 3,0 g |
| Lactose monohydraté | 10,0 g |
| Chlorure de sodium | 5,0 g |
| Sels biliaires | 1,5 g |
| Gélose | 13,5 g |
| Rouge neutre | 30,0 mg |
| Violet cristallisé | 1 mg |
| Eau purifiée | 1000 mL |

Ajustez le pH pour qu'il soit de 7,1 ± 0,2 à 25 °C après stérilisation. Portez à ébullition pendant 1 min en agitant constamment, puis stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

**Milieu liquide d'enrichissement pour les salmonelles Rappaport-Vassiliadis**

| | |
|---|---|
| Peptone de soja | 4,5 g |
| Chlorure de magnésium hexahydraté | 29,0 g |
| Chlorure de sodium | 8,0 g |
| Phosphate dipotassique | 0,4 g |
| Phosphate monopotassique | 0,6 g |
| Vert malachite | 0,036 g |
| Eau purifiée | 1000 mL |

Dissolvez en chauffant doucement. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé, à une température ne dépassant pas 115 °C. Le pH doit être de 5,2 ± 0,2 à 25 °C après chauffage et passage à l'autoclave.

**Milieu gélosé xylose-lysine-désoxycholate**

| | |
|---|---|
| Xylose | 3,5 g |
| L-Lysine | 5,0 g |
| Lactose monohydraté | 7,5 g |
| Saccharose | 7,5 g |
| Chlorure de sodium | 5,0 g |
| Extrait de levure | 3,0 g |
| Rouge de phénol | 80 mg |
| Gélose | 13,5 g |
| Désoxycholate sodique | 2,5 g |
| Thiosulfate de sodium | 6,8 g |
| Citrate ferrique et d'ammonium | 0,8 g |
| Eau purifiée | 1000 mL |

Ajustez le pH pour qu'il soit de 7,4 ± 0,2 à 25 °C après chauffage. Chauffez à ébullition, refroidissez à 50 °C et répartissez en boîtes de Pétri. Ne chauffez pas en autoclave.

**Milieu gélosé-cétrimide**

| | |
|---|---|
| Hydrolysat pancréatique de gélatine | 20,0 g |
| Chlorure de magnésium | 1,4 g |
| Sulfate dipotassique | 10,0 g |
| Cétrimide | 0,3 g |
| Gélose | 13,6 g |
| Eau purifiée | 1000 mL |
| Glycérol | 10,0 mL |

Chauffez à ébullition pendant 1 min en agitant. Ajustez le pH pour qu'il soit de 7,2 ± 0,2 à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

**Milieu gélosé mannitol-sel**

| | |
|---|---|
| Peptone pancréatique de caséine | 5,0 g |
| Peptone peptique de tissu animal | 5,0 g |
| Extrait de viande de boeuf | 1,0 g |
| D-Mannitol | 10,0 g |
| Chlorure de sodium | 75,0 g |

| | |
|---|---|
| Gélose | 15,0 g |
| Rouge de phénol | 0,025 g |
| Eau purifiée | 1000 mL |

Chauffez à ébullition pendant 1 min en agitant. Ajustez le pH pour qu'il soit de 7,4 ± 0,2 à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

**Milieu renforcé pour clostridies**

| | |
|---|---|
| Extrait de viande de boeuf | 10,0 g |
| Peptone | 10,0 g |
| Extrait de levure | 3,0 g |
| Amidon soluble | 1,0 g |
| Glucose monohydraté | 5,0 g |
| Chlorhydrate de cystéine | 0,5 g |
| Chlorure de sodium | 5,0 g |
| Acétate de sodium | 3,0 g |
| Gélose | 0,5 g |
| Eau purifiée | 1000 mL |

Faites gonfler la gélose, dissolvez en chauffant à ébullition sous agitation constante. Si nécessaire, ajustez le pH pour qu'il soit de 6,8 ± 0,2 à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

**Gélose Columbia**

| | |
|---|---|
| Peptone pancréatique de caséine | 10,0 g |
| Peptone peptique de viande | 5,0 g |
| Peptone pancréatique de coeur | 3,0 g |
| Extrait de levure | 5,0 g |
| Amidon de maïs | 1,0 g |
| Chlorure de sodium | 5,0 g |
| Gélose, selon pouvoir gélifiant | 10,0-15,0 g |
| Eau purifiée | 1000 mL |

Faites gonfler la gélose, dissolvez en chauffant à ébullition sous agitation constante. Si nécessaire, ajustez le pH pour qu'il soit de 7,3 ± 0,2 à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé. Laissez refroidir à 45-50 °C ; ajoutez si nécessaire une quantité de sulfate de gentamicine correspondant à 20 mg de gentamicine base et répartissez en boîtes de Pétri.

**01/2010:20614**
**corrigé 7.0**

# 2.6.14. ESSAI DES ENDOTOXINES BACTÉRIENNES

L'essai des endotoxines bactériennes (EEB) est destiné à la détection ou la quantification des endotoxines produites par des bactéries gram-négatives, au moyen d'un lysat d'amoebocytes de limule (*Limulus polyphemus* ou *Tachypleus tridentatus*).
Il peut être réalisé par 3 techniques : gélification (induction de la formation d'un gel), turbidimétrie (développement d'une turbidité par clivage d'un substrat endogène), colorimétrie (développement d'une coloration par clivage d'un complexe peptide-chromogène synthétique).

6 méthodes sont décrites dans le présent chapitre :

Méthode A. Gélification : essai limite.

Méthode B. Gélification : essai semi-quantitatif.

Méthode C. Turbidimétrie cinétique.

Méthode D. Colorimétrie cinétique.

Méthode E. Colorimétrie en point final.

Méthode F. Turbidimétrie en point final.

Effectuez l'essai par l'une des 6 méthodes décrites. En cas de doute ou de litige, la décision finale est prise sur la base des résultats obtenus par la méthode A, sauf indication contraire dans la monographie.

L'essai est effectué dans des conditions permettant d'éviter toute contamination par des endotoxines.

## 1. APPAREILLAGE

Dépyrogénez dans un four à air chaud, par une méthode validée, toute la verrerie et les autres éléments d'appareillage résistant à la chaleur. La durée et la température minimales de chauffage sont généralement de 30 min à 250 °C. Si de l'appareillage en plastique est utilisé (par exemple des plaques de microtitrage ou des pointes de pipette pour distributeurs automatiques), l'absence de contamination détectable par des endotoxines et l'absence d'interférence de ce matériel dans l'essai doit être établie.

*NOTE : dans le présent chapitre, le terme « tube » est employé pour désigner tous types de récipients, par exemple les puits de plaques de microtitrage.*

## 2. RÉACTIFS ET SOLUTIONS

**(1) Lysat d'amoebocytes**

Le lysat d'amoebocytes est un produit lyophilisé obtenu à partir d'un lysat d'amoebocytes de limule (*Limulus polyphemus* ou *Tachypleus tridentatus*) conformément aux dispositions définies par l'Autorité compétente.

*NOTE : le lysat d'amoebocytes réagit non seulement avec les endotoxines, mais également avec certains β-glucanes. Il existe des préparations de lysat d'amoebocytes ne réagissant pas avec les glucanes ; elles sont obtenues par élimination du facteur G (responsable de la réaction avec les glucanes) dans le lysat d'amoebocytes, ou par inhibition du système réactif du facteur G. Ces préparations peuvent être utilisées pour effectuer l'essai des endotoxines bactériennes en présence de glucanes.*

**(2) Solution de lysat**

Dissolvez du lysat d'amoebocytes dans de l'eau EEB ou dans un tampon, comme recommandé par le fabricant du lysat, sous agitation modérée. Conservez le lysat reconstitué au réfrigérateur ou au congélateur, comme indiqué par le fabricant.

**(3) Eau EEB (eau pour essai des endotoxines bactériennes)**

*Eau pour préparations injectables R* ou eau produite par un autre procédé ne présentant pas de réaction avec le lysat utilisé à la limite de détection du réactif.

## 3. PRÉPARATION DE LA SOLUTION MÈRE ÉTALON D'ENDOTOXINE

Préparez une solution mère étalon d'endotoxine à partir d'une préparation de référence d'endotoxine étalonnée par rapport à l'étalon international, par exemple l'*étalon d'endotoxine PBR*.

La teneur en endotoxines est exprimée en Unités Internationales (UI). La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

*NOTE : une Unité Internationale (UI) d'endotoxine équivaut à une Unité d'Endotoxine (U.E.).*

Pour la préparation et la conservation de la solution mère étalon d'endotoxine, suivez les instructions figurant sur la notice et l'étiquette.

## 4. PRÉPARATION DES SOLUTIONS ÉTALONS D'ENDOTOXINE

Après avoir énergiquement agité la solution mère étalon d'endotoxine, préparez les dilutions en série appropriées de cette solution avec de l'eau EEB.

Utilisez ces solutions dès que possible pour éviter une éventuelle perte d'activité par adsorption.

## 5. PRÉPARATION DES SOLUTIONS À EXAMINER

Préparez les solutions à examiner en dissolvant ou en diluant la substance active ou le produit médicinal à examiner avec de l'eau EEB. Pour la dissolution ou la dilution de certaines substances ou préparations, l'emploi d'autres solutions aqueuses peut être plus approprié. Si nécessaire, ajustez le pH de la solution à examiner ou de la dilution utilisée, de telle sorte que le mélange de cette solution et du lysat ait un pH compris dans l'intervalle spécifié par le fabricant du lysat (généralement 6,0 à 8,0). L'ajustement du pH peut être effectué au moyen d'un acide, d'une base ou d'un tampon approprié, selon les recommandations du fabricant du lysat. Les acides et les bases peuvent être préparés à partir de solutions concentrées ou de solides, avec de l'eau EEB, dans des récipients exempts d'endotoxines détectables. L'absence dans les tampons d'endotoxines détectables et de facteurs d'interférence doit être vérifiée.

## 6. DÉTERMINATION DE LA DILUTION MAXIMALE SIGNIFICATIVE

La Dilution Maximale Significative (DMS) est la dilution maximale d'un échantillon à laquelle la limite en endotoxines peut être déterminée. Elle est calculée à l'aide de la formule :

$$\frac{\text{limite en endotoxines} \times \text{concentration de la solution à examiner}}{\lambda}$$

*Limite en endotoxines* : la limite en endotoxines d'une substance administrée par voie parentérale, définie sur une base posologique, est égale à :

$$\frac{K}{M}$$

$K$ = dose seuil d'endotoxines ayant un effet pyrogène, par kilogramme de masse corporelle,

$M$ = dose maximale recommandée pour le produit, en bolus, par kilogramme de masse corporelle.

Lorsque le produit est destiné à être administré par injections rapprochées ou en perfusion continue, $M$ est la dose maximale totale par heure.

La limite en endotoxines des produits pour administration parentérale est spécifiée en UI/mL, UI/mg, UI/Unité d'activité biologique, etc. dans les monographies.

*Concentration de la solution à examiner* :

– mg/mL si la limite en endotoxines est spécifiée par rapport à la masse (UI/mg),

– Unités/mL si la limite en endotoxines est spécifiée par rapport à l'unité d'activité biologique (UI/Unité),

– mL/mL si la limite en endotoxines est spécifiée par rapport au volume (UI/mL).

$\lambda$ = pour la technique de gélification, sensibilité déclarée du lysat (UI/mL) ; pour les techniques turbidimétrique et colorimétrique, concentration la plus basse utilisée sur la courbe d'étalonnage.

## 7. TECHNIQUE DE GÉLIFICATION (MÉTHODES A ET B)

La technique de gélification permet la détection ou la quantification des endotoxines grâce à la propriété que possède le lysat de coaguler en présence d'endotoxines. La concentration minimale d'endotoxines requise pour produire la coagulation du lysat dans des conditions normalisées est la sensibilité déclarée du lysat. Afin d'assurer la fidélité et la validité de l'essai, des contrôles préliminaires, décrits sous 1. Contrôles préliminaires, sont effectués pour confirmer la sensibilité déclarée et vérifier l'absence de facteurs d'interférence.

### *1. CONTRÔLES PRÉLIMINAIRES*

**(i) Confirmation de la sensibilité déclarée du lysat**

Avant d'utiliser le lysat pour la réalisation de l'essai, confirmez la sensibilité déclarée $\lambda$ de la solution de lysat, exprimée en UI/mL, sur une série de solutions préparées en 4 exemplaires. Ce contrôle est effectué chaque fois qu'un nouveau lot de lysat est utilisé ou que des modifications susceptibles d'affecter le résultat de l'essai sont apportées aux conditions de l'essai.

Préparez en 4 exemplaires une série de solutions étalons comprenant au minimum 4 concentrations respectivement équivalentes à 2λ, λ, 0,5λ et 0,25λ, en diluant la solution mère étalon d'endotoxine avec de l'eau EEB.

Mélangez dans chacun des tubes un volume égal (0,1 mL par exemple) de la solution de lysat et de l'une des solutions étalons. Si le lysat utilisé est lyophilisé en ampoules ou en flacons unitaires, ajoutez directement les solutions étalons dans le flacon ou l'ampoule. Incubez le mélange de réaction pendant une durée donnée, selon les recommandations du fabricant de lysat (généralement à 37 ± 1 °C pendant 60 ± 2 min), en évitant toute vibration. Vérifiez l'intégrité des gels : pour les tubes, sortez un à un chacun des tubes de l'incubateur et retournez-le en le faisant pivoter de 180° environ d'un seul mouvement sans à-coups. S'il s'est formé un gel solide qui reste en place lors de l'inversion du tube, enregistrez le résultat comme positif. Dans le cas contraire, le résultat est négatif.

L'essai n'est valable que si un résultat négatif est obtenu avec chaque exemplaire de la solution étalon ayant la concentration la plus faible.

Le point final est la plus faible concentration, dans la série de solutions étalons d'endotoxine de concentration décroissante, qui entraîne la gélification du lysat. Déterminez la moyenne géométrique de la concentration au point final en calculant la moyenne des logarithmes des concentrations au point final des 4 séries de dilution, prenez l'antilogarithme de cette valeur comme l'indique l'expression :

Moyenne géométrique de la concentration au point final $= \text{antilog} \frac{\sum e}{f}$

$\sum e$ = somme des concentrations au point final, en valeurs logarithmiques, obtenues dans les séries de dilutions utilisées,

$f$ = nombre d'exemplaires.

La valeur ainsi obtenue est la sensibilité mesurée de la solution de lysat en UI/mL. Si cette valeur est comprise entre 0,5λ et 2λ (bornes incluses), la sensibilité déclarée est confirmée et utilisée pour les essais réalisés avec ce même lysat.

**(ii) Recherche de facteurs d'interférence**

Préparez les solutions A, B, C, D comme indiqué dans le tableau 2.6.14.-1, et utilisez des solutions à examiner de dilution inférieure à la DMS, ne contenant pas d'endotoxines détectables. Opérez comme décrit sous 1. Contrôles préliminaires, (i) Confirmation de la sensibilité déclarée du lysat.

Déterminez la moyenne géométrique de la concentration au point final pour les solutions B et C à l'aide de l'expression donnée sous 1. Contrôles préliminaires, (i) Confirmation de la sensibilité déclarée du lysat.

La recherche de facteurs d'interférence doit être effectuée chaque fois que des modifications susceptibles d'affecter le résultat de l'essai sont apportées aux conditions expérimentales.

Tableau 2.6.14.-1

| Solution | Concentration en endotoxines/Solution à laquelle sont ajoutées les endotoxines | Diluant | Facteur de dilution | Concentration en endotoxines | Nombre d'exemplaires |
|---|---|---|---|---|---|
| A | Néant/Solution à examiner | - | - | - | 4 |
| B | 2λ/Solution à examiner | Solution à examiner | 1 | 2λ | 4 |
| | | | 2 | 1λ | 4 |
| | | | 4 | 0,5λ | 4 |
| | | | 8 | 0,25λ | 4 |
| C | 2λ/Eau EEB | Eau EEB | 1 | 2λ | 2 |
| | | | 2 | 1λ | 2 |
| | | | 4 | 0,5λ | 2 |
| | | | 8 | 0,25λ | 2 |
| D | Néant/Eau EEB | - | - | - | 2 |

Solution A = solution de la préparation à examiner ne contenant pas d'endotoxines détectables.
Solution B = contrôle d'interférence.
Solution C = témoin pour la sensibilité déclarée du lysat.
Solution D = témoin négatif (eau EEB).

L'essai n'est valable que si aucune des solutions A et D ne donne de réaction positive et si le résultat obtenu avec la solution C confirme la sensibilité déclarée du lysat.

Si la sensibilité du lysat déterminée avec la solution B est comprise entre 0,5λ et 2λ (bornes incluses), la solution à examiner ne contient pas de facteurs d'interférence dans les conditions expérimentales utilisées. Dans le cas contraire, il y a interférence de la solution à examiner dans l'essai.

Si la préparation à examiner interfère dans l'essai à une dilution inférieure à la DMS, répétez la recherche de facteurs d'interférence à une dilution plus élevée mais ne dépassant pas la DMS. L'emploi d'un lysat plus sensible permet une dilution plus poussée de la préparation à examiner, et peut ainsi contribuer à l'élimination d'éventuelles interférences.

Les facteurs d'interférence peuvent être éliminés par un traitement approprié, validé, tel que la filtration, la neutralisation, la dialyse ou le chauffage. Pour vérifier que le traitement choisi permet d'éliminer l'interférence constatée sans entraîner de déperdition en endotoxines, répétez la recherche de facteurs d'interférence sur la préparation à examiner additionnée d'étalon d'endotoxine et soumise au traitement choisi.

*2. ESSAI LIMITE (MÉTHODE A)*

**(i) Mode opératoire**

Préparez les solutions A, B, C, D comme indiqué dans le tableau 2.6.14.-2, et effectuez l'essai sur ces solutions selon le mode opératoire décrit sous 1. Contrôles préliminaires, (i) Confirmation de la sensibilité déclarée du lysat.

Tableau 2.6.14.-2

| Solution | Concentration en endotoxines/Solution à laquelle sont ajoutées les endotoxines | Nombre d'exemplaires |
|---|---|---|
| A | Néant/Solution à examiner diluée | 2 |
| B | 2λ/Solution à examiner diluée | 2 |
| C | 2λ/Eau EEB | 2 |
| D | Néant/Eau EEB | 2 |

Préparez la solution A et la solution B (témoin positif-produit) en utilisant une dilution inférieure ou égale à la DMS et en la traitant comme décrit sous 1. Contrôles préliminaires, (ii) Recherche de facteurs d'interférence. Les solutions B et C (témoins positifs) contiennent l'étalon d'endotoxine à une concentration équivalente à deux fois la sensibilité déclarée du lysat. La solution D (témoin négatif) est constituée d'eau EEB.

**(ii) Interprétation**

L'essai n'est valable que si les résultats obtenus avec chacun des exemplaires des solutions B et C sont positifs et si les 2 résultats obtenus avec la solution D sont négatifs.

Si les 2 résultats obtenus avec la solution A sont négatifs, la préparation à examiner satisfait à l'essai.

Si les 2 résultats obtenus avec la solution A sont positifs, la préparation à examiner ne satisfait pas à l'essai.

Si l'un des résultats obtenus avec la solution A est positif et l'autre négatif, répétez l'essai. Si, lors de la répétition, les 2 résultats obtenus avec la solution A sont négatifs, la préparation à examiner satisfait à l'essai ; si l'un des résultats obtenus pour la solution A (ou les deux) est positif, la préparation à examiner ne satisfait pas à l'essai.

Toutefois, si une préparation qui ne satisfait pas à l'essai a été examinée à une dilution inférieure à la DMS, l'essai peut être répété à une dilution plus élevée mais ne dépassant pas la DMS.

*3. ESSAI QUANTITATIF (MÉTHODE B)*

**(i) Mode opératoire**

Cet essai permet de quantifier les endotoxines bactériennes présentes dans la solution à examiner par titrage en point final. Préparez les solutions A, B, C, D comme indiqué dans le tableau 2.6.14.-3, et effectuez l'essai sur ces solutions selon le mode opératoire décrit sous 1. Contrôles préliminaires, (i) Confirmation de la sensibilité déclarée du lysat.

**(ii) Calcul et interprétation**

L'essai n'est valable que si les 3 conditions suivantes sont satisfaites :

(a) les 2 résultats obtenus pour la solution D (témoin négatif) sont négatifs,

(b) les 2 résultats obtenus pour la solution B (témoin positif-produit) sont positifs,

(c) la moyenne géométrique de la concentration au point final obtenue pour la solution C est comprise entre 0,5λ et 2λ.

Pour déterminer la concentration en endotoxines de la solution A, calculez la concentration au point final pour chacune des gammes, en multipliant le facteur de dilution au point final par λ.

La concentration en endotoxines de la solution à examiner est la concentration au point final obtenue pour les gammes. Si l'essai a été effectué avec la solution à examiner prédiluée, calculez la concentration en endotoxines de la solution initiale en multipliant le résultat par le facteur de dilution.

Si aucune des dilutions de la solution à examiner ne donne de résultat positif, les conditions de validité de l'essai étant par ailleurs satisfaites, notez la concentration en endotoxines comme inférieure à λ (ou, si l'essai a été réalisé avec la solution prédiluée, au plus petit facteur de dilution utilisé × λ). Si toutes les dilutions donnent un résultat positif, notez la concentration en endotoxines comme supérieure ou égale au plus grand facteur de dilution utilisé × λ (par exemple, dans le tableau 2.6.14.-3, facteur de dilution initial × 8 × λ).

La préparation à examiner satisfait à l'essai si la concentration en endotoxines des 2 gammes est inférieure à la limite spécifiée dans la monographie.

Tableau 2.6.14.-3

| Solution | Concentration en endotoxines/Solution à laquelle sont ajoutées les endotoxines | Diluant | Facteur de dilution | Concentration en endotoxines | Nombre d'exemplaires |
|---|---|---|---|---|---|
| A | Néant/Solution à examiner | Eau EEB | 1 | - | 2 |
| | | | 2 | - | 2 |
| | | | 4 | - | 2 |
| | | | 8 | - | 2 |
| B | 2λ/Solution à examiner | | 1 | 2λ | 2 |
| C | 2λ/Eau EEB | Eau EEB | 1 | 2λ | 2 |
| | | | 2 | 1λ | 2 |
| | | | 4 | 0,5λ | 2 |
| | | | 8 | 0,25λ | 2 |
| D | Néant/Eau EEB | - | - | - | 2 |

Solution A = solution à examiner à la dilution, inférieure ou égale à la DMS, à laquelle a été effectuée la recherche des facteurs d'interférence. Les dilutions suivantes de la solution à examiner ne doivent pas dépasser la DMS. Utilisez de l'eau EEB pour préparer une série de dilutions de 4 tubes contenant la solution à examiner aux concentrations de 1, 1/2, 1/4 et 1/8 de la dilution à laquelle a été effectué le contrôle des facteurs d'interférence. D'autres dilutions, ne dépassant pas la DMS, peuvent être utilisées si besoin est.

Solution B = solution A contenant l'étalon d'endotoxine à la concentration 2λ (témoin positif-produit).

Solution C = une série de dilutions de 4 tubes d'eau EEB contenant l'étalon d'endotoxine à concentration 2λ, λ, 0,5λ et 0,25λ.

Solution D = eau EEB (témoin négatif).

## 8. TECHNIQUES PHOTOMÉTRIQUES QUANTITATIVES (MÉTHODES C, D, E ET F)

### *1. TECHNIQUE TURBIDIMÉTRIQUE (MÉTHODES C ET F)*

Cette technique consiste à mesurer l'accroissement de turbidité, par photométrie. Selon le principe expérimental mis en oeuvre, la méthode utilisée est dite turbidimétrie en point final ou turbidimétrie cinétique.

La turbidimétrie en point final (méthode F) repose sur l'existence d'une relation quantitative entre la concentration en endotoxines et la turbidité (absorbance ou transmission) atteinte dans le mélange réactif à la fin d'une période d'incubation.

La turbidimétrie cinétique (méthode C) repose sur la mesure du temps requis pour atteindre une absorbance ou une transmittance prédéfinie dans le mélange réactif, ou bien de la vitesse de développement de la turbidité.

L'essai est effectué à la température d'incubation recommandée par le fabricant du lysat (généralement 37 ± 1 °C).

### *2. TECHNIQUE COLORIMÉTRIQUE (MÉTHODES D ET E)*

Cette technique consiste à mesurer la quantité de chromophore libéré par un peptide chromogène approprié lors de la réaction des endotoxines avec le lysat. Selon le principe expérimental mis en oeuvre, la méthode utilisée est dite colorimétrie en point final ou colorimétrie cinétique.

La colorimétrie en point final (méthode E) repose sur l'existence d'une relation quantitative entre la concentration en endotoxines et la quantité de chromophore libéré à la fin d'une période d'incubation.

La colorimétrie cinétique (méthode D) mesure le temps requis pour atteindre une absorbance prédéfinie dans le mélange réactif, ou bien la vitesse de développement de la coloration.

L'essai est effectué à la température d'incubation recommandée par le fabricant du lysat (généralement 37 ± 1 °C).

### *3. CONTRÔLES PRÉLIMINAIRES*

Afin d'assurer la fidélité et la validité des techniques turbidimétriques et colorimétriques, des contrôles préliminaires sont effectués pour vérifier que les critères de validité de la courbe d'étalonnage sont satisfaits et que la solution à examiner n'interfère pas dans l'essai.

Il est nécessaire de valider la méthode d'essai chaque fois que des modifications susceptibles d'affecter le résultat de l'essai sont apportées aux conditions expérimentales.

**(i) Vérification des critères de validité de la courbe d'étalonnage**

Cet essai est à effectuer pour chaque lot de lysat utilisé comme réactif.

A partir de la solution étalon d'endotoxine, préparez au moins 3 solutions de concentrations différentes comprises dans l'intervalle indiqué par le fabricant du lysat, pour établir la courbe d'étalonnage. Effectuez l'essai sur 3 exemplaires au moins de chacune de ces solutions étalons, suivant les instructions fournies par le fabricant du lysat (proportions en volume, temps d'incubation, température, pH, etc.).

Si, pour les méthodes cinétiques, l'intervalle de concentration souhaité est supérieur à 2 log, il convient de préparer des solutions étalons supplémentaires de façon à encadrer chaque incrément logarithmique de l'intervalle couvert par la courbe d'étalonnage.

La valeur absolue du coefficient de corrélation, $|r|$, doit être supérieure ou égale à 0,980 sur l'intervalle de concentration en endotoxines adopté.

**(ii) Recherche de facteurs d'interférence**

Choisissez une concentration en endotoxines coïncidant avec le milieu de la courbe d'étalonnage, ou s'en approchant.

Préparez les solutions A, B, C, D comme indiqué dans le tableau 2.6.14.-4. Effectuez l'essai sur 2 exemplaires au moins de chacune de ces solutions, suivant les instructions fournies par le fabricant du lysat (volumes d'échantillon et de solution de lysat, rapport de ces volumes, temps d'incubation, etc.).

L'essai n'est valable que si les conditions suivantes sont satisfaites :

– le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage établie à l'aide de la solution C est, en valeur absolue, supérieur ou égal à 0,980,
– le résultat obtenu avec la solution D n'est pas supérieur à la limite spécifiée pour le blanc dans la description du lysat utilisé comme réactif, ou est inférieur à la limite de détection de ce lysat.

Calculez le recouvrement moyen des endotoxines ajoutées en soustrayant (le cas échéant) la concentration moyenne en endotoxines de la solution seule (solution A, tableau 2.6.14.-4) de celle obtenue pour la solution contenant les endotoxines ajoutées (solution B, tableau 2.6.14.-4).

Tableau 2.6.14.-4

| Solution | Concentration en endotoxines | Solution à laquelle sont ajoutées les endotoxines | Nombre d'exemplaires |
|---|---|---|---|
| A | Néant | Solution à examiner | Au moins 2 |
| B | Concentration médiane de la courbe d'étalonnage | Solution à examiner | Au moins 2 |
| C | Au moins 3 concentrations (la plus faible est désignée λ) | Eau EEB | Au moins 2 pour chaque concentration |
| D | Néant | Eau EEB | Au moins 2 |

Solution A = solution à examiner éventuellement diluée, jusqu'à la DMS au maximum.

Solution B = préparation à examiner à la même dilution que la solution A, contenant des endotoxines ajoutées à une concentration coïncidant avec le milieu de la courbe d'étalonnage, ou s'en approchant.

Solution C = solutions étalons d'endotoxine de mêmes concentrations que celles utilisées pour la validation décrite sous 3. Contrôles préliminaires, (i) Vérification des critères de validité de la courbe d'étalonnage (témoins positifs).

Solution D = eau EEB (témoin négatif).

La solution à examiner est considérée comme exempte de facteurs d'interférence dans les conditions de l'essai si la concentration mesurée en endotoxines ajoutées est comprise entre 50 pour cent et 200 pour cent de la concentration connue en endotoxines ajoutées, après déduction des endotoxines éventuellement détectées dans la solution non additionnée d'endotoxines.

Si le taux de recouvrement en endotoxines n'est pas compris dans l'intervalle spécifié, la solution à examiner est considérée comme non exempte de facteurs d'interférence. Dans ce cas, répétez la recherche de facteurs d'interférence à une dilution plus élevée mais ne dépassant pas la DMS. L'interférence exercée par la solution à examiner ou par la solution à examiner diluée (sans que la dilution dépasse la DMS) peut également être éliminée par un traitement approprié, validé, tel que la filtration, la neutralisation, la dialyse ou le chauffage. Pour vérifier que le traitement choisi permet d'éliminer l'interférence constatée sans entraîner de déperdition en endotoxines, répétez la recherche de facteurs d'interférence sur la préparation à examiner additionnée d'étalon d'endotoxine et soumise au traitement choisi.

*4. ESSAI*

**(i) Mode opératoire**

Opérez comme décrit sous 3. Contrôles préliminaires, (ii) Recherche de facteurs d'interférence.

**(ii) Calcul**

Calculez la concentration en endotoxines de chaque exemplaire de la solution A à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la solution C (témoin positif).

L'essai n'est valable que si les 3 conditions suivantes sont satisfaites :

(1) les résultats obtenus pour la solution C satisfont aux exigences de validité définies sous 3. Contrôles préliminaires, (i) Vérification des critères de validité de la courbe d'étalonnage,

(2) le recouvrement en endotoxines, calculé à partir de la concentration en endotoxines obtenue pour la solution B après déduction de la concentration en endotoxines obtenue pour la solution A, est compris entre 50 pour cent et 200 pour cent,

(3) le résultat obtenu pour la solution D (témoin négatif) n'est pas supérieur à la limite spécifiée pour le blanc dans la description du lysat utilisé, ou est inférieur à la limite de détection de ce lysat.

**(iii) Interprétation**

La préparation à examiner satisfait à l'essai si la concentration moyenne en endotoxines des solutions A, après correction de dilution et concentration, est inférieure à la limite en endotoxines spécifiée pour le produit.

*Des recommandations sur l'essai des endotoxines bactériennes sont données dans le chapitre général 5.1.10.*

**01/2008:20615**

# 2.6.15. ACTIVATEUR DE PRÉKALLIKRÉINE

L'activateur de prékallikréine (PKA) transforme la prékallikréine en kallikréine et peut être titré sur la base de sa capacité à scinder le chromophore d'un substrat peptidique synthétique, la vitesse de réaction étant déterminée par spectrophotométrie et la concentration en PKA calculée par comparaison à une préparation de référence étalonnée en Unités Internationales.

L'Unité Internationale correspond à l'activité d'une quantité donnée de l'étalon international, qui est constitué par de l'activateur de prékallikréine cryodesséché. La correspondance entre les Unités Internationales et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

RÉACTIFS

L'*activateur de prékallikréine dans l'albumine PBR* est étalonné en Unités Internationales par rapport à l'étalon international.

*Solution tampon A.* Dissolvez 6,055 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R*, 1,17 g de *chlorure de sodium R*, 50 mg de *bromure d'hexadiméthrine R* et 0,100 g d'*azide de sodium R* dans de l'*eau R*. Ajustez à pH 8,0 avec de l'*acide chlorhydrique 2 M R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

*Solution tampon B.* Dissolvez 6,055 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* et 8,77 g de *chlorure de sodium R* dans de l'*eau R*. Ajustez à pH 8,0 avec de l'*acide chlorhydrique 2 M R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

PRÉPARATION DU SUBSTRAT DE PRÉKALLIKRÉINE

*Pour éviter une activation par la coagulation, le sang ou le plasma employés pour la préparation de la prékallikréine ne doivent être mis en contact qu'avec des matières plastiques ou du verre siliconé.*

Prélevez 9 volumes de sang humain dans 1 volume de solution anticoagulante (ACD, CPD ou solution de *citrate de sodium R* à 38 g/L) additionnée de 1 mg/mL de *bromure d'hexadiméthrine R*. Centrifugez le mélange à 3600 *g* pendant 5 min. Séparez le plasma et centrifugez à 6000 *g* pendant 20 min pour séparer les plaquettes. Recueillez le plasma pauvre en plaquettes et procédez à une dialyse contre 10 volumes de solution tampon A pendant 20 h. Après dialyse, déposez le plasma sur une colonne chromatographique contenant 2 fois son volume d'*agarose-DEAE pour chromatographie à échange d'ions R* préalablement équilibrée dans la solution tampon A. Procédez à l'élution avec la solution tampon A à un débit de 20 mL/cm$^2$/h. Recueillez l'éluat par fractions et enregistrez l'absorbance à 280 nm (*2.2.25*). Réunissez les fractions contenant le premier pic protéique de telle sorte que le volume de mélange obtenu soit égal à environ 1,2 fois celui du plasma pauvre en plaquettes.

Pour vérifier l'absence d'activité kallikréine dans ce substrat, mélangez 1 volume du substrat et 20 volumes de la solution de substrat chromogène, préalablement chauffée, qui sera utilisée dans le titrage, et incubez à 37 °C pendant 2 min. Le substrat est approprié si l'absorbance n'augmente pas de plus de 0,001 par minute. Ajoutez 7 g/L de *chlorure de sodium R* à la solution de substrat et filtrez sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm). Congelez le filtrat en parties aliquotes et conservez à – 25 °C ; le filtrat peut également être cryodesséché avant conservation.

Effectuez l'ensemble des opérations, depuis le début de la chromatographie jusqu'à la congélation en parties aliquotes, pendant une seule journée de travail.

MODE OPÉRATOIRE

Le titrage peut être effectué au moyen d'un analyseur enzymatique automatique ou d'un système sur plaques de microtitrage approprié permettant les mesures cinétiques et associé à un logiciel approprié de calcul des résultats. Les étalons, les échantillons et le substrat de prékallikréine peuvent si nécessaire être dilués avec la solution tampon B.

Faites incuber les étalons ou échantillons dilués pendant 10 min en présence du substrat de prékallikréine : le volume avant dilution de l'étalon ou de l'échantillon ne doit pas excéder 1/10 du volume total du mélange d'incubation, afin d'éviter les erreurs dues aux variations de force ionique et de pH. Faites incuber le mélange ou une partie du mélange avec un volume égal ou supérieur de solution d'un substrat chromogène synthétique reconnu spécifique de la kallikréine (par exemple, l'*acétate de N-benzoyl-L-prolyl-L-phénylalanyl-L-arginine 4-nitroanilide R* ou le *dichlorhydrate de D-prolyl-L-phénylalanyl-L-arginine-4-nitroanilide R*), dissous dans de la solution tampon B. Enregistrez la variation d'absorbance par minute ($\Delta A$/min) pendant 2-10 min à la longueur d'onde appropriée pour le substrat employé. Pour chaque mélange d'étalon ou d'échantillon, préparez un blanc en substituant la solution tampon B au substrat de prékallikréine.

Selon la méthode utilisée, il convient de corriger $\Delta A$/min par soustraction de la valeur obtenue pour le blanc correspondant, en l'absence du substrat de prékallikréine. Les résultats peuvent être calculés à l'aide d'une courbe d'étalonnage, du modèle en lignes parallèles ou à rapport de pente ou de toute autre méthode statistique appropriée. Etablissez une courbe d'étalonnage à partir des valeurs $\Delta A$/min obtenues pour la préparation de référence et des concentrations correspondantes, puis déterminez la teneur en PKA de la préparation à examiner.

**01/2011:20616**

## 2.6.16. ESSAI DES AGENTS ÉTRANGERS DANS LES VACCINS VIRAUX POUR USAGE HUMAIN

Pour les essais qui exigent une neutralisation préalable du virus, effectuez celle-ci à l'aide d'anticorps spécifiques d'origine non-humaine, non-simienne ; si le virus a été multiplié sur un substrat aviaire, les anticorps doivent être également d'origine non-aviaire. Dans la préparation d'immunosérums, utilisez un antigène immunisant obtenu dans des cultures cellulaires provenant d'une espèce différente de celle utilisée pour la production du vaccin et exempt d'agents étrangers. Lorsqu'il est prescrit d'utiliser des oeufs EOPS, ces derniers proviennent d'élevages exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (*5.2.2*).

LOT DE SEMENCE

Prélevez des échantillons du lot de semence de virus au moment de la récolte et s'ils ne sont pas examinés immédiatement, conservez-les à une température inférieure à – 40 °C.

**Souris adultes**. Utilisez au moins 10 souris adultes, pesant chacune de 15-20 g. Inoculez à chacune d'elles 0,03 mL du lot de semence par voie intracérébrale et 0,5 mL par voie intrapéritonéale. Mettez les souris en observation pendant au moins 21 jours. Procédez à l'examen nécropsique de toutes les souris qui meurent après les premières 24 h de l'essai ou qui présentent des symptômes de maladie, afin de déceler les signes d'infection virale, à la fois par observation macroscopique directe et par subinoculation de suspensions de tissus appropriés, par voies intracérébrale et intrapéritonéale, à au moins 5 souris supplémentaires qui seront mises en observation pendant 21 jours. Le lot de semence satisfait à l'essai si aucune souris ne présente des signes d'infection attribuables au lot de semence. L'essai n'est valable que si au moins 80 pour cent des premières souris inoculées survivent à la période d'observation.

**Souriceaux**. Utilisez au moins 20 souriceaux, âgés de moins de 24 h ; inoculez à chacun d'eux 0,01 mL du lot de semence par voie intracérébrale et au moins 0,1 mL par voie intrapéritonéale. Observez les souriceaux quotidiennement pendant au moins 14 jours. Procédez à l'examen nécropsique de tous les souriceaux qui meurent après les premières 24 h ou qui présentent des symptômes de maladie afin de déceler les signes d'infection virale, à la fois par observation macroscopique directe et par subinoculation de suspensions de tissus appropriés, par voies intracérébrale et intrapéritonéale, à au moins 5 souriceaux supplémentaires qui seront mis en observation quotidienne pendant 14 jours. Le lot de semence satisfait à l'essai si aucun souriceau ne présente de signes d'infection attribuables au lot de semence. L'essai n'est valable que si 80 pour cent au moins des premiers souriceaux inoculés survivent à la période d'observation.

**Cobayes**. Inoculez par voie intrapéritonéale 5,0 mL du lot de semence à au moins 5 cobayes, pesant chacun de 350 g à 450 g. Mettez les animaux en observation pendant au moins 42 jours pour déceler tout symptôme de maladie. Procédez à l'examen nécropsique macroscopique de tous les cobayes qui meurent après les premières 24 h de l'essai ou qui présentent des signes de maladie ; examinez également les tissus à la fois par microscopie et par culture pour rechercher l'infection. Euthanasiez les animaux qui survivent à la période d'observation et examinez-les d'une manière comparable. Le lot de semence satisfait à l'essai si aucun cobaye ne présente de signes d'infection attribuables au lot de semence. L'essai n'est valable que si 80 pour cent au moins des cobayes survivent à la période d'observation.

**Spiroplasmes**. L'absence de spiroplasmes dans les lots de semence virale produits sur des cellules d'insecte est démontrée par une méthode validée approuvée par l'Autorité compétente.

LOT DE SEMENCE ET RÉCOLTES DE VIRUS

Prélevez des échantillons au moment de la récolte et s'ils ne sont pas examinés immédiatement, conservez-les à une température inférieure à – 40 °C.

**Stérilité bactérienne et fongique**. Un échantillon de 10 mL satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*).

**Mycoplasmes**. Un échantillon de 10 mL satisfait à l'essai des mycoplasmes (*2.6.7*).

**Mycobactéries** (*2.6.2*). Un échantillon de 5 mL est soumis à l'essai pour détecter la présence de *Mycobacterium* spp. par des méthodes de culture reconnues sensibles pour la détection de ces organismes.

**Recherche d'autres agents étrangers sur cultures cellulaires**. Inoculez des échantillons neutralisés correspondant, sauf indication contraire, à 500 doses humaines de vaccin ou 50 mL, en choisissant la quantité la plus importante, à des cultures de cellules continues de rein simien et de cellules humaines. Si le virus est produit dans des cellules simiennes ou humaines, la récolte de virus neutralisée est inoculée à une autre culture de ces cellules. Si le virus est produit dans un système de cellules mammifères ou aviaires autre qu'un système simien ou humain, les cellules de cette espèce, mais d'un autre lot, sont également inoculées. Faites incuber les cellules à 36 ± 1 °C et observez-les pendant 14 jours. Le lot de semence ou la récolte de virus satisfait à l'essai si aucun signe de la présence d'agents étrangers n'apparaît. L'essai n'est valable que si au moins 80 pour cent des cultures cellulaires demeurent viables.

**Virus aviaires (essai exigé uniquement si le lot de semence virale est multiplié sur des tissus aviaires ou si la récolte de virus est multipliée sur des tissus aviaires primaires)**. Neutralisez un échantillon correspondant à 100 doses humaines de vaccin ou à 10 mL, en choisissant la quantité la plus importante. A raison de 0,5 mL d'inoculum par oeuf, inoculez l'échantillon neutralisé : par la voie allantoïdienne à un groupe d'oeufs embryonnés EOPS, âgés de 9 à 11 jours ; dans le vitellus à un groupe d'oeufs embryonnés EOPS, âgés de 5 à 7 jours.

Faites incuber les oeufs pendant 7 jours. Le lot de semence ou la récolte de virus satisfait à l'essai si les liquides allantoïdiens et vitellins ne présentent aucun signe d'agents hémagglutinants et si les embryons et les membranes chorio-allantoïdiennes, examinés pour déceler toute pathologie macroscopique, se révèlent normaux. L'essai n'est valable que si au moins 80 pour cent des oeufs inoculés survivent pendant les 7 jours.

**Virus d'insecte (essai exigé uniquement si le virus est multiplié sur des cellules d'insecte)**. Inoculez des échantillons neutralisés correspondant, sauf indication contraire, à 500 doses humaines de vaccin ou 50 mL, en choisissant la quantité la plus importante, aux cellules d'au moins une culture, différente de celle utilisée en production, sensible aux virus d'insecte et permettant la détection des arbovirus humains. Le choix des cellules doit être approuvé par l'Autorité compétente et doit prendre en compte l'origine des cellules de production et les contaminants susceptibles d'être décelés par les cellules choisies. Faites incuber les cellules à 27 ± 1 °C et observez-les pendant 14 jours. Le lot de semence ou la récolte de virus satisfait à l'essai si aucun signe de la présence d'agents étrangers n'apparaît. L'essai n'est valable que si au moins 80 pour cent des cultures cellulaires demeurent viables.

CULTURE CELLULAIRE DE PRODUCTION : CELLULES TÉMOINS

Les cellules témoins sont examinées au microscope, pour vérifier l'absence de tout virus causant une dégénérescence cytopathogène, pendant toute la durée de l'incubation des cultures cellulaires de production inoculées, ou pendant 14 jours au moins après l'inoculation des cultures cellulaires de production, en choisissant la période la plus longue. L'essai n'est valable que si au moins 80 pour cent des cellules témoins survivent jusqu'à la fin de la période d'observation.

Au 14e jour, ou au moment de la dernière récolte du virus, en choisissant la période la plus longue, effectuez les épreuves suivantes.

**Virus hémadsorbants**. Examinez au minimum 25 pour cent des cultures témoins pour détecter la présence de virus hémadsorbants par addition d'érythrocytes de cobaye. Si l'essai des virus hémadsorbants n'est pas réalisable, effectuez un essai des virus hémagglutinants. Si les érythrocytes de cobaye ont été conservés, la conservation ne doit pas durer plus de 7 jours à une température de 5 ± 3 °C. Procédez à la lecture de la moitié des cultures après incubation à 5 ± 3 °C pendant 30 min et de l'autre moitié après incubation à 20-25 °C pendant 30 min. Il ne se présente aucun signe d'agents hémadsorbants.

**Recherche d'autres agents étrangers sur cultures cellulaires**. Réunissez les surnageants à partir des cellules témoins et examinez-les, pour détecter la présence d'agents étrangers, par inoculation de cultures de cellules de rein simien et de cultures de cellules humaines. Si le virus est produit dans un système de cellules mammifères autre que simien ou humain, les cellules de cette espèce, mais d'un autre lot, sont également inoculées. Dans chaque système de cellules au moins 5 mL sont soumis à l'essai. Faites incuber les cultures inoculées à une température de 36 ± 1 °C et observez-les pendant 14 jours. Il ne se présente aucun signe d'agents étrangers.

Si la culture cellulaire de production est maintenue à une température qui diffère de 36 ± 1 °C, un essai supplémentaire d'agents étrangers est effectué à la température utilisée pour la production en inoculant des cellules du même type que celles utilisées pour la multiplication du virus.

Si le virus est produit dans des cellules d'insecte, le mélange des surnageants est également inoculé aux cellules d'au moins une culture, différente de celle utilisée en production, sensible aux virus d'insecte et permettant la détection des arbovirus humains. Faites incuber les cellules à une température de 27 ± 1 °C pendant 14 jours. Il ne se présente aucun signe d'agents étrangers.

**Virus de la leucose aviaire (l'essai est effectué uniquement si le virus est multiplié sur des tissus aviaires primaires)**. Effectuez un essai des virus de la leucose aviaire sur 5 mL du surnageant des cellules témoins.

OEUFS TÉMOINS

**Agents hémagglutinants**. Examinez 0,25 mL du liquide allantoïdien de chaque oeuf pour la présence d'agents hémagglutinants par mélange direct avec des érythrocytes de poulet et après un passage sur oeufs EOPS effectué comme suit : inoculez un échantillon de 5 mL du mélange des liquides amniotiques des oeufs témoins sous des volumes de 0,5 mL dans la cavité allantoïdienne et dans la cavité amniotique d'oeufs EOPS. Les oeufs témoins satisfont à l'essai s'il ne se présente aucun signe d'agents hémagglutinants dans les 2 essais.

**Virus de la leucose aviaire**. Utilisez un échantillon de 10 mL du mélange des liquides amniotiques des oeufs témoins. Effectuez une amplification en pratiquant 5 passages sur des cultures de cellules d'embryons de poulet exemptes de leucose. Un essai de la leucose aviaire est effectué sur les cellules du 5e passage. Les oeufs témoins satisfont à l'essai s'il ne se présente aucun signe de la présence des virus de la leucose aviaire.

**Autres agents étrangers**. Inoculez des échantillons de 5 mL du mélange des liquides amniotiques des oeufs témoins à des cultures cellulaires d'origine humaine et simienne. Mettez les cultures cellulaires en observation pendant 14 jours. Les oeufs témoins satisfont à l'essai s'il ne se présente aucun signe d'agents étrangers. L'essai n'est valable que si 80 pour cent des cultures inoculées survivent.

**01/2010:20617**

## 2.6.17. ESSAI D'ACTIVITÉ ANTICOMPLÉMENTAIRE DE L'IMMUNOGLOBULINE

La détermination de l'activité anticomplémentaire (AAC) de l'immunoglobuline est effectuée par incubation d'une quantité donnée du produit à examiner (10 mg d'immunoglobuline) avec une quantité donnée de complément de cobaye (20 $CH_{50}$) suivie du titrage du complément restant : l'activité anticomplémentaire est exprimée par la proportion du complément consommée en prenant le témoin complément comme 100 pour cent.

L'unité hémolytique d'activité complémentaire ($CH_{50}$) est la quantité de complément qui, dans les conditions de réaction données, provoquera la lyse de $2,5 \times 10^8$ sur un nombre total de $5 \times 10^8$ érythrocytes sensibilisés de façon optimale.

*Solution mère de magnésium et de calcium.* Dissolvez 1,103 g de *chlorure de calcium R* et 5,083 g de *chlorure de magnésium R* dans de l'*eau R* et complétez à 25 mL avec le même solvant.

*Solution mère de tampon barbital.* Dissolvez 207,5 g de *chlorure de sodium R* et 25,48 g de *barbital sodique R* dans 4000 mL d'*eau R* et ajustez à pH 7,3 avec de l'*acide chlorhydrique 1 M*. Ajoutez 12,5 mL de solution mère de magnésium et de calcium et complétez à 5000 mL avec de l'*eau R*. Filtrez sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,22 µm) et conservez à 4 °C en récipient de verre.

*Solution de gélatine.* Dissolvez 12,5 g de *gélatine R* dans environ 800 mL d'*eau R* et chauffez à ébullition au bain-marie. Refroidissez à 20 °C et complétez à 10 L avec de l'*eau R*. Filtrez sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,22 µm) et conservez à 4 °C. Utilisez uniquement une solution limpide.

*Solution citratée.* Dissolvez 8,0 g de *citrate sodique R*, 4,2 g de *chlorure de sodium R* et 20,5 g de *glucose R* dans 750 mL d'*eau R*. Ajustez à pH 6,1 avec une solution d'*acide citrique R* à 100 g/L et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

*Solution tampon gélatine-barbital.* Ajoutez 4 volumes de solution de gélatine à 1 volume de solution mère de tampon barbital et mélangez. Ajustez à pH 7,3, si nécessaire, avec de l'*acide chlorhydrique 1 M* ou de l'*hydroxyde de sodium 1 M* et maintenez à 4 °C. Préparez une nouvelle solution chaque jour.

*Sang de mouton stabilisé.* Recueillez 1 volume de sang de mouton sur 1 volume de solution citratée et mélangez. Conservez le sang stabilisé à 4 °C pendant au moins 7 jours et au maximum 28 jours. (Le sang de mouton ou les érythrocytes de mouton stabilisés peuvent être obtenus auprès de plusieurs fournisseurs commerciaux.)

*Hémolysine.* Antisérum contre les érythrocytes de mouton, préparé sur lapin. (De tels antisérums peuvent être obtenus auprès de plusieurs fournisseurs commerciaux.)

*Complément de cobaye.* Mélangez les sérums préparés à partir du sang d'au moins 10 cobayes. Séparez le sérum du sang coagulé par centrifugation à environ 4 °C. Conservez le sérum en petites quantités à une température inférieure à – 70 °C.

MODE OPÉRATOIRE

**Standardisation de la suspension d'érythrocytes de mouton à 5 pour cent**. Séparez les érythrocytes de mouton par centrifugation d'un volume approprié du sang de mouton stabilisé ; lavez les cellules 3 fois au moins avec la solution tampon gélatine-barbital et préparez une suspension à 5 pour cent *V/V* dans la solution tampon gélatine-barbital. Déterminez la concentration cellulaire par la méthode suivante. Ajoutez 0,2 mL de la suspension à 2,8 mL d'*eau R* et centrifugez le lysat pendant 5 min à 1000 *g*. La concentration cellulaire est appropriée si l'absorbance (*2.2.25*) du surnageant déterminée à 541 nm est de 0,62 ± 0,01. Corrigez la concentration cellulaire par addition de solution tampon gélatine-barbital selon la formule :

$$V_f = \frac{V_i \times A}{0,62}$$

$V_f$ = volume final,

$V_i$ = volume initial,

$A$ = absorbance déterminée à 541 nm pour la suspension d'origine.

Après ajustement, la suspension contient environ $1 \times 10^9$ cellules/mL.

**Titrage de l'hémolysine**. Préparez des dilutions d'hémolysine selon le schéma du tableau 2.6.17.-1.

A chaque tube de la série de dilutions d'hémolysine à partir de la dilution au 1/75, ajoutez 1,0 mL de la suspension d'érythrocytes de mouton à 5 pour cent et mélangez. Faites incuber à 37 °C pendant 30 min.

Transférez 0,2 mL de chaque mélange de dilution d'hémolysine à de nouveaux tubes et ajoutez 1,10 mL de solution tampon gélatine-barbital et 0,2 mL d'une dilution de complément de cobaye (par exemple 1/150). Effectuez ces opérations en double.

Préparez 3 tubes témoins de cellules sans hémolyse avec 1,4 mL de solution tampon gélatine-barbital et 0,1 mL de la suspension d'érythrocytes de mouton à 5 pour cent.

Préparez 3 tubes témoins de cellules à hémolyse totale avec 1,4 mL d'*eau R* et 0,1 mL de la suspension d'érythrocytes de mouton à 5 pour cent.

Faites incuber tous les tubes à 37 °C pendant 60 min et centrifugez à 1000 *g* pendant 5 min. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque surnageant à 541 nm et calculez le degré d'hémolyse (pour cent) de chaque tube à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_a - A_1}{A_b - A_1} \times 100$$

$A_a$ = absorbance des tubes contenant les dilutions d'hémolysine,

$A_b$ = moyenne de l'absorbance des 3 tubes avec hémolyse totale,

$A_1$ = moyenne de l'absorbance des 3 tubes sans hémolyse.

Tableau 2.6.17-1

| Dilution d'hémolysine à préparer | Préparé à partir de | | |
|---|---|---|---|
| | Solution tampon gélatine-barbital | Hémolysine | |
| | Volume (mL) | Dilution (1/ ...) | Volume (mL) |
| 7,5 | 0,65 | non diluée | 0,1 |
| 10 | 0,90 | non diluée | 0,1 |
| 75 | 1,80 | 7,5 | 0,2 |
| 100 | 1,80 | 10 | 0,2 |
| 150 | 1,00 | 75 | 1,0 |
| 200 | 1,00 | 100 | 1,0 |
| 300 | 1,00 | 150 | 1,0 |
| 400 | 1,00 | 200 | 1,0 |
| 600 | 1,00 | 300 | 1,0 |
| 800 | 1,00 | 400 | 1,0 |
| 1200 | 1,00 | 600 | 1,0 |
| 1600 | 1,00 | 800 | 1,0 |
| 2400 | 1,00 | 1200 | 1,0 |
| 3200* | 1,00 | 1600 | 1,0 |
| 4800* | 1,00 | 2400 | 1,0 |

* Rejetez 1,0 mL du mélange.

Construisez une courbe sur papier graphique linéaire en portant le degré d'hémolyse (pour cent) en ordonnée et l'inverse de la dilution d'hémolysine en abscisse. La dilution optimale de l'hémolysine est déterminée à partir du graphique, en choisissant une dilution telle qu'une augmentation de la quantité d'hémolysine ne produit pas de variation sensible du degré d'hémolyse. Cette dilution est considérée comme contenant 1 unité d'hémolyse minimale (1 UHM) dans 1,0 mL. Pour la préparation des érythrocytes de mouton sensibilisés, la dilution d'hémolysine à hémolyse optimale contient 2 UHM/mL.

Le titrage de l'hémolysine n'est valable que si l'hémolyse maximale se situe entre 50 pour cent et 70 pour cent. Sinon, répétez le titrage en utilisant une solution de complément plus ou moins diluée.

**Préparation des érythrocytes de mouton sensibilisés de façon optimale (système hémolytique)**. Préparez une quantité appropriée d'hémolysine diluée contenant 2 UHM/mL. Préparez un volume égal de suspension standardisée d'érythrocytes de mouton à 5 pour cent. Ajoutez la dilution d'hémolysine à la suspension standardisée de cellules et mélangez. Faites incuber à 37 °C pendant 15 min ; conservez au réfrigérateur à 2-8 °C et utilisez dans les 6 h.

**Titrage du complément**. Préparez une dilution appropriée de complément (par exemple 1/250) avec la solution tampon gélatine-barbital et effectuez le titrage en double selon le tableau 2.6.17-2.

Tableau 2.6.17-2

| N° du tube | Volume de complément dilué (par exemple 1/250) (mL) | Volume de solution tampon gélatine-barbital (mL) |
|---|---|---|
| 1 | 0,1 | 1,2 |
| 2 | 0,2 | 1,1 |
| 3 | 0,3 | 1,0 |
| 4 | 0,4 | 0,9 |
| 5 | 0,5 | 0,8 |
| 6 | 0,6 | 0,7 |
| 7 | 0,7 | 0,6 |
| 8 | 0,8 | 0,5 |
| 9 | 0,9 | 0,4 |
| 10 | 1,0 | 0,3 |
| 11 | 1,1 | 0,2 |
| 12 | 1,2 | 0,1 |
| 3 tubes témoins à 0 pour cent d'hémolyse | – | 1,3 |
| 3 tubes témoins à 100 pour cent d'hémolyse | – | 1,3 mL d'eau |

Ajoutez 0,2 mL d'érythrocytes de mouton sensibilisés à chaque tube, mélangez et faites incuber à 37 °C pendant 60 min. Refroidissez les tubes dans un bain de glace et centrifugez à 1000 *g* pendant 5 min. Mesurez l'absorbance du surnageant à 541 nm et calculez le degré d'hémolyse *Y* à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_c - A_1}{A_b - A_1}$$

$A_c$ = absorbances des tubes 1 à 12,

$A_b$ = moyenne de l'absorbance des tubes à 100 pour cent d'hémolyse,

$A_1$ = moyenne de l'absorbance des tubes à 0 pour cent d'hémolyse.

Tracez une courbe sur papier log-log en portant les valeurs de $Y/(1-Y)$ en abscisse en fonction du volume de complément dilué en millilitres en ordonnée. Construisez la meilleure droite à travers les points et notez l'ordonnée de la dose hémolytique à 50 pour cent du complément au point où $Y/(1-Y) = 1{,}0$.

Calculez l'activité en nombre d'unités hémolytiques ($CH_{50}$/mL) à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{C_d}{C_a \times 5}$$

$C_d$ = valeur inverse de la dilution de complément,

$C_a$ = volume de complément dilué qui produit 50 pour cent d'hémolyse, en millilitres,

5 = facteur d'échelle pour tenir compte du nombre d'érythrocytes.

L'essai n'est valable que si, entre 15 pour cent et 85 pour cent d'hémolyse, la courbe est une droite dont la pente se situe de 0,15 à 0,40, et de préférence de 0,18 à 0,30.

**Essai d'activité anticomplémentaire**. Diluez le complément de cobaye titré avec la solution tampon gélatine-barbital pour obtenir 100 $CH_{50}$/mL. Selon l'immunoglobuline à examiner et au vu des données de validation, un ajustement à pH 7 peut être nécessaire. Préparez les mélanges d'incubation suivants pour une immunoglobuline contenant 50 mg/mL :

Tableau 2.6.17.-3

| | Essai | Témoin complément (en double) |
|---|---|---|
| Immunoglobuline (50 mg/mL) | 0,2 mL | – |
| Solution tampon gélatine-barbital | 0,6 mL | 0,8 mL |
| Complément | 0,2 mL | 0,2 mL |

Effectuez l'essai sur l'immunoglobuline à examiner et préparez des témoins AAC négatif et positif à partir de l'*immunoglobuline humaine PBR*, selon les indications données dans la notice qui accompagne la préparation de référence. Si la préparation à examiner ne contient pas 50 mg/mL d'immunoglobuline, ajustez les volumes de la préparation à examiner et de solution tampon gélatine-barbital : par exemple, utilisez 0,33 mL d'une préparation qui contient 30 mg/mL d'immunoglobuline et ajoutez 0,47 mL de solution tampon gélatine-barbital pour arriver au même volume total de 0,8 mL. Fermez les tubes et faites incuber à 37 °C pendant 60 min. Ajoutez 0,2 mL de chaque mélange d'incubation à 9,8 mL de solution tampon gélatine-barbital pour diluer le complément. Effectuez des titrages du complément sur le contenu de chaque tube comme décrit pour déterminer l'activité complémentaire résiduelle (voir tableau 2.6.17.-2). Calculez l'activité anticomplémentaire de la préparation à examiner, par référence au témoin complément considéré comme étant 100 pour cent, à partir de l'expression suivante :

$$\frac{a-b}{a} \times 100$$

*a* = activité complémentaire moyenne ($CH_{50}$/mL) des témoins,

*b* = activité complémentaire ($CH_{50}$/mL) de la préparation à examiner.

L'essai n'est valable que si :

– les activités anticomplémentaires trouvées pour le témoin AAC négatif et le témoin AAC positif se situent dans les limites indiquées dans la notice qui accompagne la préparation de référence,
– l'activité complémentaire moyenne des témoins *a* est de 80 $CH_{50}$/mL à 120 $CH_{50}$/mL.

**01/2008:20618**

## 2.6.18. ESSAI DE NEUROVIRULENCE DES VACCINS À VIRUS VIVANT

Utilisez pour chaque essai au moins 10 singes séronégatifs vis-à-vis du virus à examiner. Sauf indication contraire, injectez au maximum 0,5 mL du produit à examiner à chaque singe dans la région thalamique de chaque hémisphère. La quantité totale de virus inoculée à chaque singe ne doit pas être inférieure à la quantité contenue dans la dose unique de vaccin recommandée pour l'homme. Afin de vérifier l'absence de virus neurovirulent sauvage, maintenez un groupe d'au moins 4 témoins dans la même cage ou dans le voisinage immédiat des singes inoculés. Mettez les singes inoculés en observation pendant 17 à 21 jours pour déceler les symptômes de paralysie ou autres manifestations de troubles neurologiques ; mettez les témoins en observation pour la même période plus 10 jours. Les animaux qui meurent dans les 48 h suivant l'injection sont considérés comme morts de causes non spécifiques et peuvent être remplacés. L'essai n'est pas valable si : plus de 20 pour cent des singes inoculés meurent de causes non spécifiques ; des échantillons de sérum prélevés sur les témoins au moment de l'inoculation des animaux d'essai et 10 jours après que ces derniers sont euthanasiés indiquent qu'il y a eu infection par le virus sauvage du type à examiner ou par le virus de la rougeole.

A la fin de la période d'observation, procédez à l'examen nécropsique et à des examens histopathologiques sur des zones appropriées du cerveau pour déceler l'éventuelle atteinte du système nerveux central. Le produit à examiner satisfait à l'essai si aucun signe inattendu, clinique ou histopathologique, d'une quelconque atteinte du système nerveux central n'est attribuable au virus inoculé.

**01/2008:20619**

# 2.6.19. ESSAI DE NEUROVIRULENCE DU VACCIN POLIOMYÉLITIQUE ORAL

Les singes utilisés pour les épreuves de neurovirulence devront satisfaire aux exigences prescrites dans la monographie *Vaccin poliomyélitique oral (0215)* et peser au moins 1,5 kg. La pathogénicité est évaluée pour les singes *Macaca* ou *Cercopithecus*, en la comparant à celle d'une préparation virale de référence pour les épreuves de neurovirulence, par inoculation dans la région lombaire du système nerveux central ; les singes reçoivent auparavant un sédatif, par exemple du chlorhydrate de kétamine. Il est vérifié au préalable que des échantillons de sérum prélevés chez chaque singe avant l'injection ne contiennent pas d'anticorps neutralisants lorsqu'ils sont examinés à la dilution 1:4 en présence de 1000 $DICC_{50}$ au maximum de chacun des trois types de virus poliomyélitique.

**Nombre de singes**. Le vaccin et le virus de référence homotypique approprié sont examinés en même temps en utilisant le même groupe de singes. Ce groupe est divisé en 2 sous-groupes égaux, dont l'un reçoit la préparation de référence et l'autre le vaccin à examiner. Les singes sont répartis au hasard entre les 2 sous-groupes et dans les cages et leur identité est encryptée de façon que le traitement reçu par chaque animal ne soit pas connu aux observateurs et ceux qui évaluent les coupes. Le nombre de singes est tel que l'évaluation du vaccin et l'évaluation de la préparation de référence portent chacune sur au moins 11 singes positifs dans le cas des virus de types 1 et 2 (on entend par singe positif un singe présentant des lésions neuronales spécifiques du virus poliomyélitique dans le système nerveux central) et sur au moins 18 singes positifs dans le cas du virus de type 3. Plusieurs lots de vaccin peuvent être testés avec la même préparation de référence homotypique. Les singes doivent, dans la mesure du possible, provenir du même groupe quarantenaire ; s'il est impossible d'utiliser des singes du même groupe quarantenaire pour la préparation de référence homotypique et pour le vaccin à examiner, des singes provenant de 2 groupes sont utilisés et un nombre égal de chaque groupe reçoit la préparation de référence et le vaccin à examiner, respectivement. Si l'épreuve porte sur 2 jours de travail, un nombre égal de singes est inoculé chaque jour avec le vaccin et avec la préparation de référence homotypique.

**Teneur en virus des vaccins et préparations de référence inoculés**. Les teneurs en virus du vaccin et de la préparation de référence homotypique sont ajustées de façon à être aussi proches que possible l'une de l'autre et doivent se situer entre $10^{5,5}$ et $10^{6,5}$ $DICC_{50}$/0,1 mL.

**Observation des singes**. Tous les singes sont placés en observation pendant 17 à 22 jours à la recherche de symptômes de poliomyélite ou d'une autre infection virale. Les singes qui survivront au moins 24 h mais qui mourront avant le 11e jour suivant l'inoculation seront autopsiés afin de déterminer si leur mort est due à la poliomyélite. Ceux dont la mort est due à d'autres causes que la poliomyélite sont exclus de l'évaluation. Les animaux moribonds ou gravement paralysés sont euthanasiés et autopsiés. Tous les singes qui survivront à la période d'observation seront autopsiés. L'épreuve n'est valable que si la proportion d'animaux présentant des signes d'infection intercurrente pendant la période d'observation ne dépasse pas 20 pour cent.

**Nombre de coupes examinées**. L'examen histologique portera au moins sur les parties lombaire et cervicale de la moelle épinière, les parties inférieure et supérieure du bulbe rachidien, le mésencéphale, ainsi que sur le thalamus et les zones motrices du cortex cérébral de chaque singe. Les coupes ont une épaisseur de 15 µm et sont colorées à la gallocyanine. Le nombre minimal de coupes examinées est le suivant :

(a) 12 coupes représentant l'ensemble du renflement lombaire,

(b) 10 coupes représentant l'ensemble du renflement cervical,

(c) 2 coupes du bulbe rachidien,

(d) 1 coupe au niveau du pont de Varole et du cervelet,

(e) 1 coupe au niveau du mésencéphale,

(f) 1 coupe des parties gauche et droite du thalamus,

(g) 1 coupe des zones motrices gauche et droite du cortex cérébral.

**Evaluation de l'activité virale**. Pour évaluer l'activité virale dans les demi-coupes de la moelle épinière et du tronc cérébral, une échelle de gravité des lésions est établie, différenciant infiltration cellulaire et destruction des neurones, comme suit :

1. infiltration cellulaire seule (le singe n'est pas considéré comme positif),
2. infiltration cellulaire avec lésions neuronales minimales,
3. infiltration cellulaire avec lésions neuronales étendues,
4. lésions neuronales massives avec ou sans infiltration cellulaire.

Les résultats obtenus seront consignés sur un formulaire normalisé(3). Un singe présentant des lésions neuronales dans les coupes, mais sans trace de passage de l'aiguille, sera considéré comme positif. Un singe qui présente une trace de passage de l'aiguille dans les coupes, mais sans lésions neuronales, n'est pas considéré comme positif. Une coupe qui présente des lésions dues à un traumatisme, mais qui ne présente aucune lésion spécifique du virus, n'est pas notée.

Les notes de gravité se rapportent à l'examen des demi-coupes des coupes histologiques lombaire (L), cervicale (C) et du cerveau (B). La note de gravité (NG) pour chaque singe positif se calcule comme suit :

$$NG = \frac{\left[\dfrac{\text{Somme des notes de L}}{\text{Nombre de demi-coupes}}\right] + \left[\dfrac{\text{Somme des notes de C}}{\text{Nombre de demi-coupes}}\right] + \left[\dfrac{\text{Somme des notes de B}}{\text{Nombre de demi-coupes}}\right]}{3}$$

On calcule ensuite une note de gravité moyenne pour chaque groupe de singes positifs.

**Evaluation**. La comparaison de l'activité du vaccin et de la préparation de référence est basée sur l'activité virale qui se manifeste au niveau du renflement lombaire de la moelle épinière et son degré d'extension depuis cette région jusqu'au renflement cervical et au cerveau. La décision d'accepter ou de rejeter le vaccin sera fondée sur l'ensemble des résultats obtenus chez tous les animaux soumis à l'épreuve. Si une activité d'une ampleur inhabituelle se manifeste chez certains animaux, soit au niveau de la région lombaire, soit par extension, dans d'autres régions, on devra également en tenir compte pour l'évaluation définitive. La suspension monovalente en vrac satisfait à l'épreuve si on obtient le nombre requis d'animaux positifs et si aucune des observations cliniques et histopathologiques ne révèle de différence significative entre la pathogénicité du vaccin et celle de la préparation de référence. Les critères d'acceptation des vaccins après évaluation de la neurovirulence sont donnés ci-après.

**Critères**. Un nombre approprié (par exemple, 4) d'essais qualifiants est effectué sur chaque préparation de référence (types 1, 2 et 3), de façon à obtenir des données sur l'activité de ces préparations qui serviront comme base des critères pour

(3) Un formulaire approprié figure dans les Normes relatives au vaccin antipoliomyélitique buccal (Normes Nº 7 pour les substances biologiques, Organisation Mondiale de la Santé).

les vaccins à examiner. La note générale moyenne de gravité des lésions ($M$) pour les essais effectués sur chaque virus de référence est calculée en même temps que l'estimation groupée de la variance intra-essai ($s^2$) et que l'écart-type intra-essai ($s$).

Les critères de validité des résultats d'un essai réalisé sur une préparation de référence sont établis sur la base de l'ensemble des données obtenues dans les essais qualifiants. Il n'est donc pas possible de définir des critères d'applicabilité générale. Pour les laboratoires qui n'ont qu'une expérience limitée de l'essai de neurovirulence, la méthode empirique ci-après d'établissement des limites acceptables pour la note moyenne de gravité pour le vaccin de référence ($X_{réf}$) peut être utile :

Tableau 2.6.19.-1

| | Limite inférieure | Limite supérieure |
|---|---|---|
| Types 1 et 2 | $M - s$ | $M + s$ |
| Type 3 | $M - s/2$ | $M + s$ |

Si la note moyenne de gravité pour le vaccin à éprouver est $X_{test}$ et $C_1$, $C_2$ et $C_3$ des constantes :

Le vaccin n'est pas acceptable si :

$$X_{\text{test}} - X_{\text{réf}} > C_1$$

L'essai peut être répété une fois si :

$$C_1 < X_{\text{test}} - X_{\text{réf}} < C_2$$

Si l'essai est répété, la moyenne des notes de gravité pour le vaccin à examiner et le vaccin de référence est recalculée, et le vaccin est rejeté si :

$$\frac{X_{(\text{test 1+test 2})} - X_{(\text{réf 1+réf 2})}}{2} > C_3$$

Les constantes $C_1$, $C_2$ et $C_3$ se calculent comme suit :

$$C_1 = 2,3\sqrt{\frac{2s^2}{N_1}}$$

$$C_2 = 2,6\sqrt{\frac{2s^2}{N_1}}$$

$$C_3 = 1,6\sqrt{\frac{2s^2}{N_1}}$$

$N_1$ = nombre de singes positifs par vaccin à éprouver,

$N_2$ = nombre de singes positifs pour les 2 épreuves,

2,3 = écart normal au niveau 1 pour cent,

2,6 = écart normal au niveau 0,5 pour cent,

1,6 = écart normal au niveau 5 pour cent.

Un essai de neurovirulence dans lequel la note moyenne de gravité des lésions obtenue pour la préparation de référence ($X_{réf}$) n'est pas compatible avec les résultats préalablement obtenus n'est pas utilisé pour évaluer un vaccin.

Si l'essai est valable, la note moyenne de gravité des lésions pour le vaccin à examiner ($X_{test}$) est calculée et comparée à celle du vaccin de référence homotypique.

**01/2008:20620**

## 2.6.20. TITRE EN HÉMAGGLUTININES ANTI-A ET ANTI-B (MÉTHODE INDIRECTE)

Préparez 2 séries identiques de dilutions de la préparation à examiner dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L. A chaque dilution de la première série, ajoutez un volume égal d'une suspension à 5 pour cent *V/V* de cellules rouges $A_1$ lavées 3 fois au préalable avec la solution de chlorure de sodium. A chaque dilution de la deuxième série, ajoutez un volume égal d'une suspension à 5 pour cent *V/V* de cellules rouges B lavées 3 fois au préalable avec la solution de chlorure de sodium. Laissez incuber la suspension à 37 °C pendant 30 min, puis lavez les cellules avec la solution de chlorure de sodium. Mettez chaque suspension en contact avec un réactif antiglobuline humaine polyvalent pendant 30 min. Sans centrifuger les mélanges, recherchez par examen microscopique une éventuelle agglutination.

**07/2010:20621**

## 2.6.21. TECHNIQUES D'AMPLIFICATION DES ACIDES NUCLÉIQUES

1. INTRODUCTION

Les techniques d'amplification des acides nucléiques reposent sur 2 approches différentes :

1. amplification d'une séquence nucléotidique cible au moyen, par exemple, de la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ou par ligase (LCR), ou de l'amplification isotherme d'une séquence d'acide ribonucléique (ARN),
2. amplification d'un signal d'hybridation au moyen, par exemple, pour l'acide désoxyribonucléique (ADN), de la méthode dite de l'ADN branché (ADNb) ; dans ce cas, l'amplification du signal est réalisée sans application aux acides nucléiques de cycles d'amplification itératifs.

La méthode de référence décrite dans le présent chapitre est la PCR. D'autres méthodes peuvent être utilisées à condition de satisfaire aux exigences de qualité spécifiées ci-après.

2. CHAMP D'APPLICATION

Le présent chapitre définit les exigences applicables à la préparation des échantillons, à l'amplification *in vitro* d'une séquence d'ADN et à la détection du produit spécifique de la réaction PCR. La PCR permet la détection de séquences définies d'ADN ; elle permet également la détection d'ARN après transcription inverse en ADN complémentaire (ADNc) puis amplification.

3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La PCR est une méthode permettant l'amplification spécifique, *in vitro*, de segments d'ADN, ou de segments d'ARN après transcription inverse en ADNc.

Après dénaturation de l'ADN double-brin en ADN simple-brin, 2 amorces oligonucléotidiques synthétiques de polarité inverse s'hybrident avec leur séquence complémentaire respective sur l'ADN à amplifier. L'appariement des amorces avec la séquence nucléotidique complémentaire de l'ADN simple-brin donne naissance à de courtes séquences bicaténaires qui bornent le segment d'ADN à amplifier et servent de point de départ à la synthèse d'ADN, réalisée *in vitro* à l'aide d'une ADN polymérase thermostable.

L'amplification de l'ADN s'effectue en plusieurs cycles de :

- dénaturation par la chaleur de l'acide nucléique (séquence cible) en 2 chaînes monocaténaires,
- hybridation spécifique des amorces avec la séquence cible dans des conditions de réaction appropriées,
- extension, par l'ADN polymérase, des amorces liées à chacun des deux brins, à une température appropriée (synthèse d'ADN).

Les cycles itératifs de dénaturation par la chaleur, hybridation des amorces et synthèse d'ADN conduisent à une amplification exponentielle du segment d'ADN délimité par les amorces.

Le produit de réaction spécifique de cette amplification, appelé amplicon, peut être détecté par diverses méthodes de spécificité et de sensibilité appropriées.

Les essais par PCR multiplexe utilisent plusieurs paires d'amorces conçues pour une amplification simultanée de différentes cibles en une seule réaction.

4. MATÉRIEL À EXAMINER

En raison de la très grande sensibilité de la PCR, les échantillons doivent être protégés contre toute contamination externe par la séquence cible. L'échantillonnage, la conservation et le transport du matériel à examiner doivent se dérouler dans des conditions permettant de réduire au minimum les risques de dégradation de la séquence cible. Lorsque celle-ci est constituée d'ARN, des précautions spéciales sont nécessaires en raison de la grande sensibilité de l'ARN à la dégradation par les ribonucléases. Des précautions sont également à prendre par rapport à certains additifs (anticoagulants ou conservateurs par exemple) qui peuvent interférer dans l'essai.

5. MODE OPÉRATOIRE

**5.1. Prévention de la contamination**

Les risques de contamination rendent nécessaire une stricte ségrégation des zones selon la nature des matériels utilisés et les technologies mises en oeuvre. Les points clés à considérer sont notamment les déplacements des manipulateurs, les tenues de travail, les mouvements de matériel, les systèmes d'aération et les procédures de décontamination.

Il convient de procéder à une subdivision du système en compartiments, par exemple :

- zone « master-mix » (où sont exclusivement manipulés les matériels ne contenant pas la matrice, par exemple les amorces, les tampons, etc.),
- zone pré-PCR (où sont manipulés les réactifs, les échantillons et les témoins),
- amplification PCR (les produits d'amplification sont manipulés en système fermé),
- détection post-PCR (seule zone où les produits d'amplification sont manipulés en système ouvert).

**5.2. Préparation des échantillons**

La préparation des échantillons comprend une extraction ou une libération de la séquence cible à partir du matériel à examiner ; la méthode utilisée à cet effet doit être efficace, reproductible et compatible avec la réalisation de l'amplification dans les conditions de réaction choisies. Différentes méthodes d'extraction physicochimique et/ou d'enrichissement peuvent être utilisées.

Certains additifs présents dans le matériel à examiner peuvent interférer dans la PCR. Les procédures décrites au paragraphe 7.3.2. doivent être mises en oeuvre pour vérifier l'absence de facteurs d'inhibition liés au matériel à examiner.

Lorsque le brin matrice est de l'ARN, il est important de veiller à l'absence de toute activité de type ribonucléase.

**5.3. Amplification**

L'amplification par PCR de la séquence cible est effectuée dans des conditions opératoires définies (profil de température pour la dénaturation de l'ADN double-brin, l'hybridation et l'extension des amorces ; temps d'incubation aux températures choisies ; variations de température). Ces conditions dépendent de différents paramètres, dont :

- la longueur et la composition nucléotidique de l'amorce et de la séquence cible,
- le type d'ADN polymérase, la composition du tampon et le volume de réaction utilisés pour l'amplification,
- le type de thermocycleur utilisé et le coefficient de transmission thermique entre l'appareil, le tube à réaction et le milieu réactif.

**5.4. Détection**

L'amplicon généré par la réaction PCR peut être identifié par sa taille, par sa séquence, par modification chimique ou par une combinaison de ces paramètres. La détection et la caractérisation par la taille peuvent être effectuées par électrophorèse sur gel (plaques d'agarose ou de polyacrylamide, ou électrophorèse capillaire) ou par chromatographie sur colonne (chromatographie liquide par exemple). La détection et la caractérisation par la séquence peuvent être effectuées par hybridation spécifique avec des sondes complémentaires de la séquence cible ou par clivage au moyen d'une enzyme de restriction aux sites spécifiques de la séquence cible. La détection et la caractérisation par modification chimique peuvent être effectuées, par exemple, par incorporation d'un fluorophore puis détection de la fluorescence obtenue après excitation.

La détection des amplicons peut également être réalisée au moyen de sondes marquées, avec détection radioisotopique ou immuno-enzymatique.

6. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'essai n'est valable que si le(s) témoin(s) positif(s) donne(nt) un résultat clairement positif et le(s) témoin(s) négatif(s) un résultat clairement négatif. En raison de l'extrême sensibilité de la PCR et des risques inhérents de contamination, il est nécessaire de confirmer les résultats positifs en répétant 2 fois l'ensemble de la procédure, si possible sur une nouvelle prise d'essai. L'échantillon est déclaré positif si au moins l'une des répétitions donne un résultat positif. Un système d'essai quantitatif est requis dès lors qu'est définie une limite cible mesurable.

7. ASSURANCE QUALITÉ

**7.1. Validation du système de dosage PCR**

Le programme de validation doit comprendre une validation de l'instrumentation et de la méthode PCR utilisées. Il convient de se référer à cet égard au *Guideline ICH* (sujet Q2B) « Validation analytique : méthodologie ».

Il est indispensable d'effectuer cette validation au moyen d'étalons appropriés, qu'il s'agisse d'étalons de travail officiels ou d'étalons de travail «internes» établis par rapport aux étalons internationaux pour les séquences cibles auxquelles l'essai sera appliqué.

*7.1.1. Détermination du seuil de réponse positive*

La validation des essais qualitatifs doit inclure une détermination du seuil de réponse positive, c'est-à-dire le nombre minimum de séquences cibles par unité de volume qui peut être détecté dans 95 pour cent des essais. Sa valeur dépend de plusieurs facteurs interdépendants, par exemple le volume de l'échantillon soumis à l'extraction et l'efficacité de la méthode d'extraction, de la transcription de l'ARN cible en ADN complémentaire, du procédé d'amplification et de la détection.

Pour définir la limite de détection du système utilisé, il convient de considérer le seuil de réponse positive pour chaque séquence cible et les performances de l'essai au-dessus et au-dessous du seuil de réponse positive.

*7.1.2. Système de dosage quantitatif*

Pour les dosages quantitatifs, la validation inclut la détermination des paramètres suivants : exactitude, fidélité, spécificité, limite de quantification, linéarité, intervalle de mesure, robustesse.

**7.2. Contrôle de qualité des réactifs**

Tous les réactifs jouant un rôle important dans la méthodologie mise en oeuvre doivent faire l'objet d'un contrôle avant d'être utilisés en routine. Leur acceptation/rejet repose sur des critères de qualité prédéfinis.

Les amorces constituent l'une des composantes essentielles de la PCR et exigent à ce titre une attention particulière quant à leur conception, leur pureté et la validation de leur aptitude à l'emploi dans un essai PCR. Les amorces peuvent être modifiées (par exemple par conjugaison à un fluorophore ou un antigène) de façon à permettre l'emploi d'une méthode spécifique de détection de l'amplicon, à condition que les modifications apportées ne nuisent ni à la précision ni à l'efficacité de l'amplification de la séquence cible.

**7.3. Témoins**

*7.3.1. Témoins externes*

Pour détecter des contaminations éventuelles et contrôler la sensibilité, il convient d'inclure dans tout dosage PCR plusieurs types de témoins externes :

- un témoin positif contenant un nombre défini de copies de la séquence cible, ce nombre étant proche du seuil de réponse positive et déterminé spécifiquement pour chaque système de dosage et exprimé en multiple du seuil de réponse positive du système en question ;
- un témoin négatif constitué par un échantillon d'une matrice appropriée dont on a démontré qu'il ne contient pas les séquences cibles.

*7.3.2. Témoins internes*

Les témoins internes sont des séquences nucléotidiques définies contenant, sauf indication contraire, les sites de liaison de l'amorce. Ils doivent être amplifiés avec une efficacité définie et les amplicons respectifs doivent pouvoir être clairement différenciés. Ces témoins internes doivent appartenir au même type d'acide nucléique (ADN/ARN) que le matériel à examiner. Ils sont de préférence ajoutés à ce matériel avant isolement de l'acide nucléique et jouent par conséquent un rôle polyvalent dans le contrôle du processus (extraction, transcription inverse, amplification, détection).

*7.3.3. Témoin quantitatif*

Le témoin utilisé dans les essais quantitatifs est un échantillon contenant l'analyte à la concentration définie comme limite maximale. Sa teneur en analyte est convenablement étalonnée, en Unités Internationales, et il est analysé en parallèle dans chaque série de mesures quantitatives.

**7.4. Contrôles de qualité externes**

La participation à des programmes externes d'évaluation de la qualité constitue un aspect important de l'assurance qualité en matière de PCR, pour chaque laboratoire et chaque opérateur.

*Les sections suivantes sont publiées à titre d'information.*

# Recommandations pour la validation des techniques d'amplification des acides nucléiques pour la détection de l'ARN du virus de l'hépatite C (VHC) dans les mélanges de plasma

1. OBJET

Les procédures analytiques d'amplification des acides nucléiques sont, pour la plupart, des essais qualitatifs visant à détecter la présence d'acides nucléiques, même s'il existe quelques essais quantitatifs développés en interne ou disponibles dans le commerce. Les essais qualitatifs conviennent pour la détection de contaminations par l'ARN du VHC dans les mélanges de plasma et peuvent être considérés comme des essais limites de contrôle des impuretés, au sens défini dans le Guide Technique pour l'élaboration des monographies, *Pharmeuropa*, décembre 1999, Chapitre III « Validation analytique ». Ces recommandations décrivent des méthodes de validation des procédures d'amplification des acides nucléiques uniquement applicables aux procédures qualitatives destinées à la détection de l'ARN du VHC dans les mélanges de plasma. A ce titre, les 2 paramètres de validation considérés comme les plus importants sont la spécificité et la limite de détection et il convient également d'évaluer la robustesse.

Néanmoins, elles peuvent également servir de base pour la validation des techniques d'amplification en général.

Aux fins du présent document, une procédure analytique est définie comme l'ensemble des opérations effectuées depuis l'extraction de l'acide nucléique jusqu'à la détection des produits d'amplification.

Lorsque la procédure analytique est, en totalité ou partie, mise en oeuvre à l'aide de trousses du commerce, les aspects de la validation déjà pris en charge par le fabricant, documentation à l'appui, peuvent être omis par l'utilisateur. Néanmoins, celui-ci doit démontrer les performances de la trousse par rapport à l'usage qui en est prévu (limite de détection, robustesse, contamination croisée par exemple).

2. SPÉCIFICITÉ

La spécificité de la procédure est sa capacité à permettre l'évaluation univoque de l'acide nucléique recherché, en présence des composés susceptibles de l'accompagner.

La spécificité des procédures d'amplification des acides nucléiques est fonction du choix des amorces, de celui des sondes utilisées pour l'analyse du produit final et de la rigueur des conditions opératoires (à la fois pour les étapes d'amplification et de détection).

Lors de la conception des amorces et des sondes, l'un des aspects à considérer est leur spécificité à détecter uniquement l'ARN du VHC. Il convient à cet effet de comparer les séquences choisies avec celles publiées dans les banques de données. Pour le VHC, les amorces (et les sondes) seront normalement choisies à partir de domaines de la région 5' non codante du génome du VHC, qui présentent une grande constance dans l'ensemble des génotypes.

Le produit d'amplification doit être identifié de façon univoque par une méthode telle que l'amplification avec amorces imbriquées, l'analyse par enzyme de restriction, le séquençage ou l'hybridation à une sonde spécifique.

Pour valider la spécificité de la procédure analytique, il convient d'examiner au minimum 100 mélanges de plasma négatifs pour l'ARN du VHC, qui doivent tous donner un résultat négatif. Des échantillons appropriés de mélanges non réactifs sont disponibles auprès de la Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé (DEQM).

L'aptitude de la procédure analytique à détecter tous les génotypes du VHC dépend elle aussi du choix des amorces, des sondes et des paramètres opératoires. Il convient de démontrer cette aptitude au moyen de collections de référence caractérisées. Néanmoins, comme il est difficile de se procurer des échantillons de certains génotypes (par exemple le génotype 6), les génotypes dominants (par exemple les génotypes 1 et 3 en Europe) doivent être détectés à un niveau approprié.

3. LIMITE DE DÉTECTION

La limite de détection de la procédure est la plus petite quantité d'acide nucléique qui peut être détectée dans un échantillon, sans forcément pouvoir être quantifiée de façon exacte.

La procédure d'amplification utilisée pour la détection de l'ARN du VHC dans les mélanges de plasma donne généralement des résultats qualitatifs. Le nombre de résultats possibles se limite à 2 : réponse positive ou négative. Bien qu'il soit généralement recommandé de déterminer la limite de détection, il convient plutôt ici, pour des raisons pratiques, de déterminer un seuil de réponse positive. Le seuil de réponse positive, comme défini dans la méthode *2.6.21*, est le nombre minimum de séquences cibles par unité de volume qui peut être détecté dans 95 pour cent des analyses. Sa valeur dépend de la distribution du génome viral dans les différents échantillons examinés, ainsi que de facteurs tels que l'efficacité de l'enzyme, qui peuvent entraîner des différences dans les seuils de réponse positive à 95 pour cent obtenus lors des analyses individuelles.

Pour déterminer le seuil de réponse positive, il convient de procéder à l'examen, à des jours différents, d'une série de dilutions d'un réactif de travail ou du *virus de l'hépatite C PBR*, étalonnés par rapport à l'Etalon International du VHC 96/790 de l'OMS, afin d'étudier les variations inter-analyses. L'examen doit porter sur au moins 3 séries de dilutions indépendantes, avec un nombre d'exemplaires de chaque dilution suffisant pour atteindre un total de 24 résultats par dilution et permettre l'analyse statistique des résultats.

A titre d'exemple, un laboratoire peut examiner 3 séries de dilutions à des jours différents avec 8 exemplaires par dilution, ou 4 séries de dilutions à des jours différents avec 6 exemplaires par dilution, ou 6 séries de dilutions à des jours différents avec 4 exemplaires par dilution. Pour que le nombre de dilutions utilisées reste gérable, il convient d'effectuer un essai préliminaire (avec, par exemple, des dilutions logarithmiques de l'échantillon de mélange de plasma) pour avoir une première

estimation du seuil de réponse positive (c'est-à-dire la plus haute dilution donnant un signal positif). On peut alors procéder aux dilutions de façon à encadrer cette valeur préestimée (en utilisant, par exemple, un facteur de dilution de 0,5 log, ou moins, et un mélange de plasma négatif comme matrice de dilution). La teneur en ARN du VHC qui peut être détectée lors de 95 pour cent des analyses peut alors être calculée par une méthode statistique appropriée.

Ces résultats peuvent également servir à établir la variabilité intra-dosage et la variabilité inter-jours de la procédure analytique.

4. ROBUSTESSE

La robustesse de la procédure mesure sa capacité à ne pas être affectée par des modifications faibles, mais délibérées, de paramètres opératoires. Elle donne une indication de la fiabilité de la procédure dans les conditions normales d'application.

L'évaluation de la robustesse est un aspect à considérer lors de la phase de développement. Elle permet d'établir la fiabilité de la procédure analytique face à des variations délibérées de paramètres opératoires. Dans les techniques d'amplification des acides nucléiques, de légères variations de certains paramètres peuvent avoir une importance cruciale. Néanmoins, il est possible de démontrer la robustesse de la méthode lors de son développement, lorsque l'on étudie l'influence de petites variations de concentration de certains réactifs ($MgCl_2$, amorces, dNTP par exemple). Pour démontrer la robustesse lors de la validation, il convient d'examiner au minimum 20 mélanges de plasma (choisis au hasard) négatifs pour l'ARN du VHC, auxquels est ajouté de l'ARN du VHC à concentration triple de celle qui correspond au seuil de réponse positive à 95 pour cent préalablement déterminé. Tous les résultats obtenus doivent être positifs.

La robustesse peut notamment poser problème dans le cas de méthodes comprenant une étape initiale d'ultracentrifugation, préalablement à l'extraction de l'ARN viral. Il convient dans ce cas, pour étudier la robustesse de la méthode, d'examiner au minimum 20 mélanges de plasma contenant l'ARN du VHC à des teneurs variables, mais exempts d'anticorps spécifiques du VHC. Tous les résultats obtenus doivent être positifs.

Il convient également de démontrer l'absence de contamination croisée en procédant à une détection exacte sur un ensemble d'au moins 20 échantillons composés, en alternance, de mélanges de plasma négatifs et de mélanges de plasma négatifs auxquels a été ajouté du VHC à haute concentration (au minimum $10^2$ fois le seuil de réponse positive à 95 pour cent ou au minimum $10^4$ UI/mL).

5. ASSURANCE QUALITÉ

Les méthodes d'essai biologiques telles que l'amplification des acides nucléiques peuvent poser des problèmes spécifiques ayant des répercussions à la fois sur la validation et l'interprétation des résultats. Il est indispensable de décrire avec précision les procédures d'essai, sous la forme de procédures opératoires standardisées (POS) couvrant les aspects suivants :

– mode d'échantillonnage (type de récipient, etc.),
– préparation des mini-mélanges (le cas échéant),
– conditions de conservation avant analyse,
– description précise des conditions opératoires, notamment des précautions à prendre pour éviter les problèmes de contamination croisée ou de destruction de l'ARN viral ainsi que des réactifs et préparations de référence utilisés,
– description précise de l'appareillage utilisé,
– formules détaillées de calcul des résultats, y compris pour l'évaluation statistique.

L'emploi d'un témoin de conformité approprié (constitué par exemple d'une dilution appropriée du *virus de l'hépatite C PBR* ou de plasma additionné d'un échantillon de VHC étalonné par rapport à l'Etalon International du VHC 96/790 de l'OMS) peut être considéré comme un moyen satisfaisant de contrôler la conformité du système et d'assurer le maintien de la fiabilité de la procédure analytique lors de chaque utilisation.

*Qualification technique*. Un programme approprié de qualification de l'installation et de l'utilisation de l'équipement doit être mis en oeuvre pour tous les éléments critiques de cet équipement. Après toute modification d'un élément critique (par exemple le thermocycleur), il convient de reconfirmer l'acceptabilité de la procédure en procédant à l'examen en parallèle de 8 échantillons d'un mélange de plasma auquel est ajouté de l'ARN du VHC à concentration triple de celle qui correspond au seuil de réponse positive à 95 pour cent préalablement déterminé. Tous les résultats obtenus doivent être positifs.

*Qualification des opérateurs*. Un programme approprié de qualification doit être mis en oeuvre pour l'ensemble des opérateurs impliqués dans l'essai. A cet effet, il convient de faire examiner à chaque opérateur au moins 8 échantillons d'un mélange de plasma auquel est ajouté de l'ARN du VHC à concentration triple de celle qui correspond au seuil de réponse positive à 95 pour cent préalablement déterminé. Cet essai (8 échantillons) est à répéter 2 fois à des jours différents, soit un total de 24 analyses effectuées à 3 jours différents. Tous les résultats obtenus doivent être positifs.

## Recommandations pour la validation des techniques d'amplification des acides nucléiques destinées à la quantification de l'ADN du virus B19 (VB19) dans les mélanges de plasma

1. OBJET

La Pharmacopée Européenne exige que les mélanges de plasma utilisé pour la fabrication de certains produits soient soumis à un essai détectant la présence de l'ADN du virus B19 (VB19) et définit une concentration maximale. Pour satisfaire à ces exigences, il est préférable de recourir à des essais quantitatifs. Les paramètres considérés comme les plus importants pour la validation de ces procédures sont l'exactitude, la fidélité, la spécificité, la limite de quantification, la linéarité et l'intervalle de mesure. Il convient d'évaluer également la robustesse.

Le présent document décrit des méthodes de validation, basées sur les *Guidelines ICH*, des procédures d'amplification des acides nucléiques destinées à évaluer la contamination des mélanges de plasma par l'ADN du VB19. Néanmoins, il peut également servir de base pour la validation des techniques quantitatives d'amplification des acides nucléiques en général.

Aux fins du présent document, une procédure analytique est définie comme l'ensemble des opérations effectuées depuis l'extraction de l'acide nucléique jusqu'à la détection des produits d'amplification.

Lorsque la procédure analytique est, en totalité ou partie, mise en oeuvre à l'aide de trousses du commerce, les aspects de la validation déjà pris en charge par le fabricant, documentation à l'appui, peuvent être omis par l'utilisateur. Néanmoins, celui-ci doit démontrer les performances de la trousse par rapport à l'usage qui en est prévu (fidélité, exactitude, intervalle de mesure, robustesse, par exemple).

2. EXACTITUDE

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur acceptée comme conventionnellement vraie, ou comme valeur de référence, et la valeur trouvée. L'exactitude d'un essai dépend de l'étalonnage de la méthode et de la variance associée à ses différentes étapes. Bien qu'il soit recommandé d'établir l'exactitude sur tout l'intervalle de mesure spécifié, c'est sur l'intervalle encadrant la concentration limite qu'il est le plus important d'effectuer cette évaluation. Dans le cas du dosage de l'ADN du VB19 dans les mélanges de plasma, il est recommandé d'évaluer l'exactitude de la procédure étalonnée

en effectuant l'essai sur au moins 5 dilutions (de facteur 0,5 log) de l'*ADN du virus B19 pour essai d'amplification des acides nucléiques PBR*, ou d'un autre matériel de référence convenablement étalonné en Unités Internationales contre l'étalon international de l'ADN B19 de l'OMS encadrant la valeur de 10,0 UI/µL actuellement recommandée pour la teneur limite en ADN du VB19 (par exemple $10^5$ UI/mL, $10^{4,5}$ UI/mL, $10^4$ UI/mL, $10^{3,5}$ UI/mL et $10^3$ UI/mL), avec au moins 3 répétitions pour chaque dilution. L'exactitude est notée, pour les différentes concentrations, en termes de pourcentage obtenu par rapport à la quantité connue d'ADN du VB19. Elle doit refléter l'état des techniques pour la méthode d'essai considérée, qu'il convient de définir également par le biais, par exemple, d'études collaboratives.

3. FIDÉLITÉ

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures obtenues à partir de plusieurs prises d'essai provenant d'un même échantillon homogène. Elle peut être considérée à 3 niveaux :

– la répétabilité est la fidélité obtenue dans des conditions opératoires identiques et sur un court intervalle de temps (fidélité intra-essai) ; pour évaluer la répétabilité, on effectue le même essai, avec 3 répétitions, sur des dilutions appropriées d'un échantillon positif pour l'ADN du VB19, convenablement étalonné en Unités Internationales, qui couvrent l'ensemble de l'intervalle de mesure de la méthode ; le coefficient de variation est calculé pour chaque échantillon (variabilité intra-essai) ;
– la fidélité intermédiaire est l'expression de la variabilité intra-laboratoire (fidélité inter-essais) ; pour établir la fidélité intermédiaire, on effectue l'essai, avec plusieurs réplicats (comme utilisé en routine), sur des dilutions appropriées d'un échantillon positif pour l'ADN du VB19, convenablement étalonné en Unités Internationales, qui couvrent l'ensemble de l'intervalle de mesure de la méthode, en faisant varier différents facteurs (jour, analyste, équipement, réactifs) ; le coefficient de variation est calculé pour chaque échantillon ;
– la reproductibilité est l'expression de la fidélité entre différents laboratoires (fidélité inter-laboratoires) ; la reproductibilité est évaluée par le biais d'études collaboratives portant sur les méthodes de quantification de l'ADN du VB19 par amplification des acides nucléiques, par exemple dans le cadre du programme d'études de performance (PTS), avec, dans les cas appropriés, analyse comparative des résultats quantitatifs obtenus.

4. SPÉCIFICITÉ

La spécificité est la capacité de la procédure à permettre l'évaluation univoque de l'analyte en présence des composés susceptibles de l'accompagner. La spécificité des procédures d'amplification des acides nucléiques est fonction du choix des amorces, de celui des sondes utilisées pour l'analyse du produit final, et de la rigueur des conditions opératoires (tant pour les étapes d'amplification que de détection).

Lors de la conception des amorces et des sondes, l'un des aspects à considérer est leur spécificité à détecter exclusivement l'ADN du VB19 humain ; il convient, à cet effet, de comparer les séquences choisies avec celles publiées dans les banques de données. Il ne doit pas être observé d'homologie majeure avec des séquences non apparentées au VB19.

Le produit d'amplification doit être identifié de façon univoque par une méthode telle que l'amplification avec amorces imbriquées, l'analyse par enzyme de restriction, le séquençage ou l'hybridation à une sonde spécifique.

Pour examiner la spécificité de la procédure analytique, il convient d'utiliser au minimum 20 mélanges de plasma négatifs pour l'ADN du VB19 ; tous les résultats obtenus doivent être négatifs.

*Génotypes des parvovirus B19.* Le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) a classé les représentants des 3 génotypes en tant que souches de parvovirus B19 humain. Le génotype 1 représente le prototype VB19, le génotype 2 les séquences proches du variant A6 et le génotype 3 des séquences proches du variant V9. Des amorces et sondes permettant de détecter et quantifier de manière uniforme les différents génotypes du parvovirus B19 humain doivent être mises au point en réalisant des alignements de séquences avec les génotypes respectifs du virus B19, disponibles dans les bases de données génomiques. Il convient d'utiliser du matériel de référence pour vérifier l'approche choisie. Comme des préparations biologiques de référence pour certains génotypes peuvent être difficile à obtenir, des préparations respectives de plasmides et d'acides nucléiques synthétiques peuvent servir de source de séquence cible caractérisée. Cependant, ceux-ci ne peuvent être utilisés pour valider la procédure d'extraction.

5. LIMITE DE QUANTIFICATION

La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte qui peut être quantifiée, dans un échantillon, avec une exactitude et une fidélité appropriées. La limite de quantification du dosage du VB19 est évaluée lors des études de répétabilité/fidélité intermédiaire en ciblant l'analyse des dilutions. On définit ainsi la plus faible concentration en acides nucléiques cibles qui peut être quantifiée avec une fidélité et une exactitude appropriées.

6. LINÉARITÉ

La linéarité est la capacité de la procédure à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte. La linéarité du dosage du VB19 est évaluée lors des études de répétabilité/fidélité intermédiaire en répétant plusieurs fois l'essai sur des échantillons dilués, à des concentrations couvrant l'ensemble de l'intervalle de mesure. On définit ainsi l'intervalle compris entre la plus élevée et la plus faible des concentrations en acide nucléique cible pour lesquelles les résultats d'essai sont directement proportionnels aux concentrations.

7. INTERVALLE DE MESURE

L'intervalle (de mesure) d'une procédure est l'intervalle (limites inférieure et supérieure comprises) de concentration de l'analyte (dans l'échantillon) sur lequel il a été démontré que la procédure possède une fidélité, une exactitude et une linéarité appropriées. L'intervalle de mesure du dosage du VB19 est évalué lors des études de répétabilité/fidélité intermédiaire en effectuant l'essai avec plusieurs répétitions sur des échantillons dilués. On définit ainsi l'intervalle compris entre la plus faible et la plus élevée des concentrations qui peuvent être exprimées avec un degré acceptable d'exactitude et de fidélité.

8. ROBUSTESSE

La robustesse d'une procédure analytique mesure sa capacité à ne pas être affectée par des modifications faibles, mais délibérées, de paramètres opératoires ; elle donne une indication de la fiabilité de la procédure dans les conditions normales d'application. L'évaluation de la robustesse est un aspect à considérer lors de la phase de développement. Elle permet d'établir la fiabilité de la procédure analytique face à des variations délibérées de paramètres opératoires. Dans les techniques d'amplification des acides nucléiques, de légères variations de ces paramètres peuvent avoir une importance cruciale. Néanmoins, il est possible de démontrer la robustesse de ces techniques lors du développement de la méthode lorsque l'on étudie l'influence de petites variations de concentration de certains réactifs ($MgCl_2$, amorces, dNTP par exemple). Pour démontrer la robustesse, il convient d'examiner au minimum 20 échantillons de mélanges de plasma négatifs pour l'ADN du VB19, auxquels est ajouté de l'ADN du VB19 à la concentration limite ; tous les échantillons doivent donner des valeurs quantitatives acceptables.

Il convient également de démontrer l'absence de contamination croisée en procédant à une détection exacte sur un ensemble d'au moins 20 échantillons constitué, en alternance, d'échantillons de mélanges de plasma à concentration en ADN du VB19 nulle ou inférieure à la concentration limite (10 échantillons) et de mélanges de plasma auxquels a été ajouté de l'ADN du VB19 à haute concentration (au minimum $10^2$ fois la concentration limite, 10 échantillons).

9. ASSURANCE QUALITÉ

Les méthodes d'essai biologiques telles que l'amplification des acides nucléiques peuvent poser des problèmes spécifiques ayant des répercussions à la fois sur la validation et l'interprétation des résultats. Il est indispensable de décrire avec précision les procédures d'essai, sous la forme de procédures opératoires standardisées (POS) couvrant les aspects suivants :

– mode d'échantillonnage (type de récipient, etc.),
– préparation des mini-mélanges par les fabricants (dans les cas appropriés),
– conditions de conservation avant analyse,
– description précise des conditions opératoires, notamment des précautions à prendre pour éviter les problèmes de contamination croisée ou de destruction des acides nucléiques viraux ainsi que des réactifs et préparations de référence utilisés,
– description précise de l'appareillage utilisé,
– formules détaillées de calcul des résultats, y compris pour l'évaluation statistique.

L'analyse d'un témoin quantitatif approprié (constitué par exemple de plasma additionné d'un échantillon d'ADN du VB19 convenablement étalonné en Unités Internationales tel que l'*ADN du virus B19 pour essai d'amplification des acides nucléiques PBR*) est considéré comme un moyen satisfaisant de contrôler la conformité du système et d'assurer le maintien de la fiabilité de la procédure analytique lors de chaque utilisation.

*Qualification technique*. Un programme approprié de qualification de l'installation et de l'utilisation de l'équipement doit être mis en oeuvre pour tous les éléments critiques de cet équipement. Pour reconfirmer l'acceptabilité de la procédure après toute modification d'un élément critique (par exemple le thermocycleur), il convient de procéder à l'examen en parallèle de 8 échantillons d'un mélange de plasma auquel est ajouté de l'ADN du VB19 à concentration voisine de la concentration limite. Tous les résultats obtenus doivent être acceptables et conformes aux caractéristiques de l'essai déterminées lors de la phase de validation.

*Qualification de l'opérateur*. Un programme approprié de qualification doit être mis en oeuvre pour l'ensemble des opérateurs impliqués dans l'essai. A titre de test, il convient de faire examiner à chaque opérateur, 3 fois à des jours différents, au moins 8 échantillons d'un mélange de plasma auquel a été ajouté de l'ADN du VB19 à concentration voisine de la concentration limite (soit un total de 24 échantillons). Tous les résultats obtenus doivent être acceptables et conformes aux caractéristiques de l'essai déterminées lors de la phase de validation.

**01/2008:20622**

## 2.6.22. FACTEURS DE COAGULATION ACTIVÉS

Si la préparation à examiner contient de l'héparine, déterminez la quantité présente (*2.7.12*) et neutralisez-la par exemple par addition de *sulfate de protamine R* (10 µg de sulfate de protamine neutralisent 1 UI d'héparine). A l'aide de *solution tampon au tris(hydroxyméthyl)aminométhane pH 7,5 R*, préparez des dilutions au 1/10 et au 1/100 de la préparation à examiner. Placez une série de tubes de polystyrène dans un bain-marie à 37 °C. Introduisez dans chaque tube 0,1 mL de *plasma pauvre en plaquettes R* et 0,1 mL d'une dilution appropriée d'une préparation de phospholipides destinée à jouer le rôle d'un substitut de plaquettes. Laissez reposer pendant 60 s et ajoutez à chacun des tubes 0,1 mL d'une des dilutions, et pour le tube à blanc 0,1 mL de la solution tampon. A chacun des tubes, ajoutez immédiatement 0,1 mL d'une solution de *chlorure de calcium R* à 3,7 g/L chauffée au préalable à 37 °C et mesurez l'intervalle de temps entre l'addition de la solution de chlorure de calcium et la formation d'un caillot ; cette mesure doit être effectuée dans les 30 min qui suivent la préparation de la première dilution. L'essai n'est valable que si le temps de coagulation du tube à blanc est de 200 s à 350 s.

**07/2009:20624**

## 2.6.24. VACCINS VIRAUX AVIAIRES : RECHERCHE DES AGENTS ÉTRANGERS DANS LES LOTS DE SEMENCE

DISPOSITIONS GÉNÉRALES

a) Dans les essais suivants, les poulets et/ou du matériel provenant de poulets tels que des oeufs et des cultures cellulaires doivent être issus d'élevages de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*).

b) Les cultures cellulaires destinées aux essais des agents étrangers satisfont aux exigences relatives aux cultures de cellules primaires spécifiées dans le chapitre *5.2.4. Cultures cellulaires utilisées pour la préparation de vaccins pour usage vétérinaire*, à l'exception des essais du caryotype et du pouvoir tumorigène, qu'il n'est pas nécessaire d'effectuer.

c) Dans le cas d'essais utilisant des cultures cellulaires, des spécifications précises sont données en ce qui concerne le nombre de cultures, la surface des tapis cellulaires et le taux de survie minimal. Il est également possible de choisir un nombre différent de cultures ou une autre surface cellulaire, sous réserve qu'au minimum un nombre de 2 cultures soit employé, que la surface totale et le volume total de substance à examiner appliqués soient maintenus à des niveaux au moins égaux à ceux prescrits ici et que les exigences de taux de survie soient adaptées en conséquence.

d) Si la préparation à examiner est cryodesséchée, reconstituez-la à l'aide d'un liquide approprié. Sauf indication contraire ou justifiée, l'échantillon soumis à l'essai doit contenir une quantité de virus équivalente à 10 doses de vaccin pour 0,1 mL d'inoculum.

e) Si le virus du lot de semence est susceptible de gêner la conduite de l'essai ou d'en diminuer la sensibilité, neutralisez-le au moyen d'un immunosérum monospécifique.

f) Les immunosérums monospécifiques et les sérums d'origine aviaire utilisés en culture cellulaire, ou à d'autres fins, doivent être exempts d'anticorps dirigés contre les microorganismes dont la liste figure ci-après sous 7. Spécifications relatives à la présence d'anticorps dans les sérums utilisés pour la recherche d'agents étrangers, et ne doivent pas exercer d'effet inhibiteur sur ces microorganismes.

g) Lorsqu'il est indiqué dans une monographie, ou s'il est autrement justifié, que la neutralisation du virus du lot de semence est nécessaire mais difficile à effectuer, les essais *in vitro* décrits ci-après sont adaptés, selon les besoins, pour avoir les garanties nécessaires de l'absence de contamination par un agent étranger.

h) D'autres types d'essais que ceux qui sont décrits dans le présent texte peuvent être utilisés, à condition qu'ils soient de sensibilité au moins équivalente et de spécificité appropriée. Les techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) sont adaptées à une détection spécifique de nombreux agents étrangers et peuvent être utilisées après validation de leur sensibilité et spécificité.

1. RECHERCHE DES AGENTS ÉTRANGERS SUR OEUFS DE POULES EMBRYONNÉS

Utilisez un échantillon de la préparation à examiner, si nécessaire diluée, contenant une quantité de virus neutralisé équivalant à au moins 10 doses de vaccin pour 0,2 mL d'inoculum. Des antibiotiques appropriés peuvent être ajoutés. Inoculez la préparation à examiner à 3 groupes de 10 oeufs de poule embryonnés selon les modes d'administration suivants :

– groupe 1 : 0,2 mL d'inoculum dans la cavité allantoïdienne de chaque oeuf embryonné âgé de 9-11 jours,
– groupe 2 : 0,2 mL d'inoculum sur la membrane chorio-allantoïdienne de chaque oeuf embryonné âgé de 9-11 jours,
– groupe 3 : 0,2 mL d'inoculum dans le sac vitellin de chaque oeuf embryonné âgé de 5-6 jours.

Mirez quotidiennement les oeufs pendant 7 jours pour les groupes 1 et 2, et pendant 12 jours pour le groupe 3. Eliminez, en les considérant comme non spécifiques, les embryons morts dans les premières 24 h ; l'essai n'est valable que si au moins 6 des embryons de chaque groupe survivent au-delà des premières 24 h suivant l'inoculation. Procédez à un examen macroscopique de tous les embryons morts après les premières 24 h ou ayant survécu à la période d'incubation, pour détecter d'éventuelles anomalies. Examinez également la membrane chorio-allantoïdienne de ces oeufs pour détecter d'éventuelles anomalies et effectuez sur le liquide allantoïdien une recherche d'agents hémagglutinants.

Procédez à un second passage sur embryons. Réunissez séparément les produits obtenus à partir des embryons morts et anormaux, et à partir des embryons vivants. Inoculez chaque mélange à 10 oeufs embryonnés selon chacun des modes d'administration décrits plus haut, en utilisant le matériel provenant respectivement des membranes chorio-allantoïdiennes pour l'inoculation sur les membranes chorio-allantoïdiennes, des liquides allantoïdiens pour l'inoculation dans la cavité allantoïdienne et de l'embryon pour l'inoculation dans le sac vitellin. Dans le cas des oeufs inoculés par les voies allantoïque et chorio-allantoïque, mirez quotidiennement les oeufs pendant 7 jours, en procédant aux examens décrits plus haut. Dans le cas des oeufs inoculés dans le sac vitellin, mirez quotidiennement les oeufs pendant 12 jours, en procédant aux examens décrits plus haut.

Le lot de semence satisfait à l'essai si aucun embryon ne présente d'anomalie macroscopique, ni ne meurt de causes attribuables à la préparation examinée et si l'examen des membranes chorio-allantoïdiennes et les essais effectués sur les liquides allantoïdiens ne présentent aucune indication de la présence d'agents étrangers.

2. RECHERCHE DES AGENTS ÉTRANGERS SUR CULTURES DE CELLULES RÉNALES DE POULET

Préparez 7 cultures de cellules rénales de poulet sous forme de tapis cellulaires d'une surface d'environ 25 $cm^2$. Conservez 2 cultures de cellules comme témoin négatif et traitez-les de la même manière que les 5 cultures de cellules ayant été inoculées avec la préparation à examiner comme décrit ci-après. Eliminez le milieu de culture à confluence. Inoculez 0,1 mL de préparation à examiner à chacun des 5 tapis cellulaires. Laissez adsorber pendant 1 h, ajoutez le milieu de culture et incubez les cultures pendant un total d'au moins 21 jours, en effectuant des passages tous les 4-7 jours. Chaque passage est réalisé par mélange des cellules et du milieu de culture des 5 tapis cellulaires après un cycle de congélation-décongélation, puis inoculation de 0,1 mL de ce mélange à 5 autres tapis cellulaires d'environ 25 $cm^2$ récemment préparés. Pour le dernier passage, effectuez également une subculture sur un substrat approprié de façon à obtenir, à partir de chacun des tapis cellulaires originels, un tapis cellulaire d'environ 10 $cm^2$, pour effectuer l'essai A. L'essai n'est pas valable si moins de 80 pour cent des tapis cellulaires survivent à l'un des passages.

Pendant toute la période d'incubation, procédez fréquemment à des examens microscopiques de toutes les cultures cellulaires pour détecter d'éventuels signes d'effet cytopathogène ou autre preuve de la présence d'agents contaminants dans la préparation à examiner. A la fin de la période totale d'incubation, effectuez les essais suivants.

A. Fixez et colorez (par coloration de Giemsa ou à l'hématoxyline/éosine) chacun des 5 tapis cellulaires confluants d'environ 10 $cm^2$ obtenus à partir des tapis cellulaires originels. Examinez les cellules au microscope pour détecter tout effet cytopathogène, tout corps d'inclusion, toute formation syncytiale ou toute autre preuve de la présence d'agents contaminants dans la préparation à examiner.

B. Eliminez le milieu de culture et lavez chacun des 5 tapis cellulaires d'environ 25 $cm^2$ obtenus à partir des tapis cellulaires originels. Recouvrez ces cellules avec une suspension à 0,5 pour cent d'érythrocytes de poulet lavés (en utilisant au moins 1 mL de suspension pour 5 $cm^2$ de cellules). Incubez les cellules à 4 °C pendant 20 min, puis lavez-les avec précaution avec de la solution saline tamponnée phosphate pH 7,4. Examinez les cellules au microscope pour détecter une éventuelle hémadsorption attribuable à la présence d'agents hémadsorbants dans la préparation à examiner.

C. Effectuez un contrôle sur chaque échantillon de chaque milieu de culture, au moyen d'érythrocytes de poulet, pour détecter une éventuelle hémagglutination attribuable à la présence d'agents hémagglutinants dans la préparation à examiner.

L'essai n'est pas valable si la présence d'agents étrangers dans les cultures servant de témoin négatif est constatée. Le lot de semence satisfait à l'essai s'il n'est observé aucun signe de présence d'agents étrangers.

3. RECHERCHE DES VIRUS DE LA LEUCOSE AVIAIRE

Préparez au moins 13 cultures cellulaires soit avec des cellules DF-1 soit avec des cultures cellulaires primaires ou secondaires de fibroblastes provenant de tissus d'embryons âgés de 9-11 jours réputés génétiquement sensibles aux sous-groupes A, B et J des virus de la leucose aviaire et qui permettent la croissance des virus de la leucose aviaire exogènes mais non endogènes (la souche C/E convient). Chaque tapis cellulaire doit avoir une surface d'environ 50 $cm^2$.

Eliminez le milieu de culture à confluence. Inoculez 0,1 mL de préparation à examiner à 5 de ces cultures. Laissez adsorber pendant 1 h, puis ajoutez le milieu de culture. Inoculez à 2 des cultures cellulaires des virus de la leucose aviaire du sous-groupe A (au maximum 10 $DICC_{50}$ pour 0,1 mL), à 2 autres cultures des virus de la leucose aviaire du sous-groupe B (au maximum 10 $DICC_{50}$ pour 0,1 mL) et à 2 autres cultures des virus de la leucose aviaire du sous-groupe J (au maximum 10 $DICC_{50}$ pour 0,1 mL) ; ces cultures serviront de témoins positifs. Conservez au moins 2 cultures non infectées comme témoins négatifs.

Incubez les cellules pendant un total d'au moins 9 jours, en effectuant des passages tous les 3-4 jours. Conservez des cellules de chaque niveau de passage et récoltez les cellules à la fin de la durée d'incubation totale. Lavez des cellules de chaque niveau de passage provenant de chaque culture initiale et remettez-les en suspension soit dans une solution saline tampon barbital, à raison de $10^7$ cellules par millilitre en vue de les examiner par un essai de fixation du complément pour la recherche des virus de la leucose aviaire (essai COFAL), soit dans de la solution saline tamponnée phosphate en vue de les examiner par immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA). Procédez à 3 cycles de congélation-décongélation, pour libérer l'antigène spécifique de groupe et effectuez un essai COFAL ou un essai ELISA sur chaque extrait afin de détecter la présence éventuelle de l'antigène spécifique de groupe de la leucose aviaire.

L'essai n'est pas valable si l'antigène spécifique de groupe est détecté dans moins de 5 des 6 cultures servant de témoins positifs, ou si l'un des témoins négatifs donne un résultat positif, ou si les 2 témoins négatifs donnent des résultats non concluants. Si plus de 1 culture infectée avec la préparation à examiner donne un résultat non concluant, de nouvelles subcultures des portions de tapis cellulaire de fibroblastes mises en réserve doivent être effectuées et examinées jusqu'à obtention d'un résultat sans équivoque. Si l'une des cultures infectées avec la préparation à examiner donne un résultat positif, la présence de virus de la leucose aviaire dans la préparation à examiner est démontrée.

Le lot de semence satisfait à l'essai s'il n'y a aucun signe de la présence de virus de la leucose aviaire.

### 4. RECHERCHE DU VIRUS DE LA RÉTICULO-ENDOTHÉLIOSE AVIAIRE

Préparez 11 cultures primaires ou secondaires de fibroblastes d'embryons de poulet âgés de 9-11 jours ou de fibroblastes d'embryons de canard âgés de 13-14 jours. Chaque tapis cellulaire doit avoir une surface d'environ 25 $cm^2$. Eliminez le milieu de culture à confluence. Inoculez 0,1 mL de la préparation à examiner à 5 de ces cultures. Laissez adsorber pendant 1 h, puis ajoutez le milieu de culture. Inoculez le virus de la réticuloendothéliose aviaire (au maximum 10 $DICC_{50}$ pour 0,1 mL) à 4 autres cultures, qui serviront de témoins positifs. Conservez 2 cultures non infectées comme témoins négatifs.

Incubez les cellules pendant un total d'au moins 10 jours, en effectuant 2 subcultures à intervalles de 3-4 jours. L'essai n'est pas valable si moins de 3 des 4 cultures de témoins positifs ou moins de 4 des 5 cultures d'essai ou aucune des 2 cultures de témoins négatifs ne survit après un passage donné.

Préparez la dernière subculture sur un substrat approprié de façon à obtenir une surface d'environ 10 $cm^2$ de fibroblastes confluents à partir de chacune des 11 cultures originelles en vue de l'essai suivant : effectuez une recherche du virus de la réticuloendothéliose aviaire par immunomarquage sur chacune de ces 11 cultures d'environ 10 $cm^2$. L'essai n'est pas valable si le virus de la réticuloendothéliose aviaire est détecté dans moins de 3 des 4 cultures servant de témoins positifs ou dans l'un des témoins négatifs, ou si les 2 témoins négatifs donnent des résultats non concluants. Si plus de 1 culture infectée avec la préparation à examiner donne un résultat non concluant, de nouvelles subcultures des portions de tapis cellulaire de fibroblastes mises en réserve doivent être effectuées et examinées jusqu'à obtention d'un résultat sans équivoque.

Le lot de semence satisfait à l'essai s'il n'y a aucun signe de la présence du virus de la réticuloendothéliose aviaire.

### 5. RECHERCHE DU VIRUS DE L'ANÉMIE DU POULET

Préparez 11 suspensions de 20 mL de la lignée cellulaire MDCC-MSBI ou une autre lignée cellulaire de sensibilité équivalente, dans des flacons de culture cellulaire de 25 $cm^2$ à raison d'environ $5 \times 10^5$ cellules/mL. Inoculez 0,1 mL de préparation à examiner aux suspensions contenues dans 5 de ces flacons. Inoculez 10 $DICC_{50}$ du virus de l'anémie du poulet à 4 autres suspensions, qui serviront de témoins positifs. Conservez au moins 2 cultures non infectées. Incubez toutes les cultures pendant un total d'au moins 24 jours, en effectuant 8 subcultures à intervalles de 3-4 jours. Lors des subcultures, la présence du virus de l'anémie du poulet peut se manifester par un changement de coloration d'origine métabolique dans les cultures infectées, le milieu de culture apparaissant rouge par comparaison à celui des cultures témoins. Recherchez au microscope un éventuel effet cytopathogène dans les cultures. Après cet examen ou à la fin de la période d'incubation, centrifugez le contenu de chaque flacon à faible vitesse, puis remettez les cellules en suspension à raison d'environ $10^6$ cellules/mL et transférez 25 µL des différentes suspensions dans 10 puits d'une plaque multipuits. Examinez après marquage des cellules par immunomarquage.

L'essai n'est pas valable si le virus de l'anémie du poulet est détecté dans moins de 3 des 4 cultures servant de témoins positifs ou dans l'une des cultures non infectées. Si plus de 1 culture infectée avec la préparation à examiner donne un résultat non concluant, de nouvelles subcultures des portions de suspensions à examiner mises en réserve doivent être effectuées et examinées jusqu'à obtention d'un résultat sans équivoque.

Le lot de semence satisfait à l'essai s'il n'y a aucun signe de la présence du virus de l'anémie du poulet.

### 6. RECHERCHE DES AGENTS ÉTRANGERS SUR POUSSINS

Inoculez à au moins 10 poussins l'équivalent de 100 doses de vaccin par voie intramusculaire et l'équivalent de 10 doses par instillation oculaire. Des poussins âgés de 2 semaines ou des poussins plus âgés si le virus du lot de semence est pathogène pour des poussins de cet âge peuvent être utilisés si nécessaire et justifié. A titre exceptionnel, pour les vaccins inactivés, le virus peut être neutralisé par des immunosérums spécifiques si, à l'âge d'administration, le virus du lot de semence est pathogène pour les oiseaux. Répétez les inoculations 2 semaines plus tard. Placez les poussins en observation pendant 5 semaines à compter du jour de la première inoculation. N'administrez aux poussins aucun agent antimicrobien pendant cette période. L'essai n'est pas valable si le nombre de poussins survivants au terme de la période d'observation est inférieur à 80 pour cent.

Effectuez un prélèvement de sérum sur chaque poussin à la fin de la période d'observation. Procédez sur chaque échantillon de sérum à une recherche d'anticorps dirigés contre les agents énumérés ci-après (à l'exception du virus du même type que celui du lot de semence), par l'une des méthodes indiquées pour la recherche des agents.

L'observation chez les poussins de signes cliniques (autres que des signes attribuables au virus du lot de semence) au cours de la période d'observation et la détection d'anticorps chez les poussins après l'inoculation (sauf ceux dirigés contre le virus du lot de semence) sont considérées comme des preuves de la présence d'agents étrangers dans le lot de semence.

Il est recommandé de conserver les sérums de ces oiseaux de façon à pouvoir effectuer des essais supplémentaires en cas de modification des exigences.

**A. Essais standards**

| Agent | Méthode d'essai |
|---|---|
| Adénovirus aviaires, groupe 1 | SN, EIA, AGP |
| Virus de l'encéphalomyélite aviaire | AGP, EIA |
| Virus de la bronchite infectieuse aviaire | EIA, HI |
| Virus de la laryngotrachéite infectieuse aviaire | SN, EIA, IS |
| Virus de la leucose aviaire | SN, EIA |
| Virus de la néphrite aviaire | IS |
| Orthoréovirus aviaires | IS, EIA |
| Virus de la réticuloendothéliose aviaire | AGP, IS, EIA |
| Virus de l'anémie du poulet | IS, EIA, SN |
| Virus du syndrome de chute de ponte | HI, EIA |
| Virus de la bursite infectieuse aviaire | Sérotype 1 : AGP, EIA, SN<br>Sérotype 2 : SN, |
| Virus A de la grippe | AGP, EIA, HI |
| Virus de la maladie de Marek | AGP |
| Virus de la pseudopeste aviaire | HI, EIA |

| Agent | Méthode d'essai |
|---|---|
| Virus de la rhinotrachéite du dindon | EIA |
| *Salmonella pullorum* | Agg |

Agg : agglutination
AGP : précipitation sur gélose
EIA : dosage immunoenzymatique (par exemple ELISA)
HI : inhibition de l'hémagglutination
IS : immunomarquage (par exemple anticorps fluorescent)
SN : séroneutralisation

**B. Essais supplémentaires pour la recherche des agents étrangers du dindon**

Si le virus du lot de semence ou les substrats de multiplication du virus proviennent du dindon, effectuez également une recherche d'anticorps dirigés contre les agents suivants.

| Agent | Méthode d'essai |
|---|---|
| *Chlamydia* spp. | EIA |
| Virus de l'entérite hémorragique infectieuse aviaire | AGP |
| Paramyxovirus 3 aviaire | HI |
| Virus de la bursite infectieuse aviaire type 2 | SN |

Une recherche du virus de la maladie lymphoproliférative du dindon est effectuée par inoculation de la préparation, par voie intrapéritonéale, à 20 dindonneaux âgés de 4 semaines. Placez les dindonneaux en observation pendant 40 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 20 pour cent des dindonneaux meurent de causes non spécifiques. Le lot de semence satisfait à l'essai si des coupes histologiques de la rate et du thymus, effectuées sur 10 dindonneaux 2 semaines après l'inoculation, ne font pas apparaître de lésions macroscopiques ou microscopiques (autres que celles attribuables au virus vaccinal) et si aucun dindonneau ne meurt de causes attribuables au lot de semence.

**C. Essais supplémentaires pour la recherche des agents étrangers du canard**

Si le virus du lot de semence ou les substrats de multiplication du virus proviennent du canard, effectuez également une recherche d'anticorps dirigés contre les agents suivants.

| Agent | Méthode d'essai |
|---|---|
| *Chlamydia* spp. | EIA |
| Parvovirus du canard et de l'oie | SN, EIA |
| Virus de l'entérite du canard | SN |
| Virus de l'hépatite virale du canard type I | SN |

Le lot de semence satisfait à l'essai si la présence d'aucun des agents cités n'est détectée.

**D. Essais supplémentaires pour la recherche des agents étrangers de l'oie**

Si le virus du lot de semence ou les substrats de multiplication du virus proviennent de l'oie, effectuez également une recherche des agents suivants.

| Agent | Méthode d'essai |
|---|---|
| Parvovirus du canard et de l'oie | SN, EIA |
| Virus de l'entérite du canard | SN |
| Polyomavirus de l'oie | Essai ci-après sur des oisons ou un autre essai approprié |

Inoculez par voie sous-cutanée l'équivalent d'au moins 10 doses à 10 oisons réceptifs âgés de 1 jour. Placez les oisons en observation pendant 28 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 20 pour cent des oisons meurent de causes non spécifiques. Le virus du lot de semence satisfait à l'essai si aucun oison ne meurt de causes attribuables au lot de semence.

7. SPÉCIFICATIONS RELATIVES À LA PRÉSENCE D'ANTICORPS DANS LES SÉRUMS UTILISÉS POUR LA RECHERCHE D'AGENTS ÉTRANGERS

Il doit être démontré, par des essais de sensibilité convenable, que tous les lots de sérum utilisés dans la recherche d'agents étrangers, soit pour neutraliser le virus vaccinal (lot de semence virale ou lot de vaccin) soit comme additifs des milieux de culture cellulaire, sont exempts d'anticorps dirigés contre les microorganismes dont la liste figure ci-après et n'exercent pas d'effet inhibiteur sur ces microorganismes.

Adénovirus aviaires
Virus de l'encéphalomyélite aviaire
Virus de la bronchite infectieuse aviaire
Virus 1 et 2 de la bursite infectieuse aviaire
Virus de l'entérite hémorragique infectieuse aviaire
Virus de la laryngotrachéite infectieuse aviaire
Virus de la leucose aviaire
Virus de la néphrite aviaire
Paramyxovirus aviaires 1 à 9
Orthoréovirus aviaires
Virus de la réticuloendothéliose aviaire
Virus de l'anémie du poulet
Virus de l'entérite du canard
Virus de l'hépatite virale du canard type I
Virus du syndrome de la chute de ponte
Virus de la variole des gallinacés
Virus grippaux
Virus de la maladie de Marek
Herpèsvirus du dindon
Virus de la rhinotrachéite du dindon

Le sérum non-immun destiné à être ajouté aux milieux de culture peut être considéré comme exempt d'anticorps dirigés contre l'un de ces virus si l'on sait que celui-ci n'infecte pas l'espèce animale dont est issu le sérum ; il n'est donc pas nécessaire d'effectuer une recherche de ces anticorps. Les immunosérums monospécifiques destinés à la neutralisation virale peuvent être considérés comme exempts d'anticorps dirigés contre l'un de ces virus s'il peut être démontré que l'antigène immunisant ne peut pas avoir été contaminé par des antigènes issus de ce virus et si l'on sait que celui-ci n'infecte pas l'espèce animale dont est issu le sérum ; il n'est donc pas nécessaire d'effectuer une recherche de ces anticorps. Il n'y a pas lieu de contrôler à nouveau les sérums obtenus à partir d'oiseaux provenant d'élevages EOPS (*5.2.2*).

Les lots de sérums destinés à la neutralisation du virus vaccinal ne doivent pas être préparés à partir d'un des niveaux de passage de l'isolat viral dont est issu le lot de semence primaire ni à partir d'un isolat multiplié dans la même lignée cellulaire.

**01/2008:20625**

# 2.6.25. VACCINS VIRAUX VIVANTS AVIAIRES : RECHERCHE DES AGENTS ÉTRANGERS DANS LES LOTS DE PRODUIT FINAL

DISPOSITIONS GÉNÉRALES

a) Dans les essais suivants, les poulets et/ou du matériel provenant de poulets tels que des oeufs et des cultures cellulaires doivent être issus d'élevages de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*).

b) Les cultures cellulaires destinées aux essais des agents étrangers satisfont aux exigences relatives aux cultures de cellules primaires spécifiées dans le chapitre *5.2.4. Cultures cellulaires utilisées pour la préparation de vaccins pour usage vétérinaire*, à l'exception des essais du caryotype et du pouvoir tumorigène, qu'il n'est pas nécessaire d'effectuer.

c) Dans le cas d'essais utilisant des cultures cellulaires, des spécifications précises sont données en ce qui concerne le nombre de cultures, la surface des tapis cellulaires et le taux de survie minimal. Il est également possible de choisir un nombre différent de cultures ou une autre surface cellulaire, sous réserve qu'au minimum un nombre de 2 cultures soit employé, que la surface totale et le volume total de vaccin à examiner appliquée soient maintenus à des niveaux au moins égaux à ceux prescrits ici et que les exigences de taux de survie soient adaptés en conséquence.

d) Pour réaliser ces essais, utilisez directement le vaccin s'il se présente sous forme liquide ou, s'il se présente sous forme cryodesséchée, reconstituez-en une certaine quantité avec le liquide indiqué sur l'étiquette ou un autre liquide approprié tel que de l'eau pour préparations injectables. Sauf indication contraire ou justifiée, l'échantillon soumis à l'essai doit contenir l'équivalent de 10 doses de vaccin pour 0,1 mL d'inoculum.

e) Si le virus vaccinal est susceptible de gêner la conduite de l'essai ou d'en diminuer la sensibilité, neutralisez-le au moyen d'un immunosérum monospécifique.

f) Lorsqu'il est indiqué dans une monographie, ou s'il est autrement justifié, que la neutralisation du virus vaccinal est nécessaire mais difficile à effectuer, les essais *in vitro* décrits ci-après sont adaptés, selon les besoins, pour avoir les garanties nécessaires de l'absence de contamination par un agent étranger. Une recherche des agents étrangers sur sérum de poussin obtenu lors des recherches effectuées sur le lot de vaccin comme décrit sous 6. Recherche des agents étrangers sur poussins du chapitre *2.6.24. Recherche des agents étrangers dans les lots de semence* peut être effectuée en remplacement ou en plus des essais *in vitro* réalisés sur le lot.

g) Les immunosérums monospécifiques et les sérums d'origine aviaire utilisés en culture cellulaire ou à d'autres fins doivent être exempts d'anticorps dirigés contre les microorganismes dont la liste figure sous 7. Spécifications relatives à la présence d'anticorps dans les sérums utilisés pour la recherche d'agents étrangers (*2.6.24*) et ne doivent pas exercer d'effet inhibiteur sur ces microorganismes.

h) D'autres types d'essais que ceux décrits dans le présent texte peuvent être utilisés, à condition qu'ils soient de sensibilité au moins équivalente et de spécificité appropriée. Les techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) sont adaptées à une détection spécifique de nombreux agents étrangers et peuvent être utilisées après validation de leur sensibilité et spécificité.

## 1. RECHERCHE DES AGENTS ÉTRANGERS SUR OEUFS DE POULE EMBRYONNÉS

Préparez le vaccin à examiner, si nécessaire dilué, de façon à obtenir une quantité de virus neutralisé équivalant à 10 doses de vaccin pour 0,2 mL d'inoculum. Des antibiotiques appropriés peuvent être ajoutés. Avec cet inoculum, infectez 3 groupes de 10 oeufs de poule embryonnés selon les modes d'administration suivants :

- groupe 1 : 0,2 mL d'inoculum dans la cavité allantoïdienne de chaque oeuf embryonné âgé de 9-11 jours,
- groupe 2 : 0,2 mL d'inoculum sur la membrane chorio-allantoïdienne de chaque oeuf embryonné âgé de 9-11 jours,
- groupe 3 : 0,2 mL d'inoculum dans le sac vitellin de chaque oeuf embryonné âgé de 5-6 jours.

Mirez quotidiennement les oeufs pendant 7 jours pour les groupes 1 et 2, et pendant 12 jours pour le groupe 3. Eliminez, en les considérant comme non spécifiques, les embryons morts dans les premières 24 h ; l'essai n'est valable que si au moins 6 des embryons de chaque groupe survivent au-delà des premières 24 h suivant l'inoculation. Procédez à un examen macroscopique de tous les embryons morts après les premières 24 h ou ayant survécu à la période d'incubation, pour détecter d'éventuelles anomalies. Examinez également la membrane chorio-allantoïdienne de ces oeufs pour détecter d'éventuelles anomalies et effectuez sur le liquide allantoïdien une recherche d'agents hémagglutinants.

Procédez à un second passage sur embryons. Réunissez séparément les produits obtenus à partir des embryons morts et anormaux, et à partir des embryons vivants. Inoculez chaque mélange à 10 oeufs embryonnés selon chacun des modes d'administration décrits plus haut, en utilisant le matériel provenant respectivement des membranes chorio-allantoïdiennes pour l'inoculation sur les membranes chorio-allantoïdiennes, des liquides allantoïdiens pour l'inoculation dans la cavité allantoïdienne et de l'embryon pour l'inoculation dans le sac vitellin. Dans le cas des oeufs inoculés par les voies allantoïque et chorio-allantoïque, mirez quotidiennement les oeufs pendant 7 jours, en procédant aux examens décrits plus haut. Dans le cas des oeufs inoculés dans le sac vitellin, mirez quotidiennement les oeufs pendant 12 jours, en procédant aux examens décrits plus haut.

Le lot de vaccin satisfait à l'essai si aucun embryon ne présente d'anomalie macroscopique, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si l'examen des membranes chorio-allantoïdiennes et les essais effectués sur les liquides allantoïdiens ne présentent aucune indication de la présence d'agents étrangers.

## 2. RECHERCHE DES AGENTS ÉTRANGERS SUR CULTURES DE CELLULES DE FIBROBLASTES D'EMBRYONS DE POULET

Préparez 7 cultures primaires ou secondaires de fibroblastes d'embryons de poulet âgés de 9-11 jours sous forme de tapis cellulaires d'une surface d'environ 25 $cm^2$. Conservez 2 cultures comme témoins négatifs et traitez-les de la même manière que les 5 cultures inoculées avec le vaccin comme décrit ci-après. Eliminez le milieu de culture à confluence. Inoculez 0,1 mL de vaccin à examiner à chacune des 5 cultures d'essai. Laissez adsorber pendant 1 h, puis ajoutez le milieu de culture et incubez les cellules pendant au moins 21 jours, en effectuant des passages tous les 4-5 jours. Chaque passage est réalisé par mélange des cellules et du milieu de culture des 5 tapis cellulaires après un cycle de congélation-décongélation, puis inoculation de 0,1 mL de ce mélange à 5 cultures cellulaires récemment préparées à partir de fibroblastes d'embryons de poulet d'une surface d'environ 25 $cm^2$ comme précédemment. Pour le dernier passage, effectuez également une subculture sur un substrat approprié de façon à obtenir, à partir de chacun des tapis cellulaires originels, un tapis cellulaire d'environ 10 $cm^2$, pour effectuer l'essai A. L'essai n'est pas valable si moins de 80 pour cent des tapis cellulaires inoculés avec le vaccin à examiner ou si aucune des 2 cultures servant de témoins négatifs ne survit à l'un des passages.

Pendant toute la période d'incubation, procédez fréquemment à des examens microscopiques de toutes les cultures cellulaires pour détecter d'éventuels signes d'effet cytopathogène ou autre preuve de la présence d'agents contaminants dans le vaccin à examiner. A la fin de la période totale d'incubation, effectuez les essais suivants.

A. Fixez et colorez (par coloration de Giemsa ou à l'hématoxyline/éosine) chacun des 5 tapis cellulaires confluants d'environ 10 $cm^2$ obtenus à partir des tapis cellulaires originels. Examinez les cellules au microscope pour détecter tout effet cytopathogène, tout corps d'inclusion, toute formation syncytiale ou toute autre preuve de la présence d'agents contaminants dans le vaccin à examiner.

B. Eliminez le milieu de culture et lavez chacun des 5 tapis cellulaires d'environ 25 $cm^2$ obtenus à partir des tapis cellulaires originels. Recouvrez ces cellules avec une suspension à 0,5 pour cent d'érythrocytes de poulet lavés (en utilisant au moins 1 mL de suspension pour 5 $cm^2$ de cellules). Incubez les cellules à 4 °C pendant 20 min, puis lavez-les avec précaution avec une solution saline tamponnée

phosphate pH 7,4. Examinez les cellules au microscope pour détecter une éventuelle hémadsorption attribuable à la présence d'agents hémadsorbants dans le vaccin à examiner.

C. Effectuez un contrôle sur les échantillons individuels de chaque milieu de culture, au moyen d'érythrocytes de poulet, pour détecter une éventuelle hémagglutination attribuable à la présence d'agents hémagglutinants dans le vaccin à examiner.

L'essai n'est pas valable si la présence d'agents étrangers dans les cultures servant de témoin négatif est constatée. Le lot de vaccin satisfait à l'essai s'il n'est observé aucun signe de présence d'agents étrangers.

3. RECHERCHE DU VIRUS DU SYNDROME DE CHUTE DE PONTE

Préparez 11 cultures de cellules hépatiques à partir d'embryons de poulet âgés de 14-16 jours, sous forme de tapis cellulaires d'une surface d'environ 25 cm$^2$. Eliminez le milieu de culture à confluence. Inoculez 0,1 mL de vaccin à examiner à chacune de 5 de ces cultures (cultures d'essai). Laissez adsorber pendant 1 h puis ajoutez le milieu de culture. Inoculez à 4 des cultures une souche appropriée du virus du syndrome de chute de ponte (au maximum 10 DICC$_{50}$ pour 0,1 mL) ; ces cultures serviront de témoins positifs. Conservez 2 cultures non inoculées comme témoins négatifs.

Incubez les cellules pendant un total d'au moins 21 jours, en effectuant des passages tous les 4-5 jours de la façon suivante : effectuez un cycle de congélation-décongélation ; préparez séparément des mélanges des cellules et des liquides des cultures d'essai, des témoins positifs et des témoins négatifs ; inoculez 0,1 mL de chaque mélange respectivement à 5, 4 et 2 cultures cellulaires d'une surface d'environ 25 cm$^2$, récemment préparées à partir de cellules hépatiques d'embryon de poulet. L'essai n'est pas valable si moins de 4 des 5 cultures d'essai ou moins de 3 des 4 cultures servant de témoins positifs ou aucune des 2 cultures servant de témoins négatifs ne survit après un passage donné.

Examinez fréquemment les cultures au microscope pendant toute la période d'incubation pour rechercher un effet cytopathogène éventuel ou une autre indication de la présence d'un agent étranger dans le vaccin à examiner. A la fin de la période totale d'incubation, opérez comme suit : à l'aide d'érythrocytes de poulet, examinez séparément des liquides de cultures préparés à partir des cultures d'essai, des témoins positifs et des témoins négatifs pour rechercher l'hémagglutination attribuable à la présence d'agents hémagglutinants.

L'essai n'est pas valable si le virus du syndrome de chute de ponte est détecté dans moins de 3 des 4 cultures servant de témoins positifs, ou dans l'un des témoins négatifs, ou si les 2 témoins négatifs donnent des résultats non concluants. Si plus de 1 culture d'essai donne un résultat non concluant, de nouvelles subcultures des portions de tapis cellulaires mises en réserve doivent être effectuées et examinées jusqu'à obtention d'un résultat sans équivoque.

Le lot de vaccin satisfait à l'essai s'il n'y a aucune indication de la présence du virus du syndrome de chute de ponte ou d'un autre agent étranger.

4. RECHERCHE DU VIRUS DE LA MALADIE DE MAREK

Préparez 11 cultures primaires ou secondaires de fibroblastes d'embryons de poulet âgés de 9-11 jours, sous forme de tapis cellulaires d'une surface d'environ 25 cm$^2$. Eliminez le milieu de culture à confluence. Inoculez 0,1 mL de vaccin à examiner à 5 de ces cultures (cultures d'essai). Laissez adsorber pendant 1 h, puis ajoutez le milieu de culture. Inoculez à 4 des cultures une souche appropriée du virus de la maladie de Marek (au maximum 10 DICC$_{50}$ pour 0,1 mL) ; ces cultures serviront de témoins positifs. Conservez 2 cultures non inoculées comme témoins négatifs.

Incubez les cellules pendant un total d'au moins 21 jours, en effectuant des passages tous les 4-5 jours de la façon suivante : traitez les cellules à la trypsine et préparez séparément des mélanges des cultures d'essai, des témoins positifs et des témoins négatifs ; mélangez une quantité appropriée de chaque suspension et une suspension récemment préparée de fibroblastes primaires ou secondaires d'embryons de poulet ; préparez respectivement 5, 4 et 2 cultures cellulaires comme précédemment. L'essai n'est pas valable si moins de 4 des 5 cultures d'essai ou moins de 3 des 4 cultures servant de témoins positifs ou aucune des 2 cultures servant de témoins négatifs ne survit après l'un des passages.

Examinez fréquemment les cultures au microscope pendant toute la période d'incubation pour rechercher un éventuel effet cytopathogène ou toute autre indication de la présence d'un agent étranger dans le vaccin à examiner.

Préparez la dernière subculture sur un substrat approprié de façon à obtenir une surface d'environ 10 cm$^2$ de cellules confluantes à partir de chacune des 11 cultures originelles, en vue de l'essai suivant : effectuez une recherche du virus de la maladie de Marek par immunomarquage sur chacune de ces 11 cultures d'environ 10 cm$^2$. L'essai n'est pas valable si le virus de la maladie de Marek est détecté dans moins de 3 des 4 cultures servant de témoins positifs, ou dans l'un des témoins négatifs, ou si les 2 témoins négatifs donnent des résultats non concluants.

Le lot de vaccin satisfait à l'essai s'il n'y a aucune indication de la présence du virus de la maladie de Marek ou d'un autre agent étranger.

5. RECHERCHE DU VIRUS DE LA RHINOTRACHÉITE DU DINDON

A. Sur fibroblastes d'embryons de poulet

*NOTE : cet essai peut être combiné avec l'essai 2 en utilisant les mêmes cultures cellulaires inoculées avec la préparation de référence et les mêmes contrôles négatifs à toutes les étapes jusqu'à l'essai spécifique final de recherche du virus de la rhinotrachéite du dindon sur cellules de la dernière subculture.*

Préparez 11 cultures primaires ou secondaires de fibroblastes d'embryons de poulet âgés de 9-11 jours sous forme de tapis cellulaires d'une surface d'environ 25 cm$^2$. Eliminez le milieu de culture à confluence. Inoculez 0,1 mL de vaccin à examiner à 5 de ces cultures (cultures d'essai). Laissez adsorber pendant 1 h puis ajoutez le milieu de culture. Inoculez à 4 des cultures une souche appropriée du virus de la rhinotrachéite du dindon (au maximum 10 DICC$_{50}$ pour 0,1 mL) ; ces cultures serviront de témoins positifs. Conservez 2 cultures non inoculées comme témoins négatifs.

Incubez les cellules pendant un total d'au moins 21 jours, en effectuant des passages tous les 4-5 jours de la façon suivante : effectuez un cycle de congélation-décongélation ; préparez séparément des mélanges des cellules et des liquides des cultures d'essai, des témoins positifs et des témoins négatifs ; inoculez 0,1 mL de chaque mélange respectivement à 5, 4 et 2 cultures cellulaires d'une surface d'environ 25 cm$^2$, récemment préparées à partir de fibroblastes d'embryons de poulet. L'essai n'est pas valable si moins de 4 des 5 cultures d'essai ou moins de 3 des 4 cultures servant de témoins positifs ou aucune des 2 cultures servant de témoins négatifs ne survit après un passage donné.

Préparez la dernière subculture sur un support approprié pour obtenir une surface d'environ 10 cm$^2$ de cellules confluantes à partir de chacune des 11 cultures originelles, en vue de l'essai suivant : effectuez une recherche du virus de la rhinotrachéite du dindon par immunomarquage sur ces 11 cultures. L'essai n'est pas valable si le virus de la rhinotrachéite du dindon est détecté dans moins de 3 des 4 cultures servant de témoins positifs ou dans l'un des témoins négatifs, ou si les 2 témoins négatifs donnent des résultats non concluants. Si plus de 1 culture inoculée avec

le vaccin donne un résultat non concluant, de nouvelles subcultures des portions de fibroblastes mises en réserve doivent être effectuées et examinées jusqu'à obtention d'un résultat sans équivoque.

Le lot de vaccin satisfait à l'essai s'il n'y a aucune indication de la présence du virus de la rhinotrachéite du dindon ou d'un autre agent étranger.

B. Sur cellules Vero

Préparez 11 cultures de cellules Vero sous forme de tapis cellulaires d'une surface d'environ 25 cm². Eliminez le milieu de culture à confluence. Inoculez 0,1 mL de vaccin à 5 de ces cultures (cultures d'essai). Laissez adsorber pendant 1 h, puis ajoutez le milieu de culture. Inoculez à 4 des cultures une souche appropriée du virus de la rhinotrachéite du dindon (au maximum 10 $DICC_{50}$ pour 0,1 mL) ; ces cultures serviront de témoins positifs. Conservez 2 cultures non inoculées comme témoins négatifs.

Incubez les cellules pendant un total d'au moins 21 jours, en effectuant des passages tous les 4-5 jours de la façon suivante : effectuez un cycle de congélation-décongélation ; préparez séparément des mélanges des cellules et des liquides des cultures d'essai, des témoins positifs et des témoins négatifs ; inoculez 0,1 mL de chaque mélange respectivement à 5, 4 et 2 cultures cellulaires d'environ 25 cm² de surface récemment préparées. L'essai n'est pas valable si moins de 4 des 5 cultures d'essai ou moins de 3 des 4 cultures de témoins positifs ou aucune des 2 cultures de témoins négatifs ne survit après un passage donné.

Préparez la dernière subculture sur un substrat approprié de façon à obtenir une surface d'environ 10 cm² de cellules confluantes à partir de chacune des 11 cultures originelles, en vue de l'essai suivant : effectuez une recherche du virus de la rhinotrachéite du dindon par immunomarquage sur chacune de ces 11 cultures d'environ 10 cm². L'essai n'est pas valable si le virus de la rhinotrachéite du dindon est détecté dans moins de 3 des 4 cultures servant de témoins positifs ou dans l'un des témoins négatifs, ou si les 2 témoins négatifs donnent des résultats non concluants. Si plus de 1 culture inoculée avec le vaccin donne un résultat non concluant, de nouvelles subcultures des portions de tapis cellulaires mises en réserve doivent être effectuées et examinées jusqu'à obtention d'un résultat sans équivoque.

Le lot de vaccin satisfait à l'essai s'il n'y a aucune indication de la présence du virus de la rhinotrachéite du dindon ou d'un autre agent étranger.

6. RECHERCHE DU VIRUS DE L'ANÉMIE DU POULET

Préparez 11 suspensions de 20 mL de la lignée cellulaire MDCC-MSBI ou une autre lignée cellulaire de sensibilité équivalente dans des flacons de 25 cm² à raison d'environ $5 \times 10^5$ cellules par millilitre. Inoculez 0,1 mL de vaccin à examiner aux suspensions contenues dans 5 de ces flacons. Inoculez 10 $DICC_{50}$ du virus de l'anémie du poulet à 4 autres suspensions, qui serviront de témoins positifs. Conservez au moins 2 cultures non infectées. Incubez toutes les cultures pendant un total d'au moins 24 jours, en effectuant 8 subcultures à intervalles de 3-4 jours. Lors des subcultures, la présence du virus de l'anémie du poulet peut se manifester par un changement de coloration d'origine métabolique dans les cultures infectées, le milieu de culture apparaissant rouge par comparaison à celui des cultures témoins. Recherchez au microscope un éventuel effet cytopathogène dans les cultures. Après cet examen ou à la fin de la période d'incubation, centrifugez le contenu de chaque flacon à faible vitesse, puis remettez les cellules en suspension à raison d'environ $10^6$ cellules/mL et transférez 25 µL des différentes suspensions dans 10 puits d'une plaque multipuits. Examinez après marquage des cellules par immunomarquage.

L'essai n'est pas valable si le virus de l'anémie du poulet est détecté dans moins de 3 des 4 cultures servant de témoins positifs ou dans l'une des cultures non infectées. Si plus de 1 culture infectée avec le vaccin donne un résultat non concluant, de nouvelles subcultures des portions de suspensions à examiner à partir mises en réserve doivent être effectuées et examinées jusqu'à obtention d'un résultat sans équivoque.

Le lot de vaccin satisfait à l'essai s'il n'y a aucune indication de la présence du virus de l'anémie du poulet.

7. RECHERCHE DU VIRUS DE L'ENTÉRITE DU CANARD

L'essai suivant est effectué sur les vaccins préparés sur des substrats provenant de canards ou d'oies.

Préparez 11 cultures primaires ou secondaires de cellules hépatiques d'embryons de canard de Barbarie âgés de 21-22 jours sous forme de tapis cellulaires d'une surface d'environ 25 cm². Eliminez le milieu de culture à confluence. Inoculez 0,1 mL de vaccin à examiner à 5 de ces cultures (cultures d'essai). Laissez adsorber pendant 1 h, puis ajoutez le milieu de culture. Inoculez à 4 des cultures une souche appropriée du virus de l'entérite du canard (au maximum 10 $DICC_{50}$ pour 0,1 mL) ; ces cultures serviront de témoins positifs. Conservez 2 cultures non inoculées comme témoins négatifs.

Incubez les cellules pendant un total d'au moins 21 jours, en effectuant des passages tous les 4-5 jours de la façon suivante : traitez les cellules à la trypsine et préparez séparément des mélanges des cellules d'essai, des témoins positifs et des témoins négatifs ; mélangez une partie de chaque suspension et une suspension récemment préparée de cellules hépatiques primaires ou secondaires d'embryons de canards de Barbarie ; préparez respectivement 5, 4 et 2 cultures cellulaires comme précédemment. L'essai n'est pas valable si moins de 4 des 5 cultures d'essai ou moins de 3 des 4 cultures servant de témoins positifs ou aucune des 2 cultures servant de témoins négatifs ne survit après un passage donné.

Préparez la dernière subculture sur un substrat approprié, de façon à obtenir une surface d'environ 10 cm² de cellules confluantes à partir de chacune des 11 cultures originelles, en vue de l'essai suivant : effectuez une recherche du virus de l'entérite du canard par immunomarquage sur chacune de ces 11 cultures d'environ 10 cm². L'essai n'est pas valable si le virus de l'entérite du canard est détecté dans moins de 3 des 4 cultures servant de témoins positifs ou dans l'un des témoins négatifs, ou si les 2 témoins négatifs donnent des résultats non concluants. Si plus de 1 culture infectée avec le vaccin donne un résultat non concluant, de nouvelles subcultures des portions de tapis cellulaires mises en réserve doivent être effectuées et examinées jusqu'à obtention d'un résultat sans équivoque.

Le lot de vaccin satisfait à l'essai s'il n'y a aucune indication de la présence du virus de l'entérite du canard ou d'un autre agent étranger.

8. RECHERCHE DES PARVOVIRUS DU CANARD ET DE L'OIE

L'essai suivant est effectué sur les vaccins préparés sur des substrats provenant de canards ou d'oies.

Préparez une quantité suffisante de suspension de fibroblastes primaires ou secondaires d'embryons de canard de Barbarie âgés de 16-18 jours pour obtenir au moins 11 tapis cellulaires d'une surface d'environ 25 cm². Inoculez 0,5 mL de vaccin à examiner à une quantité de cellules suffisante pour préparer 5 cultures et ensemencez 5 récipients à l'aide de ces cellules (cultures d'essai). Inoculez 0,4 mL d'une souche approprié de parvovirus du canard (au maximum 10 $DICC_{50}$ pour 0,1 mL) à une quantité de cellules suffisante pour préparer 4 cultures et ensemencez 4 récipients à l'aide de ces cellules ; ces cellules serviront de témoins positifs. Conservez 2 cultures non inoculées comme témoins négatifs.

Incubez les cellules pendant un total d'au moins 21 jours, en effectuant des passages tous les 4-5 jours de la façon suivante : effectuez un cycle de congélation-décongélation ; préparez séparément des mélanges des cellules et des liquides des cultures d'essai, des témoins positifs et des témoins négatifs ; inoculez respectivement 0,5 mL, 0,4 mL et 0,2 mL de ces mélanges à des quantités suffisantes d'une suspension récemment préparée de

fibroblastes primaires ou secondaires d'embryons de canards de Barbarie pour préparer respectivement 5, 4 et 2 cultures cellulaires, comme précédemment. L'essai n'est pas valable si moins de 4 des 5 cultures d'essai ou moins de 3 des 4 cultures de témoins positifs ou aucune des 2 cultures de témoins négatifs ne survit après l'un des passages.

Préparez la dernière subculture sur un substrat approprié de façon à obtenir une surface d'environ 10 cm$^2$ de cellules confluantes à partir de chacune des 11 cultures originelles, en vue de l'essai suivant : effectuez une recherche de parvovirus du canard ou de l'oie par immunomarquage sur chacune de ces 11 cultures d'environ 10 cm$^2$. L'essai n'est pas valable si le parvovirus du canard est détecté dans moins de 3 des 4 cultures servant de témoins positifs ou dans l'un des témoins négatifs, ou si les 2 témoins négatifs donnent des résultats non concluants.

Le lot de vaccin satisfait à l'essai s'il n'y a aucune indication de la présence du parvovirus du canard ou de l'oie, ou d'un autre agent étranger.

**07/2009:20626**

## 2.6.26. RECHERCHE DES ANTICORPS ANTI-D DANS L'IMMUNOGLOBULINE HUMAINE POUR ADMINISTRATION PAR VOIE INTRAVEINEUSE

MATÉRIEL

*Solution saline tamponnée phosphate (PBS).* Dissolvez 8,0 g de *chlorure de sodium R*, 0,76 g de *phosphate disodique anhydre R*, 0,2 g de *chlorure de potassium R* et 0,2 g de *phosphate monopotassique R* dans de l'*eau R*, puis complétez à 1000 mL avec le même solvant. Si la solution doit être conservée pendant plusieurs jours, elle peut être additionnée de 0,2 g d'*azide de sodium R* afin d'éviter une contamination microbienne.

*Solution de papaïne.* Utilisez une solution commerciale de papaïne de qualité sérologique, dont l'activité a été validée.

*Erythrocytes.* Utilisez des mélanges d'érythrocytes D-positifs obtenus à partir d'au moins 3 donneurs, de préférence du groupe $OR_2R_2$. L'emploi d'érythrocytes D-positifs obtenus à partir de donneurs $OR_1R_1$ ou $OR_1R_2$ est également admis. Le mélange de phénotypes n'a pas été testé et n'est donc pas recommandé.

Utilisez des mélanges d'érythrocytes D-négatifs obtenus de préférence à partir de 3 donneurs du groupe Orr. L'emploi d'érythrocytes D-négatifs provenant d'un donneur unique est admis lorsque l'on ne dispose que d'un seul donneur du groupe Orr.

Lavez 4 fois les cellules avec du PBS, ou jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Centrifugez à 1800 *g* pendant 5 min pour obtenir un culot cellulaire. Traitez le culot cellulaire avec la solution de papaïne suivant les instructions du fabricant.

Stockez les érythrocytes pendant au maximum 1 semaine dans une solution de conservation. Une préparation ayant la composition suivante est appropriée :

| | |
|---|---|
| Citrate trisodique | 8 g/L |
| D-glucose | 20 g/L |
| Acide citrique | 0,5 g/L |
| Chlorure de sodium | 4,2 g/L |
| Inosine | 0,938 g/L |
| Adénosine triphosphate (ATP) | 0,4 g/L |
| Chloramphénicol | 0,34 g/L |
| Sulfate de néomycine | 0,1 g/L |

*Plaques de microtitrage.* Utilisez des plaques de microtitrage rigides à puits à fond en V.

*Etalons de référence.* L'*immunoglobuline (recherche des anticorps anti-D) PBR* et l'*immunoglobuline (témoin négatif par la recherche des anticorps anti-D) PBR* conviennent respectivement comme préparation de référence et comme témoin négatif.

MÉTHODE

Effectuez l'essai sur les solutions de référence, les solutions témoin négatives et les solutions à examiner au même moment et dans des conditions identiques. Opérez à température ambiante.

*Solutions de référence et solutions témoins négatives.* Reconstituez la préparation de référence et le témoin négatif suivant les instructions. La concentration en immunoglobuline G (IgG) des 2 préparations reconstituées est de 50 g/L. Préparez une dilution au 1/2 des préparations reconstituées, avec du PBS contenant 2 g/L d'*albumine bovine R*, de façon à obtenir une concentration en IgG de 25 g/L. Préparez 7 autres dilutions de chaque préparation en série au 1/2 avec du PBS contenant 2 g/L d'*albumine bovine R*, de façon à obtenir une gamme de dilutions allant jusqu'à 1/256 (0,195 g/L d'IgG). Déposez 20 µL de chaque dilution sur la plaque de microtitrage.

*Solutions à examiner.* Préparez une première dilution de la préparation à examiner avec du PBS contenant 2 g/L d'*albumine bovine R*, de façon à obtenir une concentration en IgG de 25 g/L : pour les préparations à 50 g/L, il faut effectuer une dilution au 1/2, tandis que pour les préparations de concentration en IgG autre que 50 g/L il faut adapter le facteur de dilution afin d'obtenir une concentration de 25 g/L. Pour permettre la comparaison avec les solutions de référence, une dilution nominale de 1/2 est attribuée à cette solution à 25 g/L, même si elle ne reflète pas la dilution réellement appliquée pour parvenir à une concentration de 25 g/L. Préparez 7 autres dilutions de chaque préparation en série au 1/2 avec du PBS contenant 2 g/L d'*albumine bovine R*, de façon à obtenir une gamme de dilutions allant jusqu'à 1/256 (0,195 g/L d'IgG) qui peut être comparée à la gamme de dilutions de la préparation de référence, qui couvre le même intervalle de concentration en IgG. Préparez 2 séries indépendantes de dilutions. Déposez 20 µL de chaque dilution sur la plaque de microtitrage.

Préparez des suspensions à 3 pour cent *V/V*, dans du PBS contenant 2 g/L d'*albumine bovine R*, d'érythrocytes D-positifs (de préférence $OR_2R_2$, mais des érythrocytes $OR_1R_1$ ou $OR_1R_2$ peuvent également être utilisés) et D-négatifs (Orr), traités par la papaïne. Ajoutez 20 µL d'érythrocytes D-positifs à l'une des séries de dilutions obtenues à partir de la préparation à examiner, de la préparation de référence et du témoin négatif et 20 µL d'érythrocytes D-négatifs à l'autre série de dilutions. Mélangez en plaçant la plaque sur un agitateur pendant 10 s.

Centrifugez la plaque à 80 *g* pendant 1 min pour obtenir un culot cellulaire. Inclinez la plaque à environ 70°. Lisez le résultat après au moins 3 min et après observation d'un écoulement cellulaire dans les puits contenant les dilutions du témoin négatif et dans les puits où ont été ajoutés les érythrocytes D-négatifs. La présence d'un agglutinat cellulaire solide au fond du puits constitue un résultat positif et l'observation d'un écoulement cellulaire constitue un résultat négatif.

Enregistrez le titre au point final comme l'inverse de la plus haute dilution donnant un résultat positif.

Le titre du témoin négatif ne doit pas être supérieur à 2. Si tel n'est pas le cas, il convient de réexaminer les réactifs et les conditions d'essai utilisés.

Le titre de la préparation à examiner n'est pas supérieur au titre de la préparation de référence, lorsque toutes les préparations sont titrées à partir d'une concentration initiale de 25 g/L.

**01/2011:20627**

# 2.6.27. CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE DES PRODUITS CELLULAIRES

Il a été démontré que cet essai était préférable à l'essai de stérilité (*2.6.1*) pour certains produits cellulaires puisqu'il a une meilleure sensibilité, une portée plus large et est plus rapide. Il est appliqué, à la place de l'essai de stérilité (*2.6.1*) lorsqu'une monographie le prescrit. Il peut être effectué manuellement ou à l'aide d'un système automatisé.

## PRÉCAUTIONS GÉNÉRALES

L'essai est réalisé dans des conditions d'asepsie, selon les réglementations en vigueur concernant les matières potentiellement infectieuses.

Les précautions prises pour éviter une contamination microbienne ne doivent pas affecter les microorganismes recherchés. L'essai est réalisé dans des conditions régulièrement vérifiées par des prélèvements adéquats effectués dans la zone de travail et par des contrôles appropriés.

## ESSAI DE FERTILITÉ DES MILIEUX

Utilisez au moins 2 milieux de culture enrichis appropriés (par exemple, des milieux pour hémoculture) destinés à la détection des moisissures, des levures et des bactéries aérobies et anaérobies.

Confirmez la stérilité de chaque lot de milieu, par incubation de récipients représentatifs à 35-37 °C pendant au moins 7 jours.

Un essai de fertilité est effectué sur chaque lot de milieu, par le fournisseur et/ou l'utilisateur, en ensemençant 2 récipients d'essai de chaque milieu avec 10-100 microorganismes viables de chacune des souches citées dans le tableau 2.6.27.-1, puis en incubant à 35-37 °C pendant 7 jours pour la détection automatisée, ou 14 jours pour la détection visuelle d'une croissance microbienne. Les milieux de culture sont satisfaisants si une croissance est clairement observée pendant cette période d'incubation dans tous les récipients ensemencés.

Tableau 2.6.27.-1. – *Microorganismes utilisés pour l'essai de fertilité des milieux*

| | |
|---|---|
| **Milieu aérobie** | |
| *Staphylococcus aureus* | par exemple, ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518 |
| *Bacillus subtilis* | par exemple, ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | par exemple, ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 |
| *Candida albicans* | par exemple, ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179 |
| *Aspergillus brasiliensis* | par exemple, ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007 |
| **Milieu anaérobie** | |
| *Clostridium sporogenes* | par exemple, ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 ou ATCC 11437 |
| *Bacteroides fragilis* | par exemple, ATCC 25285, CIP 77.16, NCTC 9343 |

## VALIDATION DE LA MÉTHODE

En fonction du type de produit, de sa méthode de préparation, du volume de l'inoculum utilisé et du type de système d'essai, la nécessité d'une validation en présence du type de préparation à examiner doit être considérée. Sauf exception justifiée et autorisée, le système d'essai est validé en termes de spécificité (absence de résultats faussement positifs), de sensibilité (limite de détection) et de reproductibilité. Lors de la validation et notamment pour la détermination de la limite de détection, l'essai est effectué sur la préparation délibérément contaminée, à des degrés divers, avec les microorganismes suivants, choisis pour leur probabilité d'être contaminants et leurs exigences de croissance :

- *Aspergillus brasiliensis* par exemple, ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007 ;
- *Bacillus subtilis* par exemple, ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054 ;
- *Candida albicans* par exemple, ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179 ;
- *Clostridium sporogenes* par exemple, ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 ou ATCC 11437 ;
- *Propionibacterium acnes* par exemple, ATCC 11827 ;
- *Pseudomonas aeruginosa* par exemple, ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 ;
- *Staphylococcus aureus* par exemple, ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518 ;
- *Streptococcus pyogenes* par exemple, ATCC 19615, CIP 1042.26, NCIMB 13285 ;
- *Yersinia enterocolitica* par exemple, ATCC 9610, CIP 80.27, NCTC 12982.

Il peut être nécessaire de modifier cette liste de microorganismes en fonction de l'origine des cellules et de tout microorganisme détecté précédemment ou associé au type de cellules considéré.

D'autres approches de validation peuvent également être utilisées, par exemple, la comparaison inter-laboratoires.

## ESSAI DE LA PRÉPARATION À EXAMINER

**Echantillon**. Un échantillon représentatif contenant des cellules et/ou du milieu est examiné. Une fois prélevé, l'échantillon est ajouté dès que possible au milieu de culture. S'il n'est pas ajouté rapidement après le prélèvement, il est conservé à 5 ± 3 °C afin d'éviter la phagocytose des microorganismes par des cellules présentes dans certains types de produits (par exemple, les neutrophiles).

Pour les produits hématopoïétiques, la quantité minimale de produit à utiliser pour l'essai en fonction du volume total du produit ($V$ mL) est indiquée ci-après.

| Volume total du produit (millilitres) | Volume de l'inoculum |
|---|---|
| $V \geq 10$ | 1 pour cent du volume total |
| $1 \leq V < 10$ | 100 µL |
| $V < 1$ | Non applicable |

Pour les produits hématopoïétiques qui nécessitent une dilution avant congélation, le volume de l'inoculum doit être augmenté en fonction du facteur de dilution. Pour les autres produits cellulaires, les quantités minimales appropriées sont définies en termes de volume ou de nombre de doses.

**Analyse**. Ensemencez des récipients contenant du milieu de culture avec les échantillons dès que possible après prélèvement, puis incubez à 35-37 °C pendant au moins 7 ou 14 jours, en fonction du système de détection utilisé. Une proportion appropriée de l'inoculum est ajoutée à un milieu pour culture en aérobiose et le reste de l'inoculum à un milieu pour culture en anaérobiose.

## OBSERVATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Examinez les milieux, visuellement ou à l'aide de systèmes automatisés, au moins 1 fois par jour et à la fin de la période d'observation, pour détecter des signes éventuels de croissance microbienne. S'il n'est pas observé de croissance microbienne au cours ou à la fin de la période d'observation, le produit est « négatif en culture » à la limite de détection. Si une croissance est observée dans le cadre d'un essai valide, le produit est « positif en culture » ; le contaminant est identifié à un niveau taxonomique approprié (genre, espèce) et un antibiogramme est établi.

**04/2010:20630**

# 2.6.30. ESSAI D'ACTIVATION DES MONOCYTES

## 1. INTRODUCTION

L'essai d'activation des monocytes (MAT) est utilisé pour détecter ou quantifier des substances ayant la propriété d'activer les monocytes humains ou les cellules monocytaires, lesquels libèrent alors des médiateurs endogènes tels que des cytokines pro-inflammatoires, par exemple le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF$\alpha$), l'interleukine-1 bêta (IL-1$\beta$) et l'interleukine-6 (IL-6). Ces cytokines interviennent dans la pathogenèse de la réaction fébrile. L'essai d'activation des monocytes permet ainsi de détecter la présence de pyrogènes dans l'échantillon à examiner. Il peut, après validation spécifique pour le produit considéré, se substituer à l'essai des pyrogènes sur le lapin.

Les produits pharmaceutiques qui contiennent des contaminants pyrogènes ou pro-inflammatoires non endotoxiniques présentent souvent des courbes dose-réponse à très forte pente, par rapport aux courbes dose-réponse typiques des endotoxines. Il n'est pas rare que la réponse maximale à des produits ainsi contaminés soit obtenue avec des solutions non diluées, ou faiblement diluées, des préparations à examiner. Pour cette raison, il est nécessaire, lorsque l'on examine une préparation qui contient ou est susceptible de contenir des contaminants non endotoxiniques, de faire figurer la dilution minimale dans la gamme des dilutions qui seront examinées.

Trois méthodes sont décrites dans le présent chapitre.

Méthode A. Essai quantitatif

Méthode B. Essai semi-quantitatif

Méthode C. Essai de comparaison à un lot de référence

L'essai est effectué dans des conditions permettant d'éviter toute contamination par des pyrogènes.

## 2. DÉFINITIONS

La dilution maximale significative (DMS) est la dilution maximale d'un échantillon à laquelle peut être déterminée la limite en contaminants. Déterminez la DMS à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{CLC \times C}{LD}$$

$CLC$ = concentration limite en contaminant,

$C$ = concentration de la solution à examiner,

$LD$ = limite de détection.

Le critère d'acceptation, pour une décision de conformité/non conformité de la préparation (présence/absence) est la concentration limite en contaminants (CLC), exprimée en équivalent-endotoxine par milligramme, millilitre ou unité d'activité biologique de la préparation à examiner.

La CLC est calculée à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{K}{M}$$

$K$ = dose seuil d'endotoxines ayant un effet pyrogène, par kilogramme de masse corporelle,

$M$ = dose maximale recommandée pour le produit, en bolus, par kilogramme de masse corporelle.

Lorsque le produit doit être administré par injections rapprochées ou en perfusion continue, $M$ est la dose maximale totale par heure.

Lorsqu'une concentration limite en endotoxines (CLE) a été spécifiée pour un produit, la CLC prend la même valeur, sauf indication contraire. Dans ce cas, la concentration de la solution à examiner est exprimée en mg/mL si la limite en endotoxines est spécifiée par rapport à la masse (UI/mg), en Unités/mL si la limite en endotoxines est spécifiée par rapport à l'unité d'activité biologique (UI/Unité), en mL/mL si la limite en endotoxines est spécifiée par rapport au volume (UI/mL).

L'équivalent-endotoxine est la valeur de la concentration en contaminants lue sur la courbe dose-réponse établie avec l'étalon d'endotoxine (Méthode A) ou estimée par comparaison avec les réponses obtenues pour des solutions étalons d'endotoxine (Méthode B). La solution mère étalon d'endotoxine est préparée à partir d'une préparation de référence d'endotoxine étalonnée par rapport à l'étalon international, par exemple l'*étalon d'endotoxine PBR*.

La valeur seuil se calcule à l'aide de l'expression suivante :

$$\overline{x} + 3s$$

$\overline{x}$ = moyenne des réponses obtenues pour le blanc lors des 4 répétitions ($R_0$),

$s$ = écart type des réponses obtenues pour le blanc lors des 4 répétitions ($R_0$).

La valeur seuil est exprimée en unités appropriées au marqueur choisi.

La limite de détection (LD) est déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage. La LD est la concentration en endotoxine qui correspond à la valeur seuil. Pour les besoins de l'essai, la LD est exprimée en équivalent-endotoxine par millilitre.

## 3. PRINCIPE GÉNÉRAL

Une solution de la préparation à examiner est incubée avec une source de monocytes humains ou de cellules monocytaires humaines ; cette source peut être du sang périphérique humain héparinisé, de préférence âgé de 4 h au plus, ou une fraction de ce sang contenant des monocytes (il peut s'agir de cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP) humaines isolées par exemple par centrifugation sur gradient de densité), ou encore une lignée de cellules monocytaires humaines. Le sang périphérique humain héparinisé est en général dilué avec du milieu de culture ou de la solution physiologique jusqu'à une concentration finale de 2-50 pour cent *V/V*, par exemple. Les CMSP ou les lignées de cellules monocytaires, placées dans du milieu de culture additionné du propre plasma du donneur ou de sérum AB, sont typiquement utilisées à une densité finale de 0,1-1,0 × $10^6$ cellules par puits, tube ou autre réceptacle. Dans le cas des lignées de cellules monocytaires, du sérum foetal bovin inactivé par chauffage peut remplacer le sérum AB. La culture cellulaire s'effectue à 37 ± 1 °C, sous une atmosphère adaptée au milieu de culture (par exemple de l'air humidifié à 5 pour cent de $CO_2$). La durée de culture doit être suffisante pour permettre l'accumulation du marqueur choisi. Les réponses obtenues pour le marqueur choisi, par exemple une cytokine pro-inflammatoire ou pyrogène, avec la solution de la préparation à examiner sont comparées aux réponses obtenues avec l'étalon d'endotoxine ou avec un lot de référence de la préparation à examiner. La méthode de lecture (marqueur) choisie est étalonnée au moyen d'un étalon approprié.

## 4. APPAREILLAGE

Dépyrogénez dans un four à air chaud, par une méthode validée, toute la verrerie et les autres éléments d'appareillage résistant à la chaleur. La durée et la température minimales de chauffage sont généralement de 30 min à 250 °C. Si du matériel en plastique est utilisé (par exemple des plaques de microtitrage ou des pointes de pipette pour distributeurs automatiques), l'absence de contamination détectable par des pyrogènes et l'absence d'interférence de ce matériel dans l'essai doivent être établies.

## 5. SOURCE DE CELLULES ET QUALIFICATION

### 5-1. *SANG TOTAL*

Le sang total provient de donneurs individuels ou de mélanges de dons qui sont respectivement qualifiés selon les exigences spécifiées dans les sections 5-3 et 5-4.

5-2. *CELLULES MONONUCLÉÉES DU SANG PÉRIPHÉRIQUE (CMSP)*

Les CMSP sont isolées à partir de sang provenant de donneurs individuels ou de mélanges de dons qui sont respectivement qualifiés selon les exigences spécifiées dans les sections 5-3 et 5-4.

5-3. *QUALIFICATION DES DONNEURS DE SANG*

Les donneurs de sang doivent satisfaire aux critères de qualification suivants, ainsi qu'à toute autre exigence en vigueur en matière de consentement, santé, sécurité et éthique. Les donneurs doivent déclarer être en bonne santé, n'être atteints d'aucune infection bactérienne ou virale, et n'avoir présenté aucun symptôme d'une telle infection depuis au moins 1 semaine avant le don de sang. Ils ne doivent pas avoir pris d'anti-inflammatoires non stéroïdiens dans les 48 h précédant le don de sang, ni d'anti-inflammatoires stéroïdiens dans les 7 jours précédant le don de sang. Les dons provenant d'individus sous prescription d'immunosuppresseurs ou autres médicaments ayant une influence connue sur la production du marqueur choisi sont à exclure. Les dons doivent faire l'objet de tests de dépistage de marqueurs infectieux, conformément aux exigences nationales en matière de médecine transfusionnelle.

5-4. *QUALIFICATION DES CELLULES PROVENANT DE MÉLANGES DE DONS*

Les mélanges de sang total, ou de fractions sanguines telles que les CMSP, doivent être constitués à partir de dons provenant d'au moins 4 donneurs, et de préférence au moins 8, en prenant dans chaque don un volume approximativement identique de sang, ou des cellules provenant d'un volume approximativement identique de sang. La qualification du mélange de cellules s'effectue comme suit : dans les 4 heures suivant la collecte de sang, établissez les courbes dose-réponse du mélange à l'aide de l'étalon d'endotoxine, en utilisant au moins 4 dilutions en progression géométrique couvrant par exemple un intervalle de concentration en endotoxines allant de 0,01 UI/mL à 4 UI/mL. Les courbes dose-réponse obtenues doivent satisfaire aux 2 critères de validité de la courbe d'étalonnage définis dans la section 6-1.

5-5. *QUALIFICATION DES CELLULES CRYOCONSERVÉES*

La source de cellules destinées à l'essai d'activation des monocytes (sang total humain, fractions sanguines de type CMSP ou lignées de cellules monocytaires, par exemple) peut être cryoconservée. Les mélanges de cellules cryoconservées sont préparés avant la congélation, ou immédiatement après la décongélation à partir des dons unitaires cryoconservés. Les mélanges doivent être constitués à partir de dons provenant d'au moins 4 donneurs, et de préférence d'au moins 8, en prenant dans chaque don un volume approximativement identique de sang ou des cellules provenant d'un volume approximativement identique de sang. La qualification du sang ou des cellules cryoconservés est effectuée immédiatement après la décongélation (et le cas échéant le mélange). Les courbes dose-réponse obtenues pour le sang ou les cellules cryoconservés doivent satisfaire aux 2 critères de validité de la courbe d'étalonnage définis dans la section 6-1.

5-6. *LIGNÉES DE CELLULES MONOCYTAIRES CONTINUES*

Une lignée de cellules monocytaires humaines est cultivée en continu de façon à assurer une production suffisante pour l'essai d'activation des monocytes. Pour optimiser la méthode, des clones dérivés de cette lignée de cellules peuvent être utilisés.

Les cellules doivent être maintenues dans des conditions aseptiques et être régulièrement soumises à des contrôles de détection de contaminations mycoplasmiques. Leur identité (temps de doublement, morphologie et fonction, par exemple) et leur stabilité doivent également être régulièrement vérifiées. La stabilité fonctionnelle de la lignée cellulaire doit être évaluée par suivi de ses performances en fonction du nombre de passages au cours des contrôles de routine. Des critères de stabilité fonctionnelle doivent être établis ; ces critères peuvent comprendre des indicateurs de croissance, le signal maximum obtenu lors de l'essai, le bruit de fond et l'expression des récepteurs. L'expression des récepteurs peut être testée avec des ligands spécifiques : lipopolysaccharide (LPS) pour TLR4 (*Toll-Like Receptor 4*), acide lipotéichoïque (LTA) pour TLR2, lipoprotéine bactérienne de synthèse pour TLR2-TLR1, ou lipoprotéine bactérienne de synthèse pour TLR2-TLR6 par exemple.

6. CONTRÔLES PRÉLIMINAIRES

Pour assurer la fidélité et la validité de l'essai, des contrôles préliminaires sont effectués afin de vérifier que les critères de validité de la courbe d'étalonnage sont satisfaits, que la solution n'interfère pas dans l'essai, que l'essai permet la détection des endotoxines et des contaminants non endotoxiniques, et que la solution n'interfère pas dans le système de détection.

6-1. *VÉRIFICATION DES CRITÈRES DE VALIDITÉ DE LA COURBE D'ÉTALONNAGE*

A partir de la solution étalon d'endotoxine, préparez au moins 4 solutions de concentrations différentes, pour établir la courbe d'étalonnage. Effectuez l'essai sur au moins 4 réplicats de chaque concentration d'étalon d'endotoxine.

La production de base du marqueur choisi (blanc), en l'absence d'addition d'étalon d'endotoxine, doit être optimisée de façon à être aussi faible que possible.

La courbe d'étalonnage doit satisfaire à 2 critères de validité :

- la régression des réponses (après transformation appropriée si nécessaire) en fonction du log dose doit être statistiquement significative ($p < 0,01$),
- la régression des réponses en fonction du log dose ne doit pas présenter d'écart de linéarité significatif ($p > 0,05$). Si une analyse est effectuée selon le modèle de courbe logistique à 4 paramètres, la courbe observée ne doit pas présenter d'écart significatif par rapport à la courbe théorique calculée par les méthodes statistiques habituelles (voir chapitre *5.3. Analyse statistique*).

6-2. *RECHERCHE DE FACTEURS D'INTERFÉRENCE*

Pour assurer la validité de l'essai, des contrôles préliminaires sont effectués afin de vérifier l'absence d'interférence de la solution à examiner dans l'essai. Une validation de la méthode d'essai est nécessaire chaque fois que des modifications susceptibles d'affecter le résultat de l'essai sont apportées aux conditions expérimentales. A partir de la préparation à examiner, préparez, avec un diluant approprié, des dilutions en progression géométrique ne dépassant pas la DMS. Préparez des dilutions identiques de la préparation à examiner en y ajoutant des endotoxines à concentration égale ou sensiblement égale au point médian de la courbe d'étalonnage (Méthode A) ou égale à 2 fois la LD (Méthode B), ou en utilisant un diluant contenant des endotoxines à concentration égale ou sensiblement égale au point médian de la courbe d'étalonnage (Méthode A) ou égale à 2 fois la LD (Méthode B). Examinez en parallèle ces séries de dilutions, dans le cadre de la même expérience. Utilisez la courbe d'étalonnage pour calculer la concentration de chaque solution en équivalent-endotoxine. Calculez le recouvrement moyen des endotoxines ajoutées en soustrayant (le cas échéant) la concentration moyenne en équivalent-endotoxine de la solution seule à celle obtenue pour la solution additionnée d'endotoxines. La solution à examiner est considérée comme exempte de facteurs d'interférence si, dans les conditions de l'essai, la concentration mesurée en équivalent-endotoxine pour la solution à examiner additionnée d'endotoxines est comprise entre 50 pour cent et 200 pour cent de la concentration ajoutée, après déduction de la concentration en équivalent-endotoxine éventuellement détectée dans la solution non additionnée d'endotoxines. Si ce critère n'est pas satisfait, la méthode C doit être utilisée de préférence aux méthodes A et B.

Dans la méthode C, 3 dilutions de la préparation à examiner sont soumises à l'essai : la plus forte concentration (plus faible dilution) induisant une stimulation maximale de la libération du marqueur choisi, et les 2 dilutions au 1/2 encadrant cette dilution. Comme la concentration qui induit la stimulation maximale de la libération du marqueur choisi peut varier d'un

donneur à l'autre, de même que d'un lot à l'autre, la validation (pour le produit considéré) doit être effectuée lors d'au moins 3 essais indépendants, utilisant chacun des cellules de donneurs différents. La plus forte concentration (plus faible dilution) qui induit une stimulation maximale de la libération du marqueur choisi chez la majorité des donneurs et les dilutions au 1/2 encadrant cette dilution, sont jugées validées pour la suite des essais. Si la stimulation maximale de la libération du marqueur choisi est obtenue avec la solution à examiner non diluée, il faut utiliser pour la suite des essais de la solution à examiner non diluée et des dilutions au 1/2 et au 1/4 de la solution à examiner avant son addition aux CMSP. Aucune des 3 dilutions utilisées dans la suite des essais ne doit dépasser la DMS ; les facteurs de dilution correspondants sont désignés $f_1$, $f_2$ et $f_3$. Une fois la validation effectuée pour le produit considéré, l'essai est conduit en routine avec des cellules provenant de 4 donneurs indépendants ou d'un seul mélange, ou encore avec des cellules provenant d'un même niveau de passage d'une lignée de cellules monocytaires humaines.

6-3. *VALIDATION DE LA MÉTHODE POUR DES CONTAMINANTS NON ENDOTOXINIQUES ACTIVATEURS DES MONOCYTES*

Les contrôles préliminaires doivent également démontrer la capacité du système d'essai choisi à détecter, outre les endotoxines bactériennes, les contaminants pyrogènes ou pro-inflammatoires non endotoxiniques. On peut pour ce faire recourir à des lots du produit qui se sont avérés, par le passé, contenir des contaminants non endotoxiniques ayant entraîné des réponses positives à l'essai des pyrogènes sur le lapin ou des réactions indésirables chez l'homme. Si l'on ne dispose pas de tels lots, les contrôles préliminaires doivent comprendre une validation du système d'essai à l'aide de ligands spécifiques des récepteurs TLR, par exemple des peptidoglycanes, des acides lipoteichoïques, ou des lipoprotéines bactériennes de synthèse.

6-4. *INTERFÉRENCE AVEC LE SYSTÈME DE DÉTECTION*

Une fois la dilution optimale de la préparation à examiner identifiée pour la suite des essais, cette dilution fait l'objet d'une recherche d'interférence avec le système de détection (ELISA par exemple) utilisé pour le marqueur choisi. Les résultats obtenus avec des séries de dilutions de l'étalon du marqueur choisi en la présence et en l'absence de la préparation à examiner ne doivent pas présenter d'écart supérieur à ± 20 pour cent.

## 7. MÉTHODES

7-1. *MÉTHODE A : ESSAI QUANTITATIF*

La méthode A repose sur la comparaison de la préparation à examiner avec la courbe dose-réponse obtenue avec l'étalon d'endotoxine. La préparation à examiner satisfait à l'essai si sa concentration en contaminants est inférieure à la CLC.

7-1-1. **Mode opératoire**

En opérant selon la méthode validée, préparez les solutions décrites dans le tableau 2.6.30.-1 et placez en culture 4 réplicats de chaque solution avec des cellules provenant de 4 donneurs différents ou d'un seul mélange de dons, ou avec des cellules provenant d'un même niveau de passage d'une lignée de cellules monocytaires humaines.

Solution A = solution de la préparation à examiner à la dilution $f$ à laquelle a été effectuée la recherche des facteurs d'interférence, c'est à dire la plus forte concentration (plus faible dilution) à laquelle est obtenu un recouvrement des endotoxines de 50-200 pour cent.

Solution B = dilution au 1/2 de la solution A, ne dépassant pas la DMS.

Solution C = dilution au 1/2 de la solution B, ne dépassant pas la DMS.

Solution D = solution A additionnée d'étalon d'endotoxine à concentration égale à la dose médiane de la courbe d'étalonnage ($R_3$).

Solution $R_0$ = témoin négatif.

Solutions $R_1$-$R_4$ = solutions d'étalon d'endotoxine aux concentrations utilisées dans la recherche des facteurs d'interférence.

Tableau 2.6.30.-1

| Solution | Solution | Endotoxines ajoutées (UI/mL) | Nombre de réplicats |
|---|---|---|---|
| A | Solution à examiner/$f$ | Néant | 4 |
| B | Solution à examiner/$2 \times f$ | Néant | 4 |
| C | Solution à examiner/$4 \times f$ | Néant | 4 |
| D | Solution à examiner/$f$ | Dose médiane de la courbe d'étalonnage ($R_3$) | 4 |
| $R_0$ | Sérum physiologique ou diluant apyrogène | Néant (témoin négatif) | 4 |
| $R_1$-$R_4$ | Sérum physiologique ou diluant apyrogène | 4 concentrations de l'étalon d'endotoxine | 4 pour chaque concentration |

7-1-2. **Calcul et interprétation**

Toutes les données prises en compte dans l'analyse doivent se rapporter à des cellules pour lesquelles les 2 critères de validité de la courbe d'étalonnage sont satisfaits. Le recouvrement, en équivalent-endotoxine, calculé à partir de la concentration en équivalent-endotoxine obtenue pour la solution D, après déduction de la concentration en équivalent-endotoxine obtenue pour la solution A, est compris entre 50 pour cent et 200 pour cent. Pour chaque source cellulaire différente (don individuel, mélange de dons ou lignée cellulaire par exemple), utilisez la courbe d'étalonnage établie avec les solutions $R_1$-$R_4$ pour calculer la concentration en équivalent-endotoxine de chaque réplicat des solutions A, B et C. La préparation à examiner satisfait à l'essai, pour une source cellulaire donnée, si les concentrations moyennes en équivalent-endotoxine mesurées pour les réplicats des solutions A, B et C, après correction de dilution et concentration, sont toutes inférieures à la CLC spécifiée pour la préparation à examiner.

7-1-3. **Critères de conformité/non conformité de la préparation**

Lorsque l'on utilise des cellules provenant de donneurs individuels, la préparation à examiner doit satisfaire à l'essai pour les cellules de chacun des 4 donneurs. Si la préparation à examiner satisfait à l'essai pour les cellules de 3 des 4 donneurs (1 donneur est exclu pour non conformité aux critères de validité ou pour réaction positive), répétez l'essai avec les cellules de 4 autres donneurs, dont aucun n'a fourni de cellules pour le 1er essai ; la préparation à examiner doit alors satisfaire à l'essai pour les cellules de 7 des 8 donneurs (soit au maximum 1 réaction positive autorisée sur les 8). Lorsque la source de monocytes est constituée d'un mélange de cellules provenant de plusieurs donneurs différents, la préparation à examiner doit satisfaire à l'essai pour 1 mélange de cellules. Lorsque l'on effectue l'essai avec une lignée de cellules monocytaires humaines, la préparation à examiner doit satisfaire à l'essai pour un même niveau de passage de la lignée cellulaire.

7-2. *MÉTHODE B : ESSAI SEMI-QUANTITATIF*

La méthode B repose sur la comparaison de la préparation à examiner avec l'étalon d'endotoxine. La préparation à examiner satisfait à l'essai si sa concentration en contaminants est inférieure à la CLC. Sauf exception justifiée et autorisée, il convient de choisir la solution A pour la décision de libération.

7-2-1. **Mode opératoire**

En opérant selon la méthode validée, préparez les solutions décrites dans le tableau 2.6.30.-2 et placez en culture 4 réplicats de chaque solution avec des cellules provenant de 4 donneurs différents ou d'un seul mélange de dons, ou avec des cellules provenant d'un même niveau de passage d'une lignée de cellules monocytaires humaines.

Tableau 2.6.30.-2

| Solution | Solution | Endotoxines ajoutées (UI/mL) | Nombre de réplicats |
|---|---|---|---|
| A | Solution à examiner/$f$ | Néant | 4 |
| B | Solution à examiner/$f_1$ | Néant | 4 |
| C | Solution à examiner/$f_2$ | Néant | 4 |
| D | Solution à examiner/$f$ | Etalon d'endotoxine à 2 × LD du système d'essai | 4 |
| E | Solution à examiner/$f_1$ | Etalon d'endotoxine à 2 × LD du système d'essai | 4 |
| F | Solution à examiner/$f_2$ | Etalon d'endotoxine à 2 × LD du système d'essai | 4 |
| $R_0$ | Sérum physiologique ou diluant apyrogène | Néant (témoin négatif) | 4 |
| $R_1$ | Sérum physiologique ou diluant apyrogène | Etalon d'endotoxine à 0,5 × LD du système d'essai | 4 |
| $R_2$ | Sérum physiologique ou diluant apyrogène | Etalon d'endotoxine à 1 × LD du système d'essai | 4 |
| $R_3$ | Sérum physiologique ou diluant apyrogène | Etalon d'endotoxine à 2 × LD du système d'essai | 4 |
| $R_4$ | Sérum physiologique ou diluant apyrogène | Etalon d'endotoxine à 4 × LD du système d'essai | 4 |

Solution A = solution de la préparation à examiner à la dilution $f$ à laquelle a été effectuée la recherche des facteurs d'interférence.

Solution B = solution de la préparation à examiner à la dilution $f_1$, ne dépassant pas la DMS, choisie au vu des données de validation pour le produit considéré, par exemple 1/2 × DMS (soit dilution au 1/2 au-dessus de la DMS).

Solution C = solution de la préparation à examiner à la dilution $f_2$, ne dépassant pas la DMS, choisie au vu des données de validation pour le produit considéré, par exemple DMS.

Solution D = solution A additionnée d'étalon d'endotoxine à concentration de 2 × LD du système d'essai (comme déterminée dans les contrôles préliminaires).

Solution E = solution B additionnée d'étalon d'endotoxine à concentration de 2 × LD du système d'essai.

Solution F = solution C additionnée d'étalon d'endotoxine à concentration de 2 × LD du système d'essai.

Solution $R_0$ = témoin négatif.

Solution $R_1$ = étalon d'endotoxine à 0,5 × LD du système d'essai.

Solution $R_2$ = étalon d'endotoxine à 1 × LD du système d'essai.

Solution $R_3$ = étalon d'endotoxine à 2 × LD du système d'essai.

Solution $R_4$ = étalon d'endotoxine à 4 × LD du système d'essai.

7-2-2. **Calcul et interprétation**

Toutes les données prises en compte dans l'analyse doivent se rapporter à des cellules pour lesquelles les réponses moyennes aux solutions $R_0$ - $R_4$ augmentent progressivement. La réponse moyenne à la solution $R_0$ peut être égale à la réponse moyenne à la solution $R_1$. Pour chaque source cellulaire différente (don individuel, mélange de dons, lignée cellulaire par exemple), la réponse moyenne à la solution $R_2$ doit être supérieure à un seuil positif. Les données se situant au-dessous de cette valeur seuil sont considérées comme négatives. Si la réponse moyenne à la solution $R_1$ ou $R_2$ dépasse la valeur seuil, la réponse à la solution désignée pour la décision de conformité/non conformité doit être négative (= conforme). Pour chaque solution négative de la préparation à examiner (A, B et C), la réponse moyenne à la solution surchargée correspondante (D, E ou F respectivement) est comparée à la réponse moyenne à la solution $R_3$, afin de déterminer le pourcentage de recouvrement des endotoxines ajoutées. La concentration en contaminant de la préparation à examiner est inférieure à la CLC pour une source cellulaire donnée si la solution de la préparation à examiner désignée pour la décision de conformité/non conformité et les dilutions inférieures donnent toutes des résultats négatifs et un taux de recouvrement des endotoxines ajoutées compris entre 50 pour cent et 200 pour cent.

7-2-3. **Critères de conformité/non conformité de la préparation**

Les critères sont les mêmes que pour la méthode A (voir section 7-1-3).

7-3. *MÉTHODE C : ESSAI DE COMPARAISON À UN LOT DE RÉFÉRENCE*

La méthode C repose sur la comparaison de la préparation à examiner avec un lot de référence validé de cette préparation. Ce lot de référence est choisi selon des critères justifiés et autorisés. Cette méthode est destinée à être réalisée lorsque la préparation à examiner présente une interférence marquée qui n'est pas levée par la dilution jusqu'à la DMS, parce qu'elle contient ou est suspectée de contenir des contaminants non endotoxiniques. La décroissance de réponse accompagnant la dilution peut être plus rapide pour les contaminants non endotoxiniques que pour les endotoxines, d'où la nécessité d'effectuer l'essai sur un intervalle de dilutions incluant la dilution minimum. Le mode opératoire décrit ci-après comprend un exemple de comparaison d'un lot à examiner avec un lot de référence.

7-3-1. **Mode opératoire**

En opérant selon la méthode validée, préparez les solutions décrites dans le tableau 2.6.30.-3 et placez en culture 4 réplicats de chaque solution avec des cellules provenant de 4 donneurs différents ou d'un seul mélange de dons, ou avec des cellules provenant d'un même niveau de passage d'une lignée de cellules monocytaires humaines.

Tableau 2.6.30.-3

| Solution | Solution / facteur de dilution | Nombre de réplicats |
|---|---|---|
| A | Solution du lot de référence/$f_1$ | 4 |
| B | Solution du lot de référence/$f_2$ | 4 |
| C | Solution du lot de référence/$f_3$ | 4 |
| D | Solution de la préparation à examiner/$f_1$ | 4 |
| E | Solution de la préparation à examiner/$f_2$ | 4 |
| F | Solution de la préparation à examiner/$f_3$ | 4 |
| G | Témoin positif (étalon d'endotoxine) | 4 |
| $R_0$ | Diluant (témoin négatif) | 4 |

Les solutions A, B et C sont des dilutions du lot de référence affectées des facteurs de dilution $f_1$, $f_2$ et $f_3$, déterminés lors de la recherche des facteurs d'interférence.

Les solutions D, E et F sont des dilutions de la préparation à examiner affectées des facteurs de dilution $f_1$, $f_2$ et $f_3$, déterminés pour le lot de référence lors de la recherche des facteurs d'interférence.

La solution G sert de témoin positif de viabilité des cellules ; elle contient l'étalon d'endotoxine à une concentration donnant une réponse positive claire.

La solution $R_0$ sert de blanc ; elle est constituée du diluant utilisé pour préparer les dilutions de la préparation à examiner.

7-3-2. **Calcul et interprétation**

Toutes les données prises en compte dans l'analyse doivent se rapporter à des cellules pour lesquelles la solution G et au moins l'une des solutions A, B et C donnent une réponse supérieure à la libération de base du marqueur (solution $R_0$). Pour chaque source cellulaire différente (don individuel, mélange de dons, lignée cellulaire par exemple), utilisez la courbe d'étalonnage établie pour le marqueur (courbe d'étalonnage établie en double avec un blanc et au moins 4 dilutions en progression géométrique de l'étalon correspondant au marqueur choisi) et calculez les réponses moyennes aux réplicats des solutions A-F. Calculez la somme des réponses moyennes aux solutions A, B et C et la somme des réponses moyennes aux solutions D, E et F. Divisez la somme des réponses moyennes aux solutions D, E et F par la somme des réponses moyennes aux solutions A, B et C. La préparation à examiner satisfait à l'essai, pour une source cellulaire donnée, si la valeur obtenue est conforme à un critère d'acceptation défini ne dépassant pas 2,5.

7-3-3. **Critères de conformité/non conformité de la préparation**

Les critères sont les mêmes que pour la méthode A (voir section 7-1-3).

Pour quantifier plus étroitement le niveau de contamination, on peut utiliser les méthodes A, B et C avec d'autres dilutions de la solution ne dépassant pas la DMS, de la préparation à examiner.

*La section suivante est publiée à titre d'information.*

## Recommandations pour la réalisation de l'essai

### 1. INTRODUCTION

L'essai d'activation des monocytes (MAT) est destiné en premier lieu à remplacer l'essai des pyrogènes sur le lapin. Il permet la détection de contaminants pyrogènes et pro-inflammatoires, qui peuvent être des endotoxines produites par des bactéries gram-négatives ou des contaminants non endotoxiniques, et notamment des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP pour *pathogen-associated molecular patterns*) issus de bactéries gram-positives, de bactéries gram-négatives, de virus ou de champignons, et des entités biologiques ou chimiques associées au produit ou au procédé de production.

Comme les contaminants non endotoxiniques constituent une classe de molécules hétérogène du point de vue physicochimique et que, par ailleurs, la nature du contaminant contenu dans la préparation à examiner est en général inconnue, le niveau de contamination est déterminé soit par comparaison aux réponses obtenues avec un étalon d'endotoxine, et exprimé en équivalent-endotoxine, soit par comparaison à un lot de référence de la préparation à examiner.

Dans le MAT, les réponses à l'étalon d'endotoxine disparaissent généralement sur un intervalle de dilution d'environ 1 log et les réponses obtenues vis-à-vis de produits contaminés par des contaminants non endotoxiniques (seuls ou associés à des endotoxines) suivent souvent, lorsqu'est testée leur capacité à stimuler les monocytes, des courbes dose-réponse à très forte pente, généralement sur l'intervalle d'1 ou 2 étapes de dilution seulement. Il est fréquent que la réponse maximale à des produits ainsi contaminés soit obtenue avec des solutions non diluées, ou faiblement diluées, des préparations à examiner. Pour cette raison, il est nécessaire, lorsque l'on examine une préparation qui contient ou est susceptible de contenir des contaminants non endotoxiniques, de faire figurer la dilution minimale dans la gamme des dilutions qui seront examinées.

### 2. MÉTHODES

2-1. *CHOIX DE LA MÉTHODE*

Les méthodes A, B et C ne sont normalement pas utilisées lorsque la préparation à examiner possède la capacité intrinsèque de stimuler la libération du marqueur choisi pour la lecture, ou présente une contamination par ce marqueur. Dans l'un ou l'autre cas, il convient de prendre les mesures nécessaires pour répondre à la situation, en modifiant et validant en conséquence la méthode choisie. La validation de la méthode choisie, spécifiquement effectuée pour le produit, doit normalement permettre de déterminer la fréquence des non réponses à une combinaison produit/contaminant(s) particulière, et d'identifier les mesures à prendre pour pallier à ce problème, par exemple par le criblage des donneurs, par un accroissement du nombre de donneurs par essai, et par la définition de critères de conformité/non conformité de sévérité appropriée pour maximiser la probabilité de détecter les lots contaminés. Les méthodes A et B sont toutes deux applicables lorsque les courbes dose-réponse obtenues avec les dilutions de la préparation à examiner et avec les dilutions de l'étalon d'endotoxine sont sensiblement parallèles. La méthode B, qui est semi-quantitative, peut également être utilisée lorsque la courbe dose-réponse mesurée avec les dilutions de la préparation à examiner n'est pas parallèle à celle des dilutions de l'étalon d'endotoxine.

La méthode C, essai de comparaison à un lot de référence, a été développée pour les cas où se manifeste une extrême variabilité liée aux donneurs dans les réponses à certaines combinaisons produit/contaminant(s). Il est à noter, à cet égard, que si les monocytes de la plupart des donneurs répondent de manière globalement similaire aux endotoxines bactériennes, leur réponse aux contaminants non endotoxiniques peut en revanche sensiblement différer d'un donneur à l'autre, au point qu'il est possible d'identifier des non réponses à certaines combinaisons produit/contaminant(s).

2-2. *CALCUL DE LA CONCENTRATION LIMITE EN CONTAMINANTS*

Le critère d'acceptation, pour une décision de conformité/non conformité, est la concentration limite en contaminants (CLC), qui est exprimée en équivalent-endotoxine par milligramme, millilitre ou unité d'activité biologique de la préparation à examiner. Lorsqu'une concentration limite en endotoxines (CLE) a été spécifiée pour un produit, la CLC prend la même valeur, sauf indication contraire. La CLC est exprimée en équivalent-endotoxine. Elle est calculée à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{K}{M}$$

$K$ = dose seuil d'endotoxines ayant un effet pyrogène, par kilogramme de masse corporelle,

$M$ = dose maximale recommandée pour le produit, en bolus, par kilogramme de masse corporelle.

Lorsque le produit doit être administré par injections rapprochées ou en perfusion continue, $M$ est la dose maximale totale par heure.

La limite en endotoxines est fonction du produit et de sa voie d'administration. Elle est indiquée dans les monographies.

Les valeurs de $K$ sont proposées dans le tableau 2.6.30.-4.

Tableau 2.6.30.-4

| Voie d'administration | ***K* (UI d'endotoxines par kilogramme de masse corporelle)** |
|---|---|
| Intraveineuse | 5,0 |
| Intraveineuse pour produits radiopharmaceutiques | 2,5 |
| Intrarachidienne | 0,2 |

Pour les autres voies, le critère d'acceptation pour la teneur en endotoxines bactériennes est généralement établi à partir des résultats obtenus durant le développement de la préparation.

2-3. *CRYOPROTECTEURS*

L'influence sur les cellules décongelées des cryoprotecteurs tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO) et de leurs résidus est à prendre en considération : le DMSO est toxique pour les cellules en culture et il est possible, même après un lavage soigneux des cellules, que la cryoconservation en ait altéré les propriétés, par exemple la perméabilité membranaire.

2-4. *RECHERCHE DES FACTEURS D'INTERFÉRENCE*

Lorsque cela est réalisable, la recherche de facteurs d'interférence est effectuée sur au moins 3 lots différents de la préparation à examiner. Dans le cas des préparations caractérisées par une importante variabilité inter-lots, qui rend de ce fait chaque lot unique pour les besoins de la recherche d'interférences, cette recherche est à effectuer dans le cadre de chaque essai individuel, c'est-à-dire de la validation concomitante.

Le contrôle d'interférence est de préférence réalisé sur des lots de la préparation à examiner qui sont exempts d'endotoxines et autres contaminants pyrogènes/pro-inflammatoires ou, dans les cas où cette condition n'est pas réalisable, sur des lots dont aucun n'est fortement contaminé. Si l'on ne dispose que d'1 seul lot, la validation est effectuée sur ce lot dans le cadre de 3 essais indépendants. Des paramètres de fidélité concernant la reproductibilité, par exemple ± 50 pour cent, doivent être satisfaits.

3. REMPLACEMENT DE L'ESSAI DES PYROGÈNES SUR LE LAPIN PAR L'ESSAI D'ACTIVATION DES MONOCYTES

Comme indiqué plus haut, le MAT est en premier lieu destiné à servir d'alternative à l'essai des pyrogènes sur le lapin. Les monographies de produits pharmaceutiques pour administration parentérale et qui sont susceptibles de contenir des contaminants pyrogènes spécifient soit un essai des endotoxines bactériennes soit un essai d'activation des monocytes.

En règle générale :

- si la présence d'1 essai dans une monographie est requise, 1 seul essai doit y être prescrit (endotoxines bactériennes ou MAT) ; avant d'introduire un MAT dans une monographie, il faut apporter la démonstration que l'1 des 3 méthodes décrites dans ce chapitre peut être appliquée, avec des résultats satisfaisants, au produit en question,
- les informations nécessaires sont recherchées auprès des fabricants. Les firmes sont invitées à fournir les données de validation dont elles disposent concernant l'applicabilité du MAT aux substances et formulations considérées. Ces données comprennent la description du mode de préparation des échantillons et des procédures éventuellement nécessaires pour éliminer les facteurs d'interférence. Il leur est également demandé de fournir toutes données parallèles en leur possession sur l'essai des pyrogènes sur le lapin, qui pourraient contribuer à apporter l'assurance que le remplacement de l'essai des pyrogènes sur le lapin par l'essai d'activation des monocytes est approprié.

4. VALIDATION DES MÉTHODES ALTERNATIVES

Le remplacement de l'essai des pyrogènes sur le lapin par le MAT, ou le remplacement d'une méthode prescrite pour la détection de contaminants pro-inflammatoires/pyrogènes par une autre méthode, est à considérer comme un cas de remplacement d'un essai de pharmacopée par une méthode alternative, sous les conditions décrites dans les Prescriptions générales :

"Les essais et dosages décrits sont les méthodes officielles à partir desquelles sont établies les normes de la Pharmacopée Européenne. D'autres méthodes d'analyse peuvent être utilisées à des fins de contrôle avec l'accord de l'Autorité compétente, à condition que les méthodes permettent de juger, sans équivoque, que les normes des monographies seraient satisfaites si les méthodes officielles étaient appliquées. En cas de doute ou de litige, seules font autorité les méthodes d'analyse de la Pharmacopée Européenne."

Pour valider une autre méthode de MAT que celle spécifiée dans la monographie, il est proposé d'appliquer les procédures suivantes :

- validation de la méthode d'essai et des matériels et réactifs utilisés, comme décrit pour l'essai concerné,
- mise en évidence des facteurs d'interférence éventuels (et, si nécessaire, essai du procédé d'élimination employé) sur des échantillons provenant d'au moins 3 lots de fabrication.

Il convient d'appliquer le MAT à tout produit nouveau, destiné à l'administration parentérale, devant faire l'objet d'un essai d'activation des monocytes selon les prescriptions la Pharmacopée Européenne.

**04/2010:20631**

## 2.6.31. CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE DES MÉDICAMENTS À BASE DE PLANTES POUR USAGE ORAL

**Dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT)**. Effectuez le dénombrement comme décrit dans le chapitre *2.6.12*.

**Dénombrement des moisissures/levures totales (DLMT)**. Effectuez le dénombrement comme décrit dans le chapitre *2.6.12*. En raison de la charge bactérienne naturellement élevée des produits relevant du chapitre *5.1.8*, le milieu généralement utilisé est le milieu Sabouraud dextrosé-gélosé contenant des antibiotiques.

MICROORGANISMES SPÉCIFIÉS

*ESCHERICHIA COLI*

**Essai de présence/absence**

*Préparation de l'échantillon et pré-incubation*. Préparez un échantillon comme décrit dans le chapitre *2.6.12* en utilisant une dilution au 1/10 d'au moins 1 g du produit à examiner et ensemencez une quantité appropriée (déterminée comme indiqué dans la section 3-4 du chapitre *2.6.13*) de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja avec 10 mL d'échantillon ou la quantité correspondant à 1 g ou 1 mL de produit. Mélangez, puis incubez à 30-35 °C pendant 18-24 h.

*Sélection et subculture*. Agitez le récipient, puis transférez 1 mL du milieu liquide aux peptones de caséine et de soja dans 100 mL de milieu liquide de MacConkey et incubez à 42-44 °C pendant 24-48 h. Repiquez sur du milieu gélosé de MacConkey et incubez à 30-35 °C pendant 18-72 h.

*Interprétation*. La croissance de colonies indique la présence possible d'*E. coli*, à confirmer par des essais d'identification.

Le produit satisfait à l'essai si l'on n'observe la présence d'aucune colonie ou si les essais de confirmation de l'identification sont négatifs.

**Essai de dénombrement**. Dénombrement semi-quantitatif (nombre probable).

*Préparation de l'échantillon et pré-incubation*. Préparez un échantillon comme décrit dans le chapitre *2.6.12* en utilisant une dilution au 1/10 d'au moins 1 g du produit à examiner et ensemencez une quantité appropriée (déterminée comme indiqué dans la section 3-4 du chapitre *2.6.13*) de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja avec des quantités d'échantillon correspondant respectivement à 0,1 g, 0,01 g et 0,001 g (ou 0,1 mL, 0,01 mL et 0,001 mL) de produit. Mélangez, puis incubez à 30-35 °C pendant 18-24 h.

*Sélection et subculture*. Agitez le récipient, puis transférez 1 mL de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja dans 100 mL de milieu liquide de MacConkey et incubez à 42-44 °C pendant 24-48 h. Repiquez sur du milieu gélosé de MacConkey et incubez à 30-35 °C pendant 18-72 h.

*Interprétation.* La croissance de colonies indique la présence possible d'*E. coli,* à confirmer par des essais d'identification.

Notez la plus petite quantité de produit qui donne un résultat positif et la plus grande quantité de produit qui donne un résultat négatif.

Déterminez le nombre probable de bactéries à l'aide du tableau suivant.

| **Résultats obtenus avec une quantité de produit de** | | | **Nombre probable de bactéries par gramme ou millilitre de produit** |
|---|---|---|---|
| **0,1 g ou 0,1 mL** | **0,01 g ou 0,01 mL** | **0,001 g ou 0,001 mL** | |
| + | + | + | $> 10^3$ |
| + | + | - | $< 10^3$ et $> 10^2$ |
| + | - | - | $< 10^2$ et $> 10$ |
| - | - | - | < 10 |

*BACTÉRIES GRAM-NÉGATIVES RÉSISTANTES AUX SELS BILIAIRES*

**Essai de dénombrement**. Dénombrement semi-quantitatif (nombre probable).

*Préparation de l'échantillon et pré-incubation.* Préparez un échantillon comme décrit dans le chapitre *2.6.12* en utilisant une dilution au 1/10 d'au moins 1 g du produit à examiner, mais avec comme diluant du milieu liquide aux peptones de caséine et de soja. Mélangez, puis incubez à 20-25 °C pendant un temps suffisant pour assurer la revivification des bactéries, mais insuffisant pour permettre leur multiplication (2-3 h).

*Sélection et subculture.* Ensemencez des quantités appropriées de milieu d'enrichissement pour les entérobactéries Mossel avec la préparation décrite ci-dessus et/ou, selon la limite appliquée au produit particulier considéré, avec 3 des 4 dilutions de la préparation qui contiennent respectivement 0,1 g, 0,01 g, 0,001 g et 0,0001 g (ou 0,1 mL, 0,01 mL, 0,001 mL et 0,0001 mL) du produit à examiner. Incubez à 30-35 °C pendant 24-48 h. Repiquez chacune des cultures sur du milieu gélosé à la bile-violet-rouge avec glucose. Incubez à 30-35 °C pendant 18-24 h.

*Interprétation.* La croissance de colonies constitue un résultat positif. Notez la plus petite quantité de produit qui donne un résultat positif et la plus grande quantité de produit qui donne un résultat négatif.

Déterminez le nombre probable de bactéries à l'aide du tableau suivant.

| **Résultats obtenus avec une quantité de produit de** | | | | **Nombre probable de bactéries par gramme ou millilitre de produit** |
|---|---|---|---|---|
| **0,1 g ou 0,1 mL** | **0,01 g ou 0,01 mL** | **0,001 g ou 0,001 mL** | **0,0001 g ou 0,0001 mL** | |
| + | + | + | + | $> 10^4$ |
| + | + | + | - | $< 10^4$ et $> 10^3$ |
| + | + | - | - | $< 10^3$ et $> 10^2$ |
| + | - | - | - | $< 10^2$ et $> 10$ |
| - | - | - | - | < 10 |

*SALMONELLES*

**Essai de présence/absence**

*Préparation de l'échantillon et pré-incubation.* Préparez le produit à examiner comme décrit dans le chapitre *2.6.12* et ensemencez 225 mL de milieu peptoné tamponné avec une quantité d'échantillon correspondant à au moins 25 g ou 25 mL de produit. Mélangez (par exemple homogénéisez dans un sac filtre pour broyeur, type Stomacher), puis incubez à 30-35 °C pendant 18-24 h.

**Milieu peptoné tamponné**

| | |
|---|---|
| Phosphate monopotassique | 1,5 g |
| Phosphate disodique dodécahydraté | 9,0 g |
| Chlorure de sodium | 5,0 g |
| Peptone | 10,0 g |
| Eau purifiée | 1000 mL |

Ajustez le pH pour qu'il soit de 7,0 ± 0,2 à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

*Sélection et subculture.* Transférez 0,1 mL du milieu peptoné tamponné dans 10 mL de milieu liquide d'enrichissement pour les salmonelles Rappaport-Vassiliadis et incubez à 30-35 °C pendant 18-24 h. Repiquez sur du milieu gélosé xylose-lysine-désoxycholate et incubez à 30-35 °C pendant 18-48 h.

*Interprétation.* La croissance de colonies rouges bien développées, avec ou sans centre noir, indique la présence possible de salmonelles, à confirmer par des essais d'identification.

Le produit satisfait à l'essai si l'on n'observe la présence d'aucune colonie du type décrit ou si les essais de confirmation de l'identification sont négatifs.

Les solutions et milieux de culture recommandés sont décrits dans le chapitre *2.6.13.*

# 2.7. TITRAGES BIOLOGIQUES

2. Méthodes analytiques

# 2.7. TITRAGES BIOLOGIQUES

**01/2008:20701**

## 2.7.1. MÉTHODES IMMUNOCHIMIQUES

Les méthodes immunochimiques reposent sur une liaison sélective, réversible et non covalente entre des antigènes et des anticorps. Elles sont utilisées pour détecter ou doser soit des antigènes, soit des anticorps. La détection ou le dosage du complexe antigène-anticorps peuvent être effectués par plusieurs techniques. Les directives de cette méthode générale s'appliquent aux méthodes immunochimiques utilisant, selon le cas, des réactifs marqués ou non.

Les résultats des méthodes immunochimiques dépendent des conditions expérimentales, de la nature et de la qualité des réactifs utilisés. Il est essentiel d'étalonner les composants d'un immunodosage et d'utiliser les Préparations Internationales de Référence pour Immunodosage, lorsqu'elles sont disponibles.

Les réactifs nécessaires à beaucoup de méthodes immunochimiques sont disponibles dans le commerce sous forme de « trousses », c'est-à-dire un ensemble comprenant les réactifs (notamment l'antigène ou l'anticorps) et les matériaux destinés à l'estimation *in vitro* d'une substance déterminée, ainsi que les instructions nécessaires à un emploi correct. Les trousses sont utilisées conformément aux instructions du fabricant ; il est important de s'assurer qu'elles sont appropriées à l'analyse de la substance à examiner, notamment en ce qui concerne la sélectivité et la sensibilité. Des directives relatives aux trousses pour immunodosage sont données par l'Organisation Mondiale de la Santé, Série des Rapports techniques 658 (1981).

### MÉTHODES UTILISANT UN ANTIGÈNE MARQUÉ OU UN ANTICORPS MARQUÉ

Les méthodes utilisant des substances marquées peuvent employer des marqueurs appropriés tels que : enzymes, fluorophores, luminophores et radioisotopes. Lorsque le marqueur est un radioisotope, la technique est appelée « dosage radioimmunologique ». Les recommandations relatives à la mesure de la radioactivité données dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)* s'appliquent aux méthodes immunochimiques impliquant des radioisotopes. Tous les travaux faisant appel à des matières radioactives sont effectués en conformité avec la législation nationale et les règles de bonne pratique internationalement acceptées pour la protection contre les risques de rayonnement.

### MÉTHODES UTILISANT UN ANTIGÈNE NON MARQUÉ OU UN ANTICORPS NON MARQUÉ

#### Méthodes d'immunoprécipitation

Les méthodes d'immunoprécipitation comprennent des réactions de floculation et de précipitation. Lorsqu'on mélange une solution d'antigène et son anticorps correspondant, dans des conditions appropriées, les réactifs forment des agrégats floculants ou précipitants. Le rapport entre les quantités de réactifs correspondant à la durée de floculation la plus courte ou à la précipitation la plus marquée est appelé rapport optimal ; celui-ci est généralement obtenu en présence de quantités équivalentes d'antigène et d'anticorps. L'immunoprécipitation peut être appréciée visuellement ou par mesure de la dispersion de la lumière (dosage néphélométrique ou turbidimétrique). Une augmentation de la sensibilité peut être obtenue en utilisant des particules recouvertes d'anticorps ou d'antigène (par exemple le latex).

Dans les méthodes de floculation, ce sont essentiellement des dilutions progressives de l'un des réactifs qui sont utilisées, alors que dans les méthodes d'immunodiffusion (ID), la dilution est obtenue par diffusion dans un gel. Dans les méthodes ID, un gradient de concentration de l'un ou des 2 réactifs est établi de façon à créer dans le gel des zones dans lesquelles les proportions des réactifs favorisent la précipitation. Alors que les méthodes de floculation sont réalisées dans des tubes à essai, les méthodes ID peuvent s'effectuer en faisant appel à différents supports : éprouvettes, plaques, lames, cuves ou réservoirs.

L'immunoprécipitation est dite *simple* lorsqu'elle ne comporte qu'un seul antigène associé à l'anticorps correspondant ; elle est dite *complexe* lorsqu'elle fait usage de réactifs sérologiquement apparentés et *multiple* lorsqu'elle comporte plusieurs réactifs sérologiquement non apparentés.

Dans les *méthodes de diffusion simple*, un gradient de concentration de l'un des réactifs diffusant à partir d'une source extérieure est établi dans le gel contenant le réactif correspondant, à une concentration relativement faible.

*L'immunodiffusion radiale simple* (IDRS) est une technique quantitative simple d'immunodiffusion. A l'équilibre entre le réactif interne et le réactif externe, la surface de la zone circulaire de précipitation partant du site du réactif externe est directement proportionnelle à la concentration de l'antigène dans le gel et est inversement proportionnelle à la concentration de l'anticorps dans le gel.

Dans *les méthodes de diffusion double*, des gradients de concentration sont établis pour les 2 réactifs. L'antigène et l'anticorps diffusent tous 2 à partir de sites séparés dans un gel initialement neutre du point de vue immunologique.

Les *méthodes comparatives d'immunodiffusion double* sont utilisées pour comparer qualitativement divers antigènes par rapport à un anticorps approprié ou vice-versa. La comparaison est fondée sur la présence ou l'absence d'interaction des lignes de précipitation. Il est possible de distinguer des réactions d'identité, de non identité ou d'identité partielle des anticorps/antigènes.

#### Méthodes d'immunoélectrophorèse

L'immunoélectrophorèse (IE) est une technique qualitative associant 2 méthodes : l'électrophorèse sur gel suivie de l'immunodiffusion.

*L'immunoélectrophorèse croisée* est une modification de la méthode IE, adaptée à l'analyse qualitative et à l'analyse quantitative. Dans un premier temps, une électrophorèse classique sur gel est réalisée. La bande de gel contenant les fractions à analyser qui ont été séparées lors de cette électrophorèse est ensuite découpée, puis transférée sur une autre plaque. Cette nouvelle plaque est alors soumise à une seconde électrophorèse dans une direction perpendiculaire à la bande prélevée, en utilisant un gel contenant des teneurs relativement faibles en anticorps correspondant aux antigènes. Pour une concentration en anticorps et une épaisseur de gel données, le rapport entre la surface de chacun des pics de précipitation et la quantité de l'antigène correspondant est linéaire.

L'*électroimmunodosage*, souvent intitulé *immunoélectrophorèse fusiforme* est une méthode rapide pour doser les antigènes dont la charge diffère de celle des anticorps et vice-versa. L'électrophorèse de l'antigène à doser est réalisée dans un gel contenant l'anticorps correspondant à une concentration relativement plus faible. La substance à examiner et les dilutions d'un antigène utilisé pour l'étalonnage sont placées dans différentes cupules du gel. Pendant l'électrophorèse, il se forme des zones de précipitation fusiformes migrant à partir des cupules. Lorsque l'antigène n'est plus en excès, le front du précipité devient stationnaire. Pour une concentration donnée en anticorps, le rapport entre la distance parcourue par le front de précipitation et la quantité d'antigène déposée est linéaire.

L'*immunoélectrophorèse inversée* est une méthode quantitative rapide permettant d'établir des gradients de concentration en antigène et en anticorps externes dans un champ électrique selon leurs charges différentes. Les dilutions d'un étalon et les dilutions de la substance à examiner sont placées dans des cupules creusées en ligne dans le gel. Une quantité connue du réactif correspondant est placée dans d'autres cupules disposées en une ligne opposée à la première. L'activité de la substance peut être considérée comme la dilution la plus forte faisant apparaître un front de précipitation.

Il existe des variantes de l'immunoélectrophorèse croisée et des méthodes d'immuno-électrodosage.

D'autres techniques associent la séparation des antigènes suivant la taille moléculaire et les propriétés sérologiques.

**Mise en évidence et caractérisation des lignes d'immunoprécipitation**

Celles-ci peuvent être réalisées par des colorations sélectives ou non sélectives, par fluorescence, par marquage enzymatique ou isotopique ou par d'autres techniques appropriées. Les colorations sélectives sont habituellement utilisées pour la caractérisation de substances non-protéiques dans les précipités.

Dans les gels translucides, tels que agar ou agarose, le front de précipitation est nettement visible pour autant que la concentration de chacun des réactifs soit appropriée.

VALIDATION DE LA MÉTHODE

**Critères de validation**

Une méthode immunochimique quantitative n'est valable que si :

1) l'anticorps ou l'antigène ne distingue pas de façon significative la substance à examiner de l'étalon. Dans le cas d'un réactif marqué, le réactif correspondant ne distingue pas de façon significative la substance marquée de la substance non marquée,

2) la méthode n'est pas influencée par le milieu du dosage, c'est-à-dire tout composant de l'échantillon à examiner ou de ses excipients qui peuvent varier d'un échantillon à un autre. Ces composants peuvent comprendre d'autres protéines, sels, conservateurs, à des concentrations élevées ou exercer une activité de contamination protéolytique parasite,

3) la limite de quantification est inférieure au critère d'acceptabilité indiqué dans la monographie individuelle,

4) la précision du dosage est telle que la variance des résultats correspond à l'exigence établie dans la monographie individuelle,

5) les erreurs systématiques, liées à la séquence dans laquelle le dosage est réalisé, sont absentes.

**Méthodes de validation**

Pour que ces critères soient vérifiés, le procédé de validation respecte les éléments suivants :

1) le dosage est réalisé au moins en triple,

2) le dosage comprend au moins 3 dilutions différentes de la préparation étalon et 3 dilutions différentes de la substance à examiner supposées présenter la même activité que la préparation étalon,

3) le plan de répartition des échantillons suit une distribution aléatoire,

4) si la substance à examiner est un sérum ou si elle est mélangée avec d'autres constituants, le témoin est préparé de la même manière,

5) l'essai comprend une mesure de liaison non spécifique du réactif marqué,

6) pour les immunodosages avec déplacement :

(a) la liaison maximale (déplacement-zéro) est déterminée,

(b) les dilutions couvrent la gamme complète des réponses pour les valeurs les plus proches de la liaison non spécifique à la liaison maximale, de préférence à la fois pour la substance à examiner et l'étalon.

CALCUL STATISTIQUE

Pour l'analyse des résultats, les courbes des réponses de la substance à examiner et de l'étalon peuvent être estimées selon les méthodes décrites dans *5.3 Analyse statistique des résultats des dosages et essais biologiques*.

Un non parallélisme significatif indique que l'anticorps ou l'antigène distingue la substance à examiner de l'étalon et implique l'invalidation des résultats.

Dans les immunodosages avec déplacement, les valeurs de liaison non spécifique et du déplacement maximal à une concentration élevée de substance à examiner ou d'étalon ne doivent pas être significativement différentes. Des différences pourraient refléter les effets du milieu, soit par inhibition de la liaison, soit par dégradation du marqueur.

**01/2009:20702**
**corrigé 7.0**

# 2.7.2. TITRAGE MICROBIOLOGIQUE DES ANTIBIOTIQUES

L'activité d'un antibiotique est estimée par comparaison de l'inhibition de la croissance de microorganismes sensibles provoquée respectivement par des concentrations connues de l'antibiotique à examiner et d'une substance de référence.

Les préparations de référence utilisées dans les titrages sont des substances dont l'activité a été déterminée avec précision par rapport à l'étalon international correspondant ou à la préparation de référence internationale.

Le plan expérimental doit être tel qu'il permette de vérifier la validité du modèle mathématique sur lequel est basée l'équation de l'activité. Si un modèle de lignes parallèles est choisi, les 2 relations log dose-réponse (ou réponse transformée) correspondant à la préparation à examiner et à la préparation de référence doivent être parallèles ; elles doivent être linéaires dans l'intervalle des doses retenues pour le calcul du titre. Ces conditions doivent être vérifiées par des épreuves de validité pour un niveau donné de probabilité, généralement $P = 0,05$. D'autres modèles mathématiques peuvent également être utilisés, par exemple le modèle à rapport de pente du titrage, à condition que la validité soit démontrée.

Sauf indication contraire dans la monographie, les limites de confiance ($P = 0,95$) du titrage ne sont pas inférieures à 95 pour cent ni supérieures à 105 pour cent de l'activité estimée.

Effectuez le titrage par le procédé A ou le procédé B.

A. TITRAGE PAR DIFFUSION

Liquéfiez le milieu adapté aux conditions du titrage (voir ci-après), puis ensemencez à une température appropriée, par exemple, pour les formes végétatives, de 48 °C à 50 °C, avec une quantité déterminée d'une suspension de microorganismes sensibles à l'antibiotique à examiner, qui permet d'obtenir des zones d'inhibition nettement délimitées et d'un diamètre convenable avec les concentrations d'antibiotique utilisées pour le titrage. Versez immédiatement en couche uniforme de 2-5 mm d'épaisseur le milieu ensemencé dans des boîtes de Pétri ou dans de grandes boîtes rectangulaires. Le milieu peut être constitué de 2 couches, la couche supérieure étant seule ensemencée.

Conservez les boîtes dans des conditions telles qu'aucune croissance notable ou la mort du microorganisme d'essai n'intervienne avant utilisation et que la surface du milieu soit sèche au moment de l'emploi.

Utilisez le solvant et la solution tampon indiqués dans le tableau 2.7.2.-1 pour préparer les solutions de la préparation de référence et les solutions de l'antibiotique à examiner, en concentrations présumées égales. Déposez les solutions, soit dans des cylindres stériles de porcelaine, d'acier inoxydable ou de tout autre matériau approprié, disposés à la surface du milieu, soit dans des cavités découpées dans la gélose (le volume de solution ajouté dans chaque cylindre ou cavité doit être uniforme), soit à l'aide de disques de papier absorbant de bonne qualité et stériles, imprégnés de solutions de la préparation de référence ou de solutions de l'antibiotique à examiner avant qu'ils ne soient déposés à la surface de la gélose.

Afin de vérifier la validité du titrage, utilisez au moins 3 doses différentes de la substance de référence ainsi que 3 doses de l'antibiotique à examiner ayant la même activité présumée que les doses de la substance de référence. Il est recommandé

d'utiliser des séries de doses en progression géométrique. Dans les titrages courants, lorsque la linéarité du système est démontrée par un nombre adéquat d'expériences dans l'essai à 3 points, il suffirait, si l'Autorité de contrôle compétente donne son accord, d'effectuer le titrage sur 2 points seulement. Toutefois, en cas de contestation, le titrage est fait sur 3 points comme indiqué ci-dessus.

Disposez les solutions dans chaque boîte de Pétri ou dans chaque boîte rectangulaire, selon un plan statistiquement approprié. Dans le cas de petites boîtes ne pouvant recevoir plus de 6 solutions, il est recommandé d'alterner la disposition des solutions de l'antibiotique à examiner et de la substance de référence afin d'éviter toute interaction entre les solutions les plus concentrées.

Faites incuber à une température appropriée pendant environ 18 h. Préalablement à l'incubation, une période de diffusion de 1-4 h à la température ambiante ou à environ 4 °C, selon le cas, peut être nécessaire afin de réduire les effets dus au décalage de temps entre l'application des solutions sur les plaques et, ainsi, d'améliorer la pente de régression.

Mesurez les diamètres, avec une précision d'au moins 0,1 mm, ou les surfaces des zones d'inhibition, avec une précision correspondante. Calculez le titre de l'antibiotique à examiner à l'aide de méthodes statistiques appropriées.

Le nombre de répétitions par dose dans chaque titrage doit être suffisant pour assurer la précision requise ; le titrage peut être répété et les résultats combinés statistiquement afin d'obtenir la précision requise et de vérifier que l'activité de l'antibiotique n'est pas inférieure à l'activité minimale requise.



Tableau 2.7.2.-1. – *Titrage des antibiotiques par diffusion*

| Antibiotique | Substance de référence | Solvant à utiliser pour préparer la solution-mère | Solution tampon (pH) | Microorganisme | Milieu et pH final (± 0,1 unité pH) | Température d'incubation |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Amphotéricine B | *Amphotéricine B pour titrage microbiologique SCR* | *Diméthylsulfoxyde R* | pH 10,5 (0,2 M) | *Saccharomyces cerevisiae*<br>ATCC 9763<br>IP 1432-83 | F - pH 6,1 | 35-37 °C |
| Bacitracine-zinc | *Bacitracine-zinc SCR* | *Acide chlorhydrique 0,01 M* | pH 7,0 (0,05 M) | *Micrococcus luteus*<br>NCTC 7743<br>CIP 53.160<br>ATCC 10240 | A - pH 7,0 | 35-39 °C |
| Bléomycine (sulfate de) | *Sulfate de bléomycine SCR* | *Eau R* | pH 6,8 (0,1 M) | *Mycobacterium smegmatis*<br>ATCC 607 | G - pH 7,0 | 35-37 °C |
| Colistiméthate de sodium | *Colistiméthate de sodium SCR* | *Eau R* | pH 6,0 (0,05 M) | *Bordetella bronchiseptica*<br>NCTC 8344<br>CIP 53.157<br>ATCC 4617<br>*Escherichia coli*<br>NCIB 8879<br>CIP 54.127<br>ATCC 10536 | B - pH 7,3 | 35-39 °C |
| Framycétine (sulfate de) | *Sulfate de framycétine SCR* | *Eau R* | pH 8,0 (0,05 M) | *Bacillus subtilis*<br>NCTC 10400<br>CIP 52.62<br>ATCC 6633<br>*Bacillus pumilus*<br>NCTC 8241<br>CIP 76.18 | E - pH 7,9<br><br><br><br>E - pH 7,9 | 30-37 °C<br><br><br><br>30-37 °C |
| Gentamicine (sulfate de) | *Sulfate de gentamicine SCR* | *Eau R* | pH 8,0 (0,05 M) | *Bacillus pumilus*<br>NCTC 8241<br>CIP 76.18<br>*Staphylococcus epidermidis*<br>NCIB 8853<br>CIP 68.21<br>ATCC 12228 | A - pH 7,9<br><br><br>A - pH 7,9 | 35-39 °C<br><br><br>35-39 °C |
| Josamycine | *Josamycine SCR* | *Méthanol R* (voir la monographie) | pH 5,6 | *Bacillus subtilis*<br>CIP 52.62<br>ATCC 6633<br>NCTC 10400 | A - pH 6,6 | 35-37 °C |
| Josamycine (propionate de) | *Propionate de josamycine SCR* | *Méthanol R* (voir la monographie) | pH 5,6 | *Bacillus subtilis*<br>CIP 52.62<br>ATCC 6633<br>NCTC 10400 | A - pH 6,6 | 35-37 °C |
| Kanamycine (monosulfate de)<br><br><br>Kanamycine (sulfate acide de) | *Monosulfate de kanamycine SCR* | *Eau R* | pH 8,0 (0,05 M) | *Bacillus subtilis*<br>NCTC 10400<br>CIP 52.62<br>ATCC 6633<br>*Staphylococcus aureus*<br>NCTC 7447<br>CIP 53.156<br>ATCC 6538P | A - pH 7,9<br><br><br><br>A - pH 7,9 | 30-37 °C<br><br><br><br>35-39 °C |

| **Antibiotique** | **Substance de référence** | **Solvant à utiliser pour préparer la solution-mère** | **Solution tampon (pH)** | **Microorganisme** | **Milieu et pH final (± 0,1 unité pH)** | **Température d'incubation** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Néomycine (sulfate de) | *Sulfate de néomycine pour dosage microbiologique SCR* | *Eau R* | pH 8,0 (0,05M) | *Bacillus pumilus*<br>NCTC 8241<br>CIP 76.18<br>*Bacillus subtilis*<br>NCTC 10400<br>CIP 52.62<br>ATCC 6633 | E - pH 7,9<br><br><br>E - pH 7,9 | 30-37 °C<br><br><br>30-37 °C |
| Nétilmicine (sulfate de) | *Sulfate de nétilmicine SCR* | *Eau R* | pH 8,0 ± 0,1 | *Staphylococcus aureus*<br>ATCC 6538P<br>CIP 53.156 | A - pH 7,9 | 32-35 °C |
| Nystatine | *Nystatine SCR* | *Diméthylforma-mide R* | pH 6,0 (0,05 M) contenant 5 pour cent *V/V* de *diméthylformamide R* | *Candida tropicalis*<br>CIP 1433-83<br>NCYC 1393<br>*Saccharomyces cerevisiae*<br>NCYC 87<br>CIP 1432-83<br>ATCC 9763 | F - pH 6,0<br><br><br>F - pH 6,0 | 30-37 °C<br><br><br>30-32 °C |
| Rifamycine sodique | *Rifamycine sodique SCR* | *Méthanol R* | pH 7,0 (0,05 M) | *Micrococcus luteus*<br>NCTC 8340<br>CIP 53.45<br>ATCC 9341 | A - pH 6,6 | 35-39 °C |
| Spiramycine | *Spiramycine SCR* | *Méthanol R* | pH 8,0 (0,05 M) | *Bacillus subtilis*<br>NCTC 10400<br>CIP 52.62<br>ATCC 6633 | A - pH 7,9 | 30-32 °C |
| Streptomycine (sulfate de) | *Sulfate de streptomycine SCR* | *Eau R* | pH 8,0 (0,05 M) | *Bacillus subtilis*<br>NCTC 8236<br>CIP 1.83<br>*Bacillus subtilis*<br>NCTC 10400<br>CIP 52.62<br>ATCC 6633 | A - pH 7,9<br><br><br>A - pH 7,9 | 30-37 °C<br><br><br>30-37 °C |
| Téicoplanine | *Téicoplanine SCR* | pH 6,0 (0,05 M) | pH 6,0 (0,05 M) | *Bacillus subtilis*<br>NCTC 10400<br>CIP 5262<br>ATCC 6633 | H - pH 7,8-8,0 | 35-37 °C |
| Tylosine pour usage vétérinaire<br>Tylosine (tartrate de) pour usage vétérinaire | *Tylosine SCR* | *Méthanol R* à 2,5 pour cent *V/V* dans la *solution tampon phosphate pH 7,0 (0,1 M) R* | Mélange de 40 volumes de *méthanol R* et de 60 volumes de *solution tampon phosphate pH 8,0 (0,1 M) R* | *Micrococcus luteus*<br>NCTC 8340<br>CIP 53.45<br>ATCC 9341 | A - pH 8,0 | 32-35 °C |
| Vancomycine (chlorhydrate de) | *Chlorhydrate de vancomycine SCR* | *Eau R* | pH 8,0 | *Bacillus subtilis*<br>NCTC 8236<br>CIP 52.62<br>ATCC 6633 | A - pH 8,0 | 37-39 °C |

B. TITRAGE TURBIDIMÉTRIQUE

Ensemencez le milieu approprié avec une suspension du microorganisme choisi (voir ci-après) sensible à l'antibiotique à examiner de façon à obtenir une diminution importante de la culture microbienne dans les conditions du titrage. Utilisez une quantité déterminée de la suspension de façon à obtenir une opacité facilement mesurable après une durée d'incubation d'environ 4 h.

Le milieu ensemencé doit être utilisé dès sa préparation.

Utilisez le solvant et la solution tampon indiqués dans le tableau 2.7.2.-2 pour préparer les solutions de la substance de référence et les solutions de l'antibiotique à examiner, en concentrations présumées égales.

Afin de vérifier la validité du titrage, utilisez au moins 3 doses différentes de la substance de référence ainsi que 3 doses de l'antibiotique à examiner ayant la même activité présumée que les doses de la substance de référence. Il est recommandé d'utiliser des séries de doses en progression géométrique. Il pourrait être nécessaire de ne retenir pour le calcul, parmi un plus grand nombre de doses, que les 3 doses consécutives correspondantes de la solution de référence et de la solution d'essai permettant d'obtenir la linéarité requise.

Utilisez des tubes à essai identiques. Ajoutez dans chacun d'eux un volume égal de chaque solution et un même volume de milieu nutritif ensemencé (par exemple 1 mL de solution et 9 mL de milieu). Pour le titrage de la tyrothricine, ajoutez 0,1 mL de solution à 9,9 mL de milieu ensemencé.

Préparez simultanément 2 tubes témoins sans antibiotique, contenant l'un et l'autre le milieu nutritif ensemencé, le second étant additionné immédiatement de 0,5 mL de *formaldéhyde R*. Ces tubes servent à étalonner l'appareil optique utilisé pour mesurer la croissance.

Disposez convenablement tous les tubes, soit au hasard, soit en carré latin, soit en forme de bloc aléatoire, dans un bain-marie ou dans un autre appareil convenable, permettant de porter rapidement tous les tubes à la température d'incubation indiquée. Maintenez-les à cette température pendant 3-4 h. Veillez à assurer une température uniforme et une durée d'incubation identique.

Après incubation, bloquez la croissance des cultures, par exemple par addition de 0,5 mL de *formaldéhyde R* dans chaque tube, ou par traitement à la chaleur, puis mesurez l'opacité au moyen d'un appareil optique approprié avec une précision allant jusqu'à 3 chiffres significatifs. Il est, d'autre part, possible d'utiliser un autre procédé qui permette de mesurer l'opacité de chaque tube après une période d'incubation identique.

Calculez le titre de l'antibiotique à examiner à l'aide de méthodes statistiques appropriées.

La linéarité du rapport dose-réponse, transformé ou non, est souvent obtenue dans un intervalle de doses limité ; c'est cet intervalle qui doit être utilisé pour le calcul de l'activité. Il doit cependant comporter au moins 3 doses consécutives permettant d'effectuer une vérification de la linéarité. Dans les titrages courants, lorsque la linéarité du système est démontrée par un nombre adéquat d'expériences dans l'essai à 3 points, il suffirait, si l'Autorité de contrôle compétente donne son accord, d'effectuer le titrage sur 2 points seulement. Toutefois, en cas de contestation, le titrage est fait sur 3 points.

Le nombre de répétitions par dose dans chaque titrage doit être suffisant pour assurer la précision requise ; le titrage peut être répété et les résultats combinés statistiquement afin d'obtenir la précision requise et de vérifier que l'activité de l'antibiotique à examiner n'est pas inférieure à l'activité minimale requise.

Tableau 2.7.2.-2. – *Titrage des antibiotiques par turbidimétrie*

<table>
<tr><th>Antibiotique</th><th>Substance de référence</th><th>Solvant à utiliser pour préparer la solution-mère</th><th>Solution tampon (pH)</th><th>Microorganisme</th><th>Milieu et pH final (± 0,1 unité pH)</th><th>Température d'incubation</th></tr>
<tr><td>Colistiméthate de sodium</td><td>Colistiméthate de sodium SCR</td><td>Eau R</td><td>pH 7,0</td><td>Escherichia coli<br>NCIB 8666<br>CIP 2.83<br>ATCC 9637</td><td>C - pH 7,0</td><td>35-37 °C</td></tr>
<tr><td>Framycétine (sulfate de)</td><td>Sulfate de framycétine SCR</td><td>Eau R</td><td>pH 8,0</td><td>Staphylococcus aureus<br>NCTC 7447<br>CIP 53.156<br>ATCC 6538P</td><td>C - pH 7,0</td><td>35-37 °C</td></tr>
<tr><td>Gentamicine (sulfate de)</td><td>Sulfate de gentamicine SCR</td><td>Eau R</td><td>pH 7,0</td><td>Staphylococcus aureus<br>NCTC 7447<br>CIP 53.156<br>ATCC 6538P</td><td>C - pH 7,0</td><td>35-37 °C</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Gramicidine</td><td>Gramicidine SCR</td><td>Méthanol R</td><td>pH 7,0*</td><td>Enterococcus hirae<br>CIP 58.55<br>ATCC 10541<br>Staphylococcus aureus<br>ATCC 6538P</td><td>C - pH 7,0</td><td>35-37 °C</td></tr>
<tr><td colspan="6">*L'addition d'un agent tensioactif peut être nécessaire pour éviter une adsorption éventuelle sur le matériel au cours des dilutions, par exemple 0,1 mg/mL de polysorbate 80 R.</td></tr>
<tr><td>Josamycine</td><td>Josamycine SCR</td><td>Méthanol R - voir la monographie</td><td>pH 5,6</td><td>Staphylococcus aureus<br>CIP 53.156<br>ATCC 6538P<br>NCTC 7447</td><td>C - pH 8,0</td><td>35-37 °C</td></tr>
<tr><td>Josamycine (propionate de)</td><td>Propionate de josamycine SCR</td><td>Méthanol R - voir la monographie</td><td>pH 5,6</td><td>Staphylococcus aureus<br>CIP 53.156<br>ATCC 6538P<br>NCTC 7447</td><td>C - pH 8,0</td><td>35-37 °C</td></tr>
<tr><td>Kanamycine (monosulfate de)<br><br>Kanamycine (sulfate acide de)</td><td>Monosulfate de kanamycine SCR</td><td>Eau R</td><td>pH 8,0</td><td>Staphylococcus aureus<br>NCTC 7447<br>CIP 53.156<br>ATCC 6538P</td><td>C - pH 7,0</td><td>35-37 °C</td></tr>
<tr><td>Néomycine (sulfate de)</td><td>Sulfate de néomycine pour dosage microbiologique SCR</td><td>Eau R</td><td>pH 8,0</td><td>Staphylococcus aureus<br>NCTC 7447<br>CIP 53.156<br>ATCC 6538P</td><td>C - pH 7,0</td><td>35-37 °C</td></tr>
<tr><td>Rifamycine sodique</td><td>Rifamycine sodique SCR</td><td>Méthanol R</td><td>pH 7,0</td><td>Escherichia coli<br>NCIB 8879<br>CIP 54.127<br>ATCC 10536</td><td>C - pH 7,0</td><td>35-37 °C</td></tr>
</table>

| Antibiotique | Substance de référence | Solvant à utiliser pour préparer la solution-mère | Solution tampon (pH) | Microorganisme | Milieu et pH final (± 0,1 unité pH) | Température d'incubation |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Spiramycine | *Spiramycine SCR* | *Méthanol R* | pH 7,0 | *Staphylococcus aureus*<br>NCTC 7447<br>CIP 53.156<br>ATCC 6538P | C - pH 7,0 | 35-37 °C |
| Streptomycine (sulfate de) | *Sulfate de streptomycine SCR* | *Eau R* | pH 8,0 | *Klebsiella pneumoniae*<br>NCTC 7427<br>CIP 53.153<br>ATCC 10031 | C - pH 7,0 | 35-37 °C |
| Tylosine pour usage vétérinaire<br>Tylosine (tartrate de) pour usage vétérinaire | *Tylosine SCR* | *Méthanol R* à 2,5 pour cent *V/V* dans la *solution tampon phosphate pH 7,0 (0,1 M) R* | pH 7,0 | *Staphylococcus aureus*<br>NCTC 6571<br>ATCC 9144<br>CIP 53.154 | C - pH 7,0 | 37 °C |
| Tyrothricine | *Gramicidine SCR* | *Alcool R* | *Alcool R* | *Enterococcus hirae*<br>ATCC 10541 | C - pH 7,0 | 37 °C |
| Vancomycine (chlorhydrate de) | *Chlorhydrate de vancomycine SCR* | *Eau R* | pH 8,0 | *Staphylococcus aureus*<br>CIP 53.156<br>ATCC 6538P | C - pH 7,0 | 37-39 °C |

*La section suivante est publiée à titre d'information.*

## Recommandations pour le titrage microbiologique des antibiotiques

Les textes suivants énumèrent les microorganismes recommandés et indiquent les conditions de travail. D'autres microorganismes peuvent être utilisés à condition qu'ils présentent la même sensibilité à l'antibiotique à examiner et soient utilisés dans des milieux appropriés, dans des conditions favorables de température et de pH. Le choix des concentrations des solutions doit assurer qu'une relation linéaire existe entre le logarithme de la dose et la réponse dans les conditions de l'essai.

**Préparation de l'inoculum**. *Bacillus cereus* var. *mycoides* ; *Bacillus subtilis* ; *Bacillus pumilus*. Préparez comme suit les suspensions de spores des microorganismes destinées à être utilisées comme inoculum.

Cultivez le microorganisme à 35-37 °C pendant 7 jours, à la surface d'un milieu approprié additionné au préalable de 0,001 g/L de *sulfate de manganèse R*. Avec de l'*eau R* stérile, enlevez, par lavage, la culture qui comprend principalement des spores. Chauffez la suspension à 70 °C pendant 30 min et diluez de façon à obtenir une concentration convenable de spores – généralement $10 \times 10^6$ à $100 \times 10^6$ spores par millilitre. La suspension de spores peut être conservée pendant une longue période à une température ne dépassant pas 4 °C.

Une suspension de spores peut également être préparée par culture des microorganismes à 26 °C pendant 4-6 jours dans le milieu C. Ajoutez aseptiquement une quantité suffisante de *sulfate de manganèse R* pour obtenir une concentration de 0,001 g/L, puis faites incuber pendant 48 h. Vérifiez au microscope la présence d'une sporulation appropriée (environ 80 pour cent), puis centrifugez. Préparez une nouvelle suspension du dépôt dans de l'*eau R* stérile pour obtenir une concentration de $10 \times 10^6$ à $100 \times 10^6$ spores par millilitre. Chauffez à 70 °C pendant 30 min. Conservez la suspension à une température maximale de 4 °C.

*Bordetella bronchiseptica*. Cultivez le microorganisme d'essai à 35-37 °C pendant 16-18 h sur le milieu B. Avec de l'*eau R* stérile, enlevez par lavage les éléments bactériens qui ont cultivé et diluez de façon à obtenir une opacité adéquate.

*Staphylococcus aureus* ; *Klebsiella pneumoniae* ; *Escherichia coli* ; *Micrococcus luteus* ; *Staphylococcus epidermidis*. Effectuez la préparation comme indiqué ci-dessus pour *B. bronchiseptica*, en utilisant le milieu A et en ajustant l'opacité de façon à obtenir une valeur dont il a été démontré qu'elle fournit un rapport satisfaisant dose-réponse dans le titrage par turbidimétrie ou provoque des zones d'inhibition nettement délimitées de diamètre convenable dans le titrage par diffusion, selon le cas.

*Saccharomyces cerevisiae* ; *Candida tropicalis*. Cultivez le microorganisme à 30-37 °C pendant 24 h sur le milieu F. Avec une solution stérile de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, enlevez par lavage les microorganismes cultivés et diluez de façon à obtenir une opacité adéquate.

**Solutions tampons**. Préparez les solutions tampons dont le pH est de 5,8 à 8,0 en mélangeant 50,0 mL de *solution de phosphate monopotassique 0,2 M R* avec les quantités d'*hydroxyde de sodium 0,2 M* indiquées au tableau 2.7.2.-3 et en complétant à 200,0 mL avec de l'*eau R* récemment distillée.

Tableau 2.7.2.-3.

| pH | *Hydroxyde de sodium 0,2 M* (mL) |
|---|---|
| 5,8 | 3,72 |
| 6,0 | 5,70 |
| 6,2 | 8,60 |
| 6,4 | 12,60 |
| 6,6 | 17,80 |
| 6,8 | 23,65 |
| 7,0 | 29,63 |
| 7,2 | 35,00 |
| 7,4 | 39,50 |
| 7,6 | 42,80 |
| 7,8 | 45,20 |
| 8,0 | 46,80 |

Utilisez ces solutions tampons pour tous les titrages microbiologiques indiqués au tableau 2.7.2.-1, à l'exception de ceux du sulfate de bléomycine et de l'amphotéricine B.

Pour le titrage du sulfate de bléomycine, utilisez la solution tampon pH 6,8 préparée comme suit : dissolvez 6,4 g de *phosphate monopotassique R* et 18,9 g de *phosphate disodique R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

Pour le titrage de l'amphotéricine B, utilisez la solution tampon phosphate pH 10,5 (0,2 M) préparée comme suit : dissolvez 35 g de *phosphate dipotassique R* dans 900 mL d'*eau R,* ajoutez 20 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

**Milieux de culture**. Les milieux suivants ou des milieux équivalents peuvent être utilisés.

Milieu A

| | |
|---|---|
| Peptone | 6 g |
| Peptone pancréatique de caséine | 4 g |
| Extrait de viande de boeuf | 1,5 g |
| Extrait de levure | 3 g |
| Glucose monohydraté | 1 g |
| Gélose | 15 g |
| Eau *q.s.p.* | 1000 mL |

Milieu B

| | |
|---|---|
| Peptone pancréatique de caséine | 17 g |
| Peptone papaïque de soja | 3 g |
| Chlorure de sodium | 5 g |
| Phosphate dipotassique | 2,5 g |
| Glucose monohydraté | 2,5 g |
| Gélose | 15 g |
| Polysorbate 80 | 10 g |
| Eau *q.s.p.* | 1000 mL |

Ajoutez le polysorbate 80 à la solution chaude renfermant les autres composants après l'avoir portée à ébullition et immédiatement avant d'ajuster son volume.

Milieu C

| | |
|---|---|
| Peptone | 6 g |
| Extrait de viande de boeuf | 1,5 g |
| Extrait de levure | 3 g |
| Chlorure de sodium | 3,5 g |
| Glucose monohydraté | 1 g |
| Phosphate dipotassique | 3,68 g |
| Phosphate monopotassique | 1,32 g |
| Eau *q.s.p.* | 1000 mL |

Milieu D

| | |
|---|---|
| Extrait de coeur | 1,5 g |
| Extrait de levure | 1,5 g |
| Peptone de caséine | 5 g |
| Glucose monohydraté | 1 g |
| Chlorure de sodium | 3,5 g |
| Phosphate dipotassique | 3,68 g |
| Phosphate monopotassique | 1,32 g |
| Nitrate de potassium | 2 g |
| Eau *q.s.p.* | 1000 mL |

Milieu E

| | |
|---|---|
| Peptone | 5 g |
| Extrait de viande | 3 g |
| Phosphate disodique,$12H_2O$ | 26,9 g |
| Gélose | 10 g |
| Eau *q.s.p.* | 1000 mL |

Le phosphate disodique en solution stérile est ajouté au milieu stérilisé au préalable.

Milieu F

| | |
|---|---|
| Peptone | 9,4 g |
| Extrait de levure | 4,7 g |
| Extrait de viande de boeuf | 2,4 g |
| Chlorure de sodium | 10,0 g |
| Glucose monohydraté | 10,0 g |
| Gélose | 23,5 g |
| Eau *q.s.p.* | 1000 mL |

Milieu G

| | |
|---|---|
| Glycérol | 10 g |
| Peptone | 10 g |
| Extrait de viande | 10 g |
| Chlorure de sodium | 3 g |
| Gélose | 15 g |
| Eau *q.s.p.* | 1000 mL |

pH 7,0 ± 0,1 après stérilisation.

Milieu H

| | |
|---|---|
| Peptone | 5,0 g |
| Gélose | 15,0 g |
| Extrait de viande de boeuf | 3,0 g |
| Eau *q.s.p.* | 1000 mL |

pH 7,8 - 8,0 ajusté avec de l'*hydroxyde de sodium 0,1 M*.

**01/2008:20704**

## 2.7.4. DOSAGE DU FACTEUR VIII DE COAGULATION HUMAIN

Le dosage du facteur VIII de coagulation humain s'effectue par mesure de son activité biologique en tant que cofacteur de l'activation du facteur X par le facteur IX activé (IXa) en présence d'ions calcium et de phospholipides. L'activité d'une préparation du facteur VIII est estimée par comparaison des quantités respectives de cette préparation et de l'étalon international, ou d'une préparation de référence étalonnée en Unités Internationales, qui sont nécessaires pour obtenir une vitesse donnée de formation du facteur Xa dans un milieu de réaction contenant les différentes substances intervenant dans l'activation du facteur X.

L'Unité Internationale d'activité du facteur VIII correspond à l'activité d'une quantité donnée de l'étalon international, qui est constitué par un concentré cryodesséché du facteur VIII de coagulation humain. La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

Le *concentré de facteur VIII de coagulation humain PBR* est étalonné en Unités Internationales par rapport à l'étalon international.

La méthode de dosage colorimétrique comporte 2 étapes successives : l'activation du facteur X, sous l'action du facteur VIII, dans un mélange réactif de facteurs de coagulation composé de substances purifiées, et la lyse enzymatique d'un substrat chromogène par le facteur Xa, qui libère un chromophore quantifiable par spectrophotométrie. Dans des conditions de dosage appropriées, il existe une relation linéaire entre la vitesse de formation du facteur Xa et la concentration du facteur VIII. Le schéma suivant résume le principe du dosage.

**Etape 1**




**Etape 2**




Les 2 étapes mettent en oeuvre des réactifs disponibles dans le commerce auprès de divers fournisseurs. Bien que la composition de ces réactifs puisse légèrement varier, leurs caractéristiques essentielles sont décrites dans les spécifications qui suivent. Certains écarts par rapport à ces spécifications sont admissibles à condition qu'il ait été démontré, avec comme référence l'étalon international du facteur VIII de coagulation sanguine humain, que les résultats obtenus ne diffèrent pas de manière significative.

Il est important de démontrer, par validation, que la trousse choisie convient, notamment en vérifiant la cinétique de génération du facteur Xa pour déterminer le temps correspondant à 50 pour cent du maximum de concentration en facteur Xa.

RÉACTIFS

Le mélange réactif de facteurs de coagulation contient notamment des protéines purifiées d'origine humaine ou bovine, à savoir le facteur X, le facteur IXa et un activateur du facteur VIII, qui est généralement la thrombine. Ces protéines sont partiellement purifiées, de préférence à au moins 50 pour cent et ne contiennent pas d'impuretés susceptibles d'interférer dans l'activation du facteur VIII ou du facteur X. De la thrombine peut être présente sous la forme de son précurseur, la prothrombine, à condition que son activation au sein du mélange réactif soit suffisamment rapide pour permettre une activation quasi instantanée du facteur VIII lors du dosage. Le mélange réactif contient également des phospholipides qui peuvent être d'origine naturelle ou obtenus par synthèse, et doivent être constitués pour une part importante de phosphatidylsérine. Les différents constituants du milieu réactif sont généralement répartis en au moins 2 préparations séparées, dont aucune n'a le pouvoir d'induire à elle seule la formation du facteur Xa. L'une des préparations contient des ions calcium. Après reconstitution, ces 2 préparations peuvent être réunies à condition qu'il ne se forme pas de quantités significatives de facteur Xa en l'absence du facteur VIII. Le facteur VIII doit être le seul facteur limitant la formation du facteur Xa dans le mélange d'incubation final.

La 2de étape consiste en la quantification du facteur Xa formé à l'étape précédente, au moyen d'un substrat chromogène spécifique du facteur Xa. Ce substrat est généralement un peptide court dérivatisé de 3-5 acides aminés, lié à un groupement chromophore. La scission de ce groupement et du substrat peptidique entraîne un déplacement de l'activité chromophorique vers une longueur d'onde permettant sa quantification par spectrophotométrie. Le substrat doit également comprendre des inhibiteurs appropriés empêchant la poursuite de la formation du facteur Xa (par exemple des agents chélateurs) et supprimant toute activité thrombinique.

MODE OPÉRATOIRE

Juste avant emploi, reconstituez le contenu entier de 1 ampoule de la préparation de référence et de la préparation à examiner. Ajoutez aux préparations reconstituées la quantité de prédiluant requise pour obtenir des solutions à 0,5-2,0 UI/mL.

Le prédiluant est constitué de plasma d'hémophile A, ou d'un réactif de synthèse contenant une quantité suffisante de facteur Willebrand et donnant des résultats sensiblement équivalents à ceux obtenus avec du plasma d'hémophile. Les solutions prédiluées doivent être stables au-delà du temps nécessaire pour le dosage.

Préparez les dilutions suivantes de la préparation de référence et de la préparation à examiner au moyen d'une solution convenablement tamponnée, sans agent de chélation, par exemple, de tris(hydroxyméthyl)aminométhane ou d'imidazole, contenant 1 pour cent d'albumine humaine ou bovine. Pour chaque préparation préparez au moins 2 séries d'au moins 3 dilutions supplémentaires. La concentration en facteur VIII de ces dilutions doit être ajustée de façon que la concentration finale de facteur VIII dans le mélange réactif, lors de l'étape de formation du facteur Xa, soit de préférence inférieure à 0,01 UI/mL.

Préparez également un témoin contenant l'ensemble des constituants du mélange réactif, à l'exception du facteur VIII.

Toutes les dilutions doivent être préparées dans des tubes en plastique et utilisées immédiatement.

**Etape 1**. A chacune des dilutions préchauffées, obtenues à partir de la préparation de référence et de la préparation à examiner, ajoutez un volume approprié du réactif de coagulation préchauffé (ou d'un mélange de ses constituants séparés), mélangez et incubez à 37 °C dans des tubes en plastique ou les cupules d'une microplaque. Laissez se dérouler la réaction d'activation du facteur X pendant un temps approprié ; l'arrêt de la réaction (étape 2) doit intervenir lorsque la concentration en facteur Xa a atteint environ 50 pour cent de son niveau maximum (plateau). Le temps de réaction approprié est généralement de l'ordre de 2-5 min.

**Etape 2**. Arrêtez la réaction d'activation par addition du mélange réactif préchauffé contenant le substrat chromogène. La vitesse de lyse du substrat, qui doit être proportionnelle à la concentration du facteur Xa, est déterminée par mesure, à l'aide d'un spectrophotomètre, de la variation d'absorbance à une longueur d'onde appropriée. On peut soit mesurer l'absorbance en continu, ce qui permet de calculer la vitesse initiale de lyse du substrat, soit interrompre la réaction d'hydrolyse au bout d'un temps approprié en abaissant le pH à l'aide d'un réactif approprié tel qu'une solution d'acide acétique à 50 pour cent *V/V* ou une solution tampon citrate pH 3 (1 M). Ajustez le temps d'hydrolyse de façon que la condition de linéarité de la courbe de formation du chromophore en fonction du temps soit satisfaite. Ce temps est généralement de l'ordre de 3-15 min, mais certaines variations sont tolérées si elles permettent d'améliorer la linéarité de la courbe dose-réponse.

Calculez l'activité de la préparation à examiner par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple).

**01/2008:20705**

## 2.7.5. TITRAGE DE L'HÉPARINE

L'activité anticoagulante de l'héparine est évaluée *in vitro* par comparaison de sa capacité à retarder la coagulation du plasma de mouton, citraté et recalcifié, à celle d'une préparation de référence, étalonnée en Unités Internationales, dans des conditions données.

L'Unité Internationale d'héparine correspond à l'activité d'une quantité donnée de l'étalon international ; celui-ci est constitué par de l'héparine sodique cryodesséchée provenant de muqueuse intestinale de porc. La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

L'*héparine sodique PBR* est étalonnée en Unités Internationales à partir de l'étalon international, à l'aide du titrage décrit ci-après.

Effectuez le titrage à l'aide d'un des procédés suivants permettant de déterminer le début de la coagulation et de choisir les tubes et autres appareils appropriés à la méthode utilisée :

a) examen visuel direct, effectué de préférence à l'aide d'un éclairage indirect sur fond noir et mat ;

b) enregistrement spectrophotométrique du changement de densité optique à une longueur d'onde de 600 nm environ ;

c) examen visuel du changement de fluidité en inclinant les tubes manuellement ;

d) enregistrement mécanique du changement de fluidité en procédant au mélange tout en ayant soin d'éviter au maximum toute perturbation au sein de la solution pendant la phase initiale de coagulation.

MODE OPÉRATOIRE

*Les volumes mentionnés dans le texte sont donnés à titre indicatif et peuvent être adaptés à l'appareillage utilisé, à condition toutefois que les rapports entre les différents volumes soient respectés.*

Diluez l'*héparine sodique PBR* dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L de façon à obtenir par millilitre un nombre connu avec précision d'Unités Internationales. Préparez dans les mêmes conditions une solution de la préparation à examiner de même activité présumée. A partir de chacune de ces solutions, préparez une série de dilutions dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L en progression géométrique, de façon que le temps de coagulation obtenu avec la concentration la plus faible ne soit pas inférieur à 1,5 fois le temps de recalcification à blanc et que le temps de coagulation obtenu avec la plus forte concentration soit tel qu'il donne une courbe log dose/réponse satisfaisante, telle que déterminée dans un essai préliminaire.

Placez 12 tubes dans un bain d'eau glacée en les étiquetant en double $T_1$, $T_2$ et $T_3$ pour les dilutions de la préparation à examiner et $S_1$, $S_2$ et $S_3$ pour les dilutions de la préparation de référence. Dans chaque tube, introduisez 1,0 mL de *substrat de plasma R1* décongelé, 1,0 mL de la dilution appropriée de la préparation à examiner ou de la préparation de référence. Après chaque addition, mélangez en évitant la formation de bulles. En prenant les tubes dans l'ordre suivant $S_1$, $S_2$, $S_3$, $T_1$, $T_2$, $T_3$, transférez chacun d'eux dans un bain-marie à 37 °C. Laissez s'équilibrer la température du milieu à 37 °C pendant 15 min environ, puis ajoutez dans chacun des tubes 1 mL d'un réactif APTT (temps de thromboplastine partielle activée) approprié contenant des phospholipides et un activateur de contact, à une dilution telle qu'un temps de recalcification à blanc convenable ne dépassant pas 60 s est obtenu. Après exactement 2 min, ajoutez 1 mL d'une solution de *chlorure de calcium R* à 3,7 g/L chauffée au préalable à 37 °C. Enregistrez, comme temps de coagulation, l'intervalle exprimé en secondes entre cette dernière addition et le début de la coagulation déterminé selon le procédé choisi. Déterminez le temps de calcification à blanc au début et à la fin de l'opération dans les mêmes conditions en utilisant 1 mL d'une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L au lieu d'une des dilutions d'héparine ; les deux valeurs à blanc obtenues ne doivent pas différer de façon significative. Transformez les temps de coagulation en logarithmes, en utilisant la valeur moyenne des tubes traités en double. Répétez le procédé en utilisant de nouvelles dilutions et effectuez l'incubation dans l'ordre $T_1$, $T_2$, $T_3$, $S_1$, $S_2$, $S_3$. Calculez les résultats par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*).

Effectuez au moins 3 titrages indépendants. Pour chacun d'eux, préparez respectivement de nouvelles solutions de la préparation à examiner et de la préparation de référence et utilisez un nouveau prélèvement de substrat de plasma décongelé immédiatement avant l'emploi.

Calculez l'activité de la préparation à examiner par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*) en combinant les résultats des différents titrages. Lorsque la variance issue des différences entre les titrages est significative au niveau $P$ = 0,01, une estimation combinée de l'activité peut être obtenue en calculant la moyenne non pondérée des estimations de l'activité.

**01/2008:20706**
**corrigé 6.0**

## 2.7.6. TITRAGE DE L'ACTIVITÉ DU VACCIN DIPHTÉRIQUE ADSORBÉ

L'activité du vaccin diphtérique est déterminée par administration du vaccin aux cobayes suivie soit d'une épreuve au moyen de la toxine diphtérique (méthode A ou B), soit d'une détermination du titre en anticorps dirigés contre la toxine ou l'anatoxine diphtérique dans le sérum des cobayes (méthode C). Dans les 2 cas, l'activité du vaccin est calculée par comparaison avec celle d'une préparation de référence étalonnée en Unités Internationales.

L'Unité Internationale correspond à l'activité d'une quantité donnée de l'étalon international ; celui-ci est constitué par de l'anatoxine diphtérique adsorbée sur de l'hydroxyde d'aluminium. La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

Le *vaccin diphtérique adsorbé PBR* convient comme préparation de référence.

La méthode choisie pour le titrage de l'activité du vaccin diphtérique adsorbé dépend du rôle du titrage. Les méthodes A ou B sont utilisées :

1. au cours du développement d'un vaccin, pour le titrage des lots produits afin de valider la production ;
2. chaque fois qu'une revalidation est nécessaire, à la suite d'une modification significative du procédé de fabrication.

Les méthodes A ou B peuvent également être utilisées dans le cadre du titrage d'activité de routine de lots de vaccin, mais pour le bien-être des animaux, la méthode C est utilisée chaque fois que possible.

A l'exception des cas précédemment spécifiés aux points 1 et 2, la méthode C peut être utilisée après vérification de la conformité de la méthode pour le produit. A cet effet, un nombre approprié de lots (en général 3) est titré selon la méthode C et selon la méthode A ou B. Si des vaccins différents (monovalents ou combinés) sont préparés à partir d'anatoxines diphtériques de même origine et ayant des niveaux comparables (exprimés en Lf/mL) de la même anatoxine diphtérique, il est estimé que la conformité pour le vaccin combiné ayant le plus grand nombre de composants est également valable pour les vaccins combinés comportant moins de composants et pour les vaccins monovalents. Tout vaccin combiné comportant un composant coquelucheux à cellule entière ou comportant le vaccin conjugué haemophilus type b et l'anatoxine diphtérique ou la protéine diphtérique CRM 197 comme protéine vectrice dans le même récipient doit toujours être évalué séparément.

Pour les combinaisons de composants diphtérique et tétanique, le titrage sérologique (méthode C) peut être effectué avec le même groupe d'animaux que celui utilisé pour le titrage sérologique de l'activité du vaccin tétanique adsorbé (*2.7.8*) lorsque les conditions d'immunisation communes pour les composants diphtérique et tétanique (par exemple doses, durée) sont reconnues satisfaisantes pour le vaccin combiné.

Les titrages décrits ci-après utilisent des dilutions multiples pour la préparation à examiner et la préparation de référence. Une fois que l'analyste a acquis une certaine expérience avec la méthode pour un vaccin donné, il est possible d'appliquer un modèle simplifié tel que le modèle comportant une seule dilution pour la préparation à examiner et pour la préparation témoin. Un tel modèle permet à l'analyste de déterminer si l'activité de la préparation à examiner est supérieure de façon significative

au minimum requis, mais il ne fournit pas d'information sur la linéarité, le parallélisme ou la courbe dose-réponse. Le modèle simplifié permet une réduction considérable du nombre d'animaux nécessaire et doit être pris en considération par chaque analyste conformément à la Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques.

En cas d'utilisation de titrages à une seule dilution, la reproductibilité dans le temps de la production et de l'essai est contrôlée à l'aide d'indicateurs appropriés et en pratiquant périodiquement un titrage complet à dilutions multiples, par exemple tous les 2 ans. En ce qui concerne les titrages sérologiques, des indicateurs appropriés pour contrôler la reproductibilité de l'essai sont :

- la moyenne et l'écart type des titres relatifs des immunosérums ou des scores des échantillons de sérums obtenus après administration d'une dose déterminée du vaccin de référence ;
- les titres ou les scores antitoxiques des immunosérums des témoins (échantillons de sérum positif et négatif) ;
- le rapport entre les titres ou les scores antitoxiques du sérum témoin positif et des échantillons de sérum correspondant au vaccin de référence.

## MÉTHODE A. ÉPREUVE INTRADERMIQUE SUR COBAYES

*CHOIX ET RÉPARTITION DES ANIMAUX D'EXPÉRIENCE*

Utilisez des cobayes blancs en bonne santé, provenant d'un même élevage et dont la taille est suffisante pour le nombre de sites prescrit pour l'épreuve ; la différence de masse corporelle entre l'animal le plus lourd et l'animal le plus léger ne doit pas dépasser 100 g. Les cobayes doivent être du même sexe, sinon mâles et femelles doivent être répartis également entre les groupes. Répartissez-les en au moins 6 groupes égaux : le nombre de cobayes dans chaque groupe doit être suffisant pour obtenir des résultats qui satisfassent aux conditions de validité prescrites ci-après. S'il n'a pas été démontré que la toxine d'épreuve est stable ou si elle n'est pas standardisée de manière adéquate, ajoutez 5 cobayes comme témoins non vaccinés.

*CHOIX DE LA TOXINE D'ÉPREUVE*

Choisissez une toxine d'épreuve contenant 67 à 133 lr/100 dans 1 Lf et 25 000 à 50 000 fois la dose minimale de réaction pour cobayes par Lf. S'il a été démontré que la toxine d'épreuve est stable, il n'est pas nécessaire de contrôler l'activité de la solution de toxine d'épreuve lors de chaque titrage.

*PRÉPARATION DE LA SOLUTION DE TOXINE D'ÉPREUVE*

A partir de cette toxine, préparez immédiatement avant l'emploi, dans un diluant approprié, une solution de toxine d'épreuve contenant environ 0,0512 Lf dans 0,2 mL. Préparez à partir de cette solution une série de 5 dilutions au 1/4 contenant respectivement environ 0,0128 Lf, 0,0032 Lf, 0,0008 Lf, 0,0002 Lf, et 0,00005 Lf dans 0,2 mL.

*DILUTION DES PRÉPARATIONS À EXAMINER ET DE RÉFÉRENCE*

Préparez, dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, des dilutions du vaccin à examiner et de la préparation de référence de façon que chaque groupe de dilutions constitue une série de raison 2,5 au plus, les dilutions intermédiaires, injectées par voie sous-cutanée à raison de 1,0 mL par cobaye, devant donner un score intradermique d'environ 3 lors de l'épreuve.

*IMMUNISATION ET ÉPREUVE*

Répartissez les dilutions à raison d'une dilution pour chaque groupe de cobayes et injectez par voie sous-cutanée à chaque cobaye 1,0 mL de la dilution attribuée à son groupe. Après 28 jours, rasez les 2 flancs de chaque cobaye et inoculez par voie intradermique à chaque cobaye vacciné 0,2 mL de chacune des 6 dilutions de toxine dans des sites différents choisis pour minimiser l'interférence entre les sites adjacents.

*DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DE LA TOXINE D'ÉPREUVE*

Si nécessaire, injectez aux animaux de contrôle non vaccinés des dilutions de la toxine d'épreuve contenant respectivement 80, 40, 20, 10 et $5 \times 10^{-6}$ Lf.

*LECTURE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS*

Examinez tous les sites d'injection 48 h après l'injection de la toxine d'épreuve et notez ceux qui présentent un érythème diphtérique spécifique. Le nombre de sites exempts d'érythème représente le score intradermique. Reportez dans un tableau les scores intradermiques pour tous les animaux ayant reçu la même dilution du vaccin et utilisez les données, après une transformation appropriée telle que $(\text{score})^2$ ou arcsin $((\text{score}/6)^2)$ pour calculer l'activité relative de chaque préparation à examiner par une analyse quantitative avec un modèle à une seule pente.

*CONDITIONS DE VALIDITÉ*

L'essai n'est valable que si :

- pour le vaccin à examiner et pour la préparation de référence, le score moyen obtenu avec la dose la plus faible est inférieur à 3 et le score moyen obtenu avec la dose la plus forte est supérieur à 3 ;
- dans les cas appropriés, la dilution de toxine qui contient $40 \times 10^{-6}$ Lf provoque un érythème chez au minimum 80 pour cent des témoins et la dilution qui contient $20 \times 10^{-6}$ Lf provoque un érythème chez moins de 80 pour cent des témoins ; si ces critères ne sont pas satisfaits, une autre toxine doit être utilisée ;
- les limites de confiance ($P = 0,95$) ne sont pas inférieures à 50 pour cent ni supérieures à 200 pour cent de la valeur estimée ;
- l'analyse statistique ne révèle aucune déviation de la linéarité ni du parallélisme.

L'essai peut être répété, mais dans ce cas, le calcul de l'activité doit inclure les résultats de tous les essais valables.

## MÉTHODE B. ÉPREUVE LÉTALE SUR COBAYES

*CHOIX ET RÉPARTITION DES ANIMAUX D'EXPÉRIENCE*

Utilisez des cobayes en bonne santé provenant d'un même élevage, pesant chacun 250-350 g. Les cobayes doivent être du même sexe, sinon mâles et femelles doivent être répartis également entre les groupes. Répartissez-les en au moins 6 groupes égaux : le nombre de cobayes dans chaque groupe doit être suffisant pour obtenir des résultats qui satisfassent aux conditions de validité prescrites ci-après. S'il n'a pas été démontré que la toxine d'épreuve est stable ou si elle n'est pas standardisée de manière adéquate, ajoutez, pour vérifier son activité, 4 groupes de 5 cobayes témoins non vaccinés.

*CHOIX DE LA TOXINE D'ÉPREUVE*

Choisissez une toxine diphtérique contenant au minimum 100 $DL_{50}$ par millilitre. S'il a été démontré que la toxine d'épreuve est stable, il n'est pas nécessaire de contrôler l'activité de la solution de toxine d'épreuve lors de chaque titrage.

*PRÉPARATION DE LA SOLUTION DE TOXINE D'ÉPREUVE*

A partir de cette toxine, préparez immédiatement avant l'emploi, dans un diluant approprié, une solution de toxine d'épreuve contenant environ 100 $DL_{50}$ par millilitre. Si nécessaire, utilisez des solutions diluées aux 1/32, 1/100 et 1/320 dans le même diluant.

*DILUTION DES PRÉPARATIONS À EXAMINER ET DE RÉFÉRENCE*

Préparez, dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, des dilutions du vaccin à examiner et de la préparation de référence de façon que chaque groupe de dilutions constitue une série de raison 2,5 au plus, les dilutions intermédiaires, injectées par voie sous-cutanée à raison de 1,0 mL par cobaye, devant protéger environ 50 pour cent des animaux des effets létaux provoqués par l'inoculation par voie sous-cutanée de la quantité de toxine diphtérique prescrite pour cet essai.

*IMMUNISATION ET ÉPREUVE*

Répartissez les dilutions à raison d'une dilution pour chaque groupe de cobayes et injectez par voie sous-cutanée à chaque cobaye 1,0 mL de la dilution attribuée à son groupe. Après 28 jours, inoculez par voie sous-cutanée à chaque animal 1,0 mL de solution de toxine d'épreuve (100 $DL_{50}$).

*DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DE LA TOXINE D'ÉPREUVE*

Si nécessaire, attribuez la solution de toxine d'épreuve et ses 3 dilutions à raison d'une pour chacun des 4 groupes de 5 cobayes et inoculez par voie sous-cutanée à chaque cobaye dans chaque groupe 1,0 mL de la solution de toxine d'épreuve destinée à son groupe.

*LECTURE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS*

4 jours après l'injection de la toxine d'épreuve, notez le nombre de cobayes survivants. Calculez l'activité du vaccin à examiner par rapport à celle de la préparation de référence sur la base de la proportion d'animaux survivants dans chaque groupe de cobayes vaccinés, en utilisant les méthodes statistiques habituelles (*5.3* par exemple).

*CONDITIONS DE VALIDITÉ*

L'essai n'est valable que si :

- pour le vaccin à examiner et pour la préparation de référence, la dose protectrice 50 pour cent se situe entre la dose la plus faible et la dose la plus forte des préparations administrées aux cobayes,
- dans les cas appropriés, le nombre de morts dans les 4 groupes de 5 cobayes ayant reçu la solution de toxine d'épreuve et ses 3 dilutions correspond à une dose d'épreuve d'environ 100 $DL_{50}$,
- les limites de confiance ($P$ = 0,95) ne sont pas inférieures à 50 pour cent ni supérieures à 200 pour cent de la valeur estimée,
- l'analyse statistique ne révèle aucune déviation de la linéarité ni du parallélisme.

L'essai peut être répété, mais dans ce cas, le calcul de l'activité doit inclure les résultats de tous les essais valables.

MÉTHODE C. DÉTERMINATION DES ANTICORPS CHEZ DES COBAYES

*CHOIX ET RÉPARTITION DES ANIMAUX D'EXPÉRIENCE*

Utilisez des cobayes en bonne santé, provenant d'un même élevage, pesant chacun 250-350 g. Les cobayes doivent être du même sexe, sinon mâles et femelles doivent être répartis également entre les groupes. Répartissez-les en au moins 6 groupes égaux : le nombre de cobayes dans chaque groupe doit être suffisant pour obtenir des résultats qui satisfassent aux conditions de validité décrites ci-après. Utilisez un groupe supplémentaire constitué de cobayes non vaccinés et provenant de la même origine pour fournir un sérum témoin négatif. Si la reproductibilité de l'essai a été démontrée, un sérum témoin négatif de référence peut être utilisé.

*PRÉPARATION DE RÉFÉRENCE*

Utilisez une préparation de référence appropriée telle que le *vaccin diphtérique adsorbé PBR* ou un lot de vaccin dont l'efficacité a été démontrée lors des essais cliniques, ou un autre lot représentatif, et qui a été étalonné en Unités Internationales par rapport au *vaccin diphtérique adsorbé PBR* ou à l'étalon international de l'anatoxine diphtérique.

*DILUTION DES PRÉPARATIONS À EXAMINER ET DE RÉFÉRENCE*

Préparez, dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, des dilutions en série du vaccin à examiner et de la préparation de référence ; une série de raison 2,5 à 5 s'est avérée satisfaisante. Utilisez au minimum 3 dilutions, par exemple dans l'intervalle 0,5-16 UI/mL pour le vaccin de référence et par exemple dans l'intervalle 1:2 à 1:125 pour le vaccin à examiner. Utilisez les dilutions pour l'immunisation de préférence dans l'heure qui suit leur préparation. Attribuez une dilution à chaque groupe de cobayes.

*IMMUNISATION*

Injectez à chaque cobaye par voie sous-cutanée 1,0 mL de la dilution attribuée à son groupe.

*PRÉLÈVEMENT SANGUIN*

35-42 jours après l'immunisation, prélevez un échantillon de sang sur chacun des cobayes, vaccinés et témoins, par une méthode appropriée.

*PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS DE SÉRUM*

Evitez les fréquentes congélations et décongélations des échantillons de sérum. Pour éviter une contamination microbienne, il est préférable d'effectuer les manipulations dans une enceinte à flux laminaire.

*DÉTERMINATION DU TITRE EN ANTICORPS*

Déterminez le titre relatif en anticorps ou le score de chaque échantillon de sérum par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). Les méthodes présentées ci-après (titrage par immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA) et titrage sur cellule Vero) ont été jugées satisfaisantes.

*CALCUL DE L'ACTIVITÉ*

Calculez l'activité du vaccin à examiner en Unités Internationales par rapport à la préparation de référence, en utilisant les méthodes statistiques habituelles (*5.3* par exemple).

*CONDITIONS DE VALIDITÉ*

L'essai n'est valable que si :

- les limites de confiance ($P$ = 0,95) ne sont pas inférieures à 50 pour cent ni supérieures à 200 pour cent de la valeur estimée,
- l'analyse statistique montre que les courbes dose-réponse ont une pente significative et ne révèle aucune déviation de la linéarité ni du parallélisme (si des déviations significatives sont observées, se reporter au chapitre *5.3*).

L'essai peut être répété, mais dans ce cas, le calcul de l'activité doit inclure les résultats de tous les essais valables.

*La section suivante est publiée à titre d'information.*

## Recommandations pour la réalisation du titrage de l'activité du vaccin diphtérique adsorbé

MÉTHODE C. DÉTERMINATION DES ANTICORPS CHEZ LE COBAYE

*PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS DE SÉRUM*

Pour la préparation des échantillons de sérum, la technique suivante a été jugée appropriée. Retournez 6 fois les tubes contenant les échantillons de sang et laissez reposer à 37 °C pendant 2 h, puis à 4 °C pendant 2 h. Centrifugez à température ambiante à 800 *g* pendant 20 min. Transférez le sérum dans des tubes stériles et conservez à une température inférieure à – 20 °C. Un rendement d'au moins 40 pour cent de sérum est obtenu selon cette technique.

*DÉTERMINATION DU TITRE EN ANTICORPS*

Les essais ELISA et titrage sur cellule Vero présentés ci-après sont donnés à titre d'exemples de méthodes immunochimiques jugées appropriées pour la détermination du titre en anticorps.

**Détermination du titre en anticorps dans du sérum de cobaye par immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA).** Les dilutions des sérums à examiner et des sérums de référence sont effectuées sur des plaques ELISA recouvertes d'anatoxine diphtérique. Un sérum de cobaye témoin positif et un sérum de cobaye témoin négatif sont inclus sur chaque plaque pour contrôler les performances du titrage. Des anticorps de lapin ou de chèvre anti-Ig G de cobaye conjugués à la peroxydase, puis

un substrat de peroxydase sont ajoutés. La densité optique est mesurée et le titre relatif en anticorps est calculé à l'aide des méthodes statistiques habituelles (*5.3* par exemple).

*Réactifs et appareillage*

– *Plaques ELISA* : 96 puits, colonnes 1-12, lignes A-H.
– *Sérum de cobaye anti-diphtérique (vaccins pour usage humain)* (sérum témoin positif) obtenu en immunisant des cobayes avec le *vaccin diphtérique adsorbé PBR*.
– *Conjugué peroxydase*. Anticorps de lapin ou de chèvre conjugué à de la peroxydase et dirigé contre l'IgG de cobaye.
– *Anatoxine diphtérique*.
– *Tampon carbonate pH 9,6*. Dissolvez 1,59 g de *carbonate de sodium anhydre R* et 2,93 g de *bicarbonate de sodium R* dans 1000 mL d'*eau R*. Répartissez dans des bouteilles de 150 mL et stérilisez par chauffage à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min.
– *Solution saline tamponnée phosphate pH 7,4 (PBS)*. Dissolvez en agitant 80,0 g de *chlorure de sodium R,* 2,0 g de *phosphate monopotassique R,* 14,3 g de *phosphate disodique dihydraté R* et 2,0 g de *chlorure de potassium R* dans 1000 mL d'*eau R*. Conservez à température ambiante pour éviter la cristallisation. Diluez la solution au 1/10 avec de l'*eau R* avant l'emploi.
– *Solution d'acide citrique*. Dissolvez 10,51 g d'*acide citrique R* dans 1000 mL d'*eau R* et ajustez à pH 4,0 avec une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 400 g/L.
– *Tampon de lavage*. PBS contenant 0,5 g/L de *polysorbate 20 R*.
– *Tampon de blocage diluant*. PBS contenant 0,5 g/L de *polysorbate 20 R* et 25 g/L de lait écrémé desséché..
– *Substrat de peroxydase*. Peu avant l'emploi, dissolvez 10 mg de *2,2′-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) de diammonium R* (ABTS) dans 20 mL de solution d'acide citrique. Immédiatement avant l'emploi, ajoutez 5 µL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R*.

*Mode opératoire*

La description ci-après est donnée à titre d'exemple et d'autres dispositions de plaques peuvent être utilisées. Les puits 1A-H sont utilisés pour le sérum témoin négatif et les puits 2A-H et 12A-H sont utilisés pour le sérum témoin positif (contrôle des performances du titrage). Les puits 3-11A-H sont utilisés pour les échantillons à analyser.

Recouvrez chacun des puits des plaques ELISA avec 100 µL de solution d'anatoxine diphtérique (0,5 Lf/mL dans le tampon carbonate pH 9,6). Laissez reposer à 4 °C en atmosphère humide jusqu'au lendemain. Pour éviter les effets du gradient de température, n'empilez pas plus de 4 plaques l'une sur l'autre. Le lendemain, lavez soigneusement les plaques avec le tampon de lavage. Bloquez les plaques par l'addition de 100 µL de tampon de blocage diluant dans chaque puits. Incubez dans une atmosphère humide à 37 °C pendant 1 h. Lavez les plaques soigneusement avec le tampon de lavage. Placez 100 µL de tampon de blocage diluant dans chaque puits des plaques, à l'exception de ceux de la rangée A. Préparez des dilutions appropriées des sérums témoin négatif et témoin positif (à environ 0,01 UI/mL) et des sérums à examiner. Attribuez le sérum témoin négatif à la colonne 1, le sérum témoin positif aux colonnes 2 et 12, et les sérums à examiner aux colonnes 3-11 et ajoutez 100 µL de chaque sérum aux 2 premiers puits de la colonne à laquelle il est attribué. A l'aide d'une micropipette à dosage multiple, effectuez des séries de dilutions au 1/2 à partir de la rangée B jusqu'à la rangée H en transférant 100 µL au puits suivant. Eliminez 100 µL de la dernière rangée afin que les puits contiennent tous 100 µL. Incubez à 37 °C pendant 2 h. Lavez soigneusement avec le tampon de lavage. Préparez une dilution appropriée (une dilution au 1/2000 a été jugée satisfaisante) de conjugué peroxydase dans le tampon de blocage diluant et ajoutez 100 µL à chaque puits. Incubez à 37 °C dans une atmosphère humide pendant 1 h. Lavez les plaques soigneusement avec le tampon de lavage. Ajoutez 100 µL de substrat de peroxydase à chaque puits. Laissez reposer à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 30 min. Lisez les plaques à 405 nm en respectant l'ordre suivi lors de l'addition du substrat.

**Détermination du titre en anticorps dans du sérum de cobaye par titrage sur cellules Vero**. La méthode utilisée est basée soit sur l'inhibition métabolique (mode opératoire 1), soit sur la cytotoxicité (mode opératoire 2) comme point final, et sur une inspection microscopique (morphologie cellulaire) ou à l'oeil nu (coloration) des cellules.

Le seuil de détection spécifique pour chaque antitoxine se situe habituellement entre 0,015 UI/mL (mode opératoire 1) et 0,05 UI/mL (mode opératoire 2).

Le point final est choisi à la dilution de sérum la plus élevée capable de protéger les cellules contre les effets de la toxine diphtérique. L'activité de l'antitoxine est calculée par rapport au cobaye ou à l'étalon de référence de l'OMS. Elle est exprimée en Unités Internationales par millilitre.

*Réactifs et appareillage*

– *Plaques de culture cellulaire à fond plat* : 96 puits, colonnes 1-12, lignes A-H.
– *Flacons pour culture tissulaire de 75 cm$^2$*.
– *Toxine diphtérique*.
– *Sérum antidiphtérique de cobaye (vaccins pour usage humain)* (sérum témoin positif), obtenu par immunisation de cobayes avec le *vaccin diphtérique adsorbé PBR*.
– *Cellules Vero* (cellules rénales du singe vert). Les cellules des passages P2 à P15 conviennent.

*Mode opératoire 1*. La toxine diphtérique a des effets cytopathogènes sur les cellules Vero qui entraînent une lyse cellulaire. Des anticorps dirigés contre la toxine diphtérique peuvent inhiber cet effet cytopathogène. En conséquence, l'activité d'un vaccin diphtérique peut être déterminée de manière indirecte à l'aide d'un tel système de culture cellulaire en cultivant différentes dilutions de sérum d'animaux immunisés avec une concentration constante en toxine. Dans le titrage sur cellule Vero, une coloration jaune signale des cellules viables, une coloration rouge signale des cellules mortes. Si les cellules ne sont pas toutes mortes, la coloration peut être orange.

*Réactifs et appareillage*

– *MEM modifié*. Milieu de culture MEM (*Minimum Essential Medium*) avec sels de Earle, sans L-glutamine ni bicarbonate de sodium.
– *Milieu 199 modifié*. Milieu 199, avec solution de Hanks et L-glutamine, sans bicarbonate de sodium.
– *Sérum foetal bovin*.
– *Solution de bicarbonate de sodium à 7,5 pour cent*.
– *Solution de trypsine* : solution de trypsine à 2,5 pour cent.
– *Solution EDTA* : solution EDTA à 0,02 pour cent (Versene 1:5000).
– *D-PBS modifié*. Solution tampon de phosphate de Dulbecco (D-PBS), sans calcium ni magnésium.
– *Solution de L-glutamine 200mM*.
– *Solution de pénicilline/streptomycine*.
– *Milieu de culture primaire*. A 50 mL de milieu de culture MEM, ajoutez 440 mL d'*eau R*, 5 mL de solution de L-glutamine 200 mM et 10 mL de solution de bicarbonate de sodium à 7,5 pour cent. A 25 mL de ce milieu, ajoutez 1,25 mL de sérum foetal bovin.
– *Milieu de culture de maintenance*. Semblable au milieu de culture primaire, à l'exception du volume de sérum foetal bovin qui est de 0,5 mL au lieu de 1,25 mL, et qui est ajouté à 20 mL du milieu de culture MEM enrichi.
– *Milieu A*. A 50,0 mL de milieu 199, ajoutez 440,0 mL d'*eau R*, 5,0 mL de solution de L-glutamine 200 mM et 10,0 mL de solution de bicarbonate de sodium à 7,5 pour cent.

– *Milieu B*. A 150,0 mL de milieu A, ajoutez 3,0 mL de sérum foetal bovin et 0,3 mL de solution de pénicilline/streptomycine.
– *Milieu C*. A 22,0 mL de milieu A, ajoutez 0,44 mL de sérum foetal bovin et 0,44 mL de solution de pénicilline/streptomycine.

Les cellules Vero sont cultivées dans des flacons pour culture tissulaire (75 cm$^2$/250 mL, par exemple) dans un incubateur à 36 ± 1 °C, présentant une teneur en $CO_2$ de 5 pour cent et une humidité relative de 90 pour cent. Les cellules Vero sont cultivées en premier lieu dans le milieu de culture primaire. Après 2-3 jours de croissance, le milieu de culture primaire est remplacé par le milieu de culture de maintenance. Si une couche monocellulaire confluente est obtenue, le surnageant de culture est éliminé et la couche cellulaire est lavée doucement avec du D-PBS modifié. Ajouter un mélange de 1 volume de solution de trypsine et de 1 volume de solution EDTA dans le flacon. Agitez doucement le flacon et placez-le dans l'incubateur à $CO_2$ pendant environ 3 min, jusqu'à ce que les cellules commencent à se séparer du tapis cellulaire. Tapotez vigoureusement la paroi du flacon pour faire descendre les cellules. Placez à nouveau les cellules en suspension dans 5-6 mL de milieu C frais de façon à obtenir une suspension homogène. Préparez une suspension cellulaire dans du milieu C contenant environ 1 × 10$^5$ cellules/mL.

Placez 25 µL de milieu B dans chacun des puits, sauf ceux de la colonne 1. Placez 25 µL de sérum antidiphtérique de cobaye (vaccins pour usage humain) (sérum témoin positif) (dilution de travail dans le milieu B de 0,40 UI/mL) dans les puits A1, A2 et A11. Placez 25 µL d'échantillons de sérum de cobaye dans les puits B-G des colonnes 1, 2 et 11. Placez 25 µL de sérum témoin négatif dans les rangées H des colonnes 1, 2 et 11. A l'aide d'une micropipette multicanaux, effectuez des séries de dilutions au 1/2 à travers la plaque (de la colonne 2 jusqu'à la colonne 10 pour les rangées A-G et jusqu'à la colonne 8 pour la rangée H). Jetez 25 µL des puits de la colonne 10 pour les rangées A-G, et du puits H8.

Reconstituez la toxine diphtérique avec la solution saline pour obtenir une solution à 50 UI/mL. Préparez une dilution au 1/50 de cette toxine diphtérique dans le milieu B pour obtenir une solution de travail à 1,0 UI/mL. Ajoutez 25 µL de cette solution de travail aux puits A12 et B12 (toxine témoin). Effectuez une dilution au 1/2 en transférant 25 µL d'un puits au puits suivant, des puits B12 à H12. Changez l'embout entre chaque dilution. Eliminez 25 µL du puits H12. Ajoutez 25 µL de milieu B aux puits B12-H12. Placez ensuite 25 µL de la dilution de travail de toxine (1,0 UI/mL) dans chacun des puits des rangées A-H, des colonnes 1-10, à l'exception des puits H9 et H10 (uniquement des cellules, sans sérum ni toxine).

Couvrez les plaques à l'aide de couvercles ou d'un film plastique et agitez doucement. Incubez les plaques dans un récipient humide dans un incubateur à $CO_2$ à 37 °C pendant au moins 2 h. Ajoutez 200 µL d'une suspension de cellules contenant 1 × 10$^5$ cellules/mL à tous les puits. Couvrez les plaques avec du film plastique. Incubez à 37 °C pendant 5 jours. Recherchez une contamination microbienne par un examen microscopique.

Les puits jaunes sont enregistrés comme étant négatifs et les puits rouges, qui signalent des cellules mortes, sont enregistrés comme étant positifs. Une coloration située entre le jaune et le rouge indique la présence simultanée de cellules viables et mortes et est enregistrée comme étant positive/négative. Les résultats basés sur le changement de coloration peuvent être confirmés en vérifiant la présence des cellules viables et mortes au microscope.

L'activité des échantillons d'immunosérum de cobaye est obtenue en comparant le dernier puits de la préparation de référence présentant une neutralisation complète de la toxine avec le dernier puits de l'échantillon présentant un effet identique. Pour le calcul de l'activité, il ne faut pas oublier que le point final peut se situer entre un puits négatif et un puits positif/négatif.

*Mode opératoire 2*. Le bleu de thiazolyl (MTT) est réduit en dérivé formazan coloré par les cellules viables et il sert ainsi de marqueur quantitatif des cellules vivantes présentes. Une coloration bleue/noire indique la présence de cellules viables du fait de la capacité de la déshydrogénase mitochondriale à réduire le colorant MTT en un dérivé coloré. Les cellules restent vivantes si la toxine est neutralisée par l'antitoxine. Les puits blancs ou incolores indique l'absence de cellules viables due à une quantité d'antitoxine insuffisante pour neutraliser la toxine.

*Réactifs et appareillage*

– *Milieu de culture MEM (Minimum Essential Medium)*.
– *Sérum de veau nouveau-né*.
– *Solution antibiotique* (contenant 10 000 unités de pénicilline, 10 mg de streptomycine et 25 µg d'amphotéricine B par millilitre).
– *Solution de L-glutamine 200mM*.
– *Trypsine-EDTA*.
– *Bleu de thiazolyl (MTT)* [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium].
– *Solution tampon HEPES pH 8,1 1 M*. Dissolvez 18,75 g de HEPES dans 82,5 mL d'*eau R* et 30,0 mL d'*hydroxyde de sodium 2 M R*.
– *Solution de glucose à 10 pour cent*.
– *Milieu de culture complet*. Mélangez 200 mL de milieu de culture MEM avec 10 mL de sérum de veau nouveau-né, 3,0 mL de solution tampon HEPES pH 8,1 1 M, 2,0 mL de solution de glucose à 10 pour cent, 2,0 mL de solution antibiotique et 2,0 mL de solution de L-glutamine 200mM.
– *Solution phosphate saline tamponnée pH 7,4 (PBS)*. Dissolvez 10,0 g de *chlorure de sodium R*, 0,75 g de *chlorure de potassium R*, 1,44 g de *phosphate disodique R* et 0,125 g de *phosphate monopotassique R* dans de l'*eau R*, puis complétez à 1000,0 mL avec le même solvant. Ajustez le pH si nécessaire. Chauffez à l'autoclave à 120 °C pendant 15 min.
– *Solution de bleu de thiazolyl (MTT)*. Dissolvez 0,1 g de bleu de thiazolyl (MTT) dans 20 mL de PBS. Procédez à la stérilisation par filtration (0,2 µm) et conservez dans une bouteille de verre foncé.
– *Solution d'ajustage de pH*. Mélangez 40 mL d'*acide acétique R* avec 1,25 mL d'*acide chlorhydrique 1 M* et 8,75 mL d'*eau R*.
– *Solution tampon d'extraction pH 4,7*. Dissolvez 10 g de *laurylsulfate de sodium R* dans de l'*eau R* et ajoutez 50 mL de *diméthylformamide R*. Complétez à 100 mL avec de l'*eau R*. Ajustez le pH à l'aide d'un volume approprié de solution d'ajustage de pH.

Des cellules Vero sont cultivées dans des flacons pour culture tissulaire (75 cm$^2$/250 mL, par exemple) dans un incubateur à 36 ± 1 °C, présentant une teneur en $CO_2$ de 5 pour cent et une humidité relative de 90 pour cent. Les cellules Vero sont multipliées dans le milieu de culture complet. Après 6-7 jours de croissance, une couche monocellulaire confluente est obtenue. Le surnageant de culture est éliminé et la couche cellulaire est lavée 3 fois avec la trypsine-EDTA : à l'aide d'une pipette, retirez avec précaution le milieu, ajoutez 0,5-1 mL de trypsine-EDTA, agitez le flacon et versez la trypsine hors du flacon. Répétez l'opération une 2$^e$ fois. Au 3$^e$ lavage, placez le flacon dans un incubateur pendant 5 min jusqu'à ce que les cellules commencent à se séparer du tapis cellulaire. Tapotez vigoureusement la paroi du flacon pour faire descendre les cellules. Placez à nouveau les cellules en suspension dans 6-25 mL de milieu de culture complet frais de façon à obtenir une suspension homogène. Préparez une suspension dans le milieu de culture complet contenant environ 4 × 10$^5$ cellules/mL.

Placez 50 µL de milieu de culture complet dans tous les puits à l'exception de ceux de la colonne 1. Placez 100 µL de sérum antidiphtérique de cobaye (vaccins pour usage humain) (sérum témoin positif, dilution de travail 0,12 UI/mL dans le milieu de culture complet) dans le puits A1 et 50 µL dans le puits A11. Placez 100 µL d'échantillons de sérum de cobaye à analyser,

dilué si nécessaire, dans les puits B1-G1. Ajoutez 50 µL du même échantillon aux puits B11-G11 de la rangée correspondante. Placez 100 µL de sérum témoin négatif dans le puits H1 et 50 µL dans le puits H11. A l'aide d'une micropipette multicanaux, effectuez des séries de dilutions au 1/2 en transférant 50 µL d'un puits au puits suivant à travers la plaque (des colonnes 1-10 pour les rangées A-G et des colonnes 1- 8 pour la rangée H).

La toxine diphtérique d'activité et de teneur Lf connues est diluée à une dilution de travail appropriée contenant au moins 4 doses cytopathiques minimales dans le milieu de culture complet. Ajoutez 50 µL de la toxine diluée dans tous les puits, à l'exception des puits H9 et H10 (cellules témoins), des puits A11-H11 (sérum témoin) et des puits A12-H12 (toxine témoin). Ajoutez 100 µL de toxine diluée au puits A12 et effectuez une dilution au 1/2 en transférant 50 µL d'un puits au puits suivant en descendant la plaque (à partir des puits A12-H12). Retirez 50 µL du puits H12. Ajoutez 50 µL de milieu complet aux puits H9 et H10.

Couvrez les plaques à l'aide d'un couvercle ou d'un film plastique et laissez reposer pendant 1 h à température ambiante pour permettre la neutralisation de la toxine. Ajoutez 50 µL d'une suspension cellulaire contenant environ $4 \times 10^5$ cellules/mL dans tous les puits. Scellez les plaques et incubez-les à 37 °C pendant 6 jours. Recherchez une contamination microbienne par un examen microscopique. Ajoutez 10 µL de solution de bleu de thiazolyl (MTT) dans chaque puits. Incubez les plaques à 37 °C pendant 2-4 h supplémentaires. Retirez ensuite le milieu de culture et ajoutez 100 µL de solution de tampon d'extraction pH 4,7 dans chaque puits. Incubez les plaques à 37 °C pendant une nuit pour faciliter le processus d'extraction. Dès que l'extraction et la solubilisation sont achevées, examinez les plaques à l'oeil nu ou effectuez une lecture à 570 nm.

Les puits bleus/noirs sont enregistrés comme étant négatifs (toutes les cellules sont vivantes, neutralisation de la toxine par l'antitoxine) et les puits blancs ou incolores, qui indiquent la présence de cellules mortes (aucune neutralisation de la toxine), sont enregistrés comme étant positifs.

L'activité de l'antitoxine à examiner est obtenue en comparant le dernier puits de préparation d'antitoxine de référence présentant une neutralisation de la toxine avec le dernier puits de préparation d'antitoxine présentant un effet identique. Le titre en anticorps neutralisants de l'échantillon examiné peut être calculé en multipliant le facteur de dilution par le nombre total d'Unités Internationales par millilitre de la préparation de référence au point final. L'essai n'est valable que si toutes les cellules dans le témoin pour la toxine sont mortes et si l'antitoxine de référence entraîne une neutralisation pour au moins les 2 premières dilutions testées.

**01/2008:20707**

## 2.7.7. TITRAGE DE L'ACTIVITÉ DU VACCIN COQUELUCHEUX

L'activité du vaccin coquelucheux est évaluée par détermination de la dose protégeant les souris contre les effets d'une dose létale d'une souche de *Bordetella pertussis*, administrée par voie intracérébrale. La dose protectrice est comparée à celle d'une préparation de référence de vaccin coquelucheux étalonnée en Unités Internationales qui assure la même protection.

L'Unité Internationale correspond à l'activité d'une quantité donnée de l'étalon international ; celui-ci est constitué par du vaccin coquelucheux desséché. La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

**Choix et répartition des animaux d'expérience**. Utilisez des souris saines, âgées de moins de 5 semaines, d'une souche appropriée, provenant d'un groupe homogène. L'écart de masse entre l'animal le plus lourd et l'animal le plus léger ne dépasse pas 5 g. Répartissez les souris en 6 groupes d'au moins 16 et 4 groupes de 10. Les souris doivent être du même sexe ou bien mâles et femelles répartis également entre les groupes.

**Choix de la souche d'épreuve et préparation de la suspension d'épreuve**. Choisissez une souche appropriée de *B. pertussis* entraînant la mort des souris dans les 14 jours qui suivent l'injection effectuée par voie intracérébrale. Si plus de 20 pour cent des souris meurent dans les premières 48 h après l'injection, la souche de *B. pertussis* ne convient pas. Effectuez une subculture et préparez une suspension contenant les bactéries récoltées, dans une solution de pH 7,0 à 7,2 contenant 10 g/L d'*hydrolysat de caséine R* et 6 g/L de *chlorure de sodium R* ou dans une autre solution appropriée. Déterminez l'opacité de la suspension. Préparez une série de dilutions avec la même solution et répartissez-les à raison d'une dilution par groupe de 10 souris. Injectez par voie intracérébrale à chaque souris une dose (0,02 mL ou 0,03 mL) de la dilution attribuée à son groupe. Après 14 jours, comptez le nombre de survivants dans chaque groupe et calculez, à partir de ces valeurs, l'opacité théorique de la suspension qui contient 100 $DL_{50}$ dans chaque dose d'épreuve.

Pour l'essai d'activité du vaccin à examiner, effectuez une nouvelle subculture de la même souche de *B. pertussis*. Récoltez les bactéries et préparez une suspension d'opacité correspondant à 100 $DL_{50}$ environ par dose d'épreuve, puis 3 dilutions de cette suspension.

**Détermination de l'activité du vaccin**. Préparez une série de 3 dilutions du vaccin à examiner et une série de 3 dilutions analogues de la préparation de référence de façon que, dans chaque série, la dilution médiane corresponde à celle qui devrait protéger 50 pour cent environ des animaux contre l'effet létal de la dose d'épreuve de la suspension de *B. pertussis*. Il convient par exemple d'utiliser des doses contenant dans 0,5 mL au plus, 1/8, 1/40 et 1/200 de la dose humaine pour le vaccin à examiner et 0,5 UI, 0,1 UI et 0,02 UI pour la préparation de référence. Répartissez les 6 dilutions à raison d'une dilution par groupe d'au moins 16 souris et injectez par voie intrapéritonéale à chaque souris la dose de la dilution attribuée à son groupe. Après 14 à 17 jours, inoculez, par voie intracérébrale à chaque animal des groupes d'au moins 16 souris, une dose de la suspension d'épreuve. Répartissez la suspension d'épreuve et ses 3 dilutions à raison d'une d'entre elles pour chaque groupe de 10 souris. Inoculez par voie intracérébrale à chaque souris la dose de suspension attribuée à son groupe. Ne tenez pas compte des morts au cours des 48 h suivant l'administration de la dose d'épreuve. Après 14 jours, notez le nombre de souris survivantes dans chacun des groupes. Calculez l'activité du vaccin à examiner par rapport à l'activité de la préparation de référence sur la base du nombre d'animaux survivants dans chaque groupe d'au moins 16 souris.

L'essai n'est valable que si :

– pour le vaccin à examiner et pour la préparation de référence, la dose protectrice 50 pour cent se situe entre la dose la plus faible et la dose la plus forte administrée aux souris,
– le nombre de morts dans les 4 groupes de 10 souris qui ont reçu la suspension d'épreuve et ses dilutions indique que la dose d'épreuve est d'environ 100 $DL_{50}$,
– l'analyse statistique ne révèle aucune déviation de la linéarité ni du parallélisme.

L'essai peut être répété, mais dans ce cas, le calcul de l'activité doit inclure les résultats de tous les essais valables.

**01/2008:20708**
**corrigé 6.0**

## 2.7.8. TITRAGE DE L'ACTIVITÉ DU VACCIN TÉTANIQUE ADSORBÉ

L'activité du vaccin tétanique est déterminée par administration du vaccin aux animaux (cobayes ou souris) suivie soit d'une épreuve virulente au moyen de la toxine tétanique (méthode A

ou B) soit d'une détermination du titre en anticorps dirigés contre l'anatoxine tétanique dans le sérum des cobayes (méthode C). Dans les 2 cas, l'activité du vaccin est calculée par comparaison avec celle d'un vaccin de référence étalonné en Unités Internationales. Pour les méthodes A et B et dans les pays où l'usage de la méthode paralysante n'est pas obligatoire, l'essai par la $DL_{50}$ peut être utilisé. Dans ce cas, le nombre d'animaux et la méthode sont identiques à ceux qui sont décrits pour l'essai par la méthode paralysante. La seule différence réside dans le fait que la fin de l'essai est marquée par la mort et non par la paralysie de l'animal.

L'Unité Internationale correspond à l'activité d'une quantité donnée de l'étalon international d'anatoxine tétanique adsorbée. La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

Le *vaccin tétanique adsorbé PBR* est étalonné en Unités Internationales par rapport à l'étalon international.

La méthode choisie pour le titrage de l'activité du vaccin tétanique adsorbé dépend du rôle du titrage. Les méthodes A ou B sont utilisées :

1. au cours du développement d'un vaccin, pour le titrage des lots produits afin de valider la production ;
2. chaque fois qu'une revalidation est nécessaire, à la suite d'une modification significative du procédé de fabrication.

Les méthodes A ou B peuvent également être utilisées dans le cadre du titrage d'activité de routine de lots de vaccin, mais pour le bien-être des animaux, la méthode C est utilisée chaque fois que possible.

A l'exception des cas précédemment spécifiés aux points 1 et 2, la méthode C peut être utilisée après vérification de la conformité de la méthode pour le produit. A cet effet, un nombre approprié de lots (en général 3) est titré selon la méthode C et selon la méthode A ou B. Si des vaccins différents (monovalents ou combinés) sont préparés à partir d'anatoxines tétaniques de même origine et ayant des niveaux comparables (exprimés en Lf/mL) de la même anatoxine tétanique, il est estimé que la conformité pour le vaccin combiné ayant le plus grand nombre de composants est également valable pour les vaccins combinés comportant moins de composants et pour les vaccins monovalents. Tout vaccin combiné comportant un composant coquelucheux à cellule entière ou comportant le vaccin conjugué haemophilus type b et l'anatoxine tétanique dans le même récipient doit toujours être évalué séparément.

Pour les combinaisons de composants diphtérique et tétanique, le titrage sérologique (méthode C) peut être effectué avec le même groupe d'animaux que celui utilisé pour le titrage sérologique de l'activité du vaccin diphtérique adsorbé (*2.7.6*) lorsque les conditions d'immunisation communes pour les composants diphtérique et tétanique (par exemple doses, durée) sont reconnues satisfaisantes pour le vaccin combiné.

Les titrages décrits ci-après utilisent des dilutions multiples pour la préparation à examiner et la préparation de référence. En fonction des données de l'essai d'activité obtenues lors des essais à dilutions multiples, il peut être envisagé de diminuer le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats statistiquement significatifs en appliquant un modèle simplifié tel que le modèle comportant une seule dilution pour la préparation à examiner et pour la préparation témoin. Un tel modèle permet à l'analyste de déterminer si l'activité de la préparation à examiner est supérieure, de façon significative au minimum requis mais il ne fournit pas d'information sur la linéarité, le parallélisme et la pente significative des courbes dose-réponse. Le modèle simplifié permet une réduction considérable du nombre d'animaux nécessaire et doit être pris en considération par chaque analyste conformément aux dispositions de la Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques.

En cas d'utilisation de titrages à une seule dilution, la reproductibilité dans le temps de la production et de l'essai est contrôlée à l'aide d'indicateurs appropriés et en pratiquant périodiquement un titrage complet à dilutions multiples, par exemple tous les 2 ans. En ce qui concerne les titrages sérologiques, des indicateurs appropriés pour contrôler la reproductibilité de l'essai sont :

- la moyenne et l'écart type des titres relatifs des immunosérums ou des scores des échantillons de sérums obtenus après administration d'une dose déterminée du vaccin de référence ;
- les titres ou les scores antitoxiques des immunosérums des témoins (échantillons de sérum positif et négatif) ;
- le rapport entre les titres ou les scores antitoxiques du sérum témoin positif et des échantillons de sérum correspondant au vaccin de référence.

## MÉTHODE A. ÉPREUVE DE VIRULENCE SUR COBAYES

### *CHOIX ET RÉPARTITION DES ANIMAUX D'EXPÉRIENCE*

Utilisez des cobayes en bonne santé, provenant d'un même élevage, pesant chacun 250-350 g. Les cobayes doivent être du même sexe, sinon mâles et femelles doivent être répartis également entre les groupes. Répartissez-les en au moins 6 groupes égaux : le nombre de cobayes dans chaque groupe doit être suffisant pour obtenir des résultats qui satisfassent aux conditions de validité prescrites ci-après. Si l'activité de la toxine d'épreuve doit être démontrée, ajoutez 3 groupes de 5 cobayes comme témoins non vaccinés.

### *CHOIX DE LA TOXINE D'ÉPREUVE*

Choisissez une toxine tétanique contenant au minimum 50 fois la dose paralysante 50 pour cent par millilitre. S'il a été démontré que la toxine d'épreuve est stable, il n'est pas nécessaire de contrôler l'activité de la solution de toxine d'épreuve lors de chaque titrage.

### *PRÉPARATION DE LA SOLUTION DE TOXINE D'ÉPREUVE*

A partir de cette toxine, préparez immédiatement avant l'emploi, dans un diluant approprié (par exemple une solution tampon saline peptonée pH 7,4), une solution stable de toxine d'épreuve contenant environ 50 doses paralysantes 50 pour cent par millilitre. Si nécessaire, utilisez des solutions diluées aux 1/16, 1/50 et 1/160 dans le même diluant, pour la détermination de l'activité de la toxine.

### *DILUTION DES PRÉPARATIONS À EXAMINER ET DE RÉFÉRENCE*

Préparez, dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, des dilutions du vaccin à examiner et de la préparation de référence de façon que chaque groupe de dilutions constitue une série de raison 2,5 au plus, les dilutions intermédiaires, injectées par voie sous-cutanée à raison de 1,0 mL par cobaye, devant protéger environ 50 pour cent des animaux des effets paralysants provoqués par l'inoculation par voie sous-cutanée de la quantité de toxine tétanique prescrite pour cet essai.

### *IMMUNISATION ET ÉPREUVE*

Répartissez les dilutions à raison d'une dilution pour chaque groupe de cobayes et injectez par voie sous-cutanée à chaque cobaye, 1,0 mL de la dilution attribuée à son groupe. Après 28 jours, inoculez par voie sous-cutanée à chaque animal, 1,0 mL de solution de toxine d'épreuve contenant 50 doses paralysantes 50 pour cent.

### *DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DE LA TOXINE D'ÉPREUVE*

Si nécessaire, attribuez les 3 dilutions de la solution de toxine d'épreuve à raison d'une pour chacun des 3 groupes de 5 cobayes et inoculez par voie sous-cutanée à chaque cobaye dans chaque groupe 1,0 mL de la solution de toxine d'épreuve destinée à son groupe. L'activité et la stabilité de la toxine d'épreuve sont déterminées en effectuant un nombre approprié de déterminations de la dose paralysante 50 pour cent. Il n'est alors pas nécessaire de répéter cette détermination pour chaque titrage.

*LECTURE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS*

Examinez les cobayes 2 fois par jour. Retirez ceux qui présentent des signes spécifiques de paralysie tétanique et euthanasiez-les. 5 jours après l'injection de la toxine d'épreuve, notez le nombre de cobayes exempts de paralysie. Calculez l'activité du vaccin à examiner par rapport à celle de la préparation de référence sur la base de la proportion d'animaux éprouvés exempts de paralysie dans chaque groupe d'animaux vaccinés, en utilisant les méthodes statistiques habituelles (*5.3* par exemple).

*CONDITIONS DE VALIDITÉ*

L'essai n'est valable que si :

- pour le vaccin à examiner et pour la préparation de référence, la dose protectrice 50 pour cent se situe entre la dose la plus faible et la dose la plus forte des préparations administrées aux cobayes,
- dans les cas appropriés, le nombre d'animaux paralysés dans les 3 groupes de 5 cobayes qui ont reçu les dilutions de la solution de toxine d'épreuve indique que la dose d'épreuve est d'environ 50 doses paralysantes 50 pour cent,
- les limites de confiance ($P$ = 0,95) ne sont pas inférieures à 50 pour cent ni supérieures à 200 pour cent de la valeur estimée,
- l'analyse statistique montre que les courbes dose-réponse ont une pente significative et ne révèle aucune déviation de la linéarité ni du parallélisme (si des déviations significatives sont observées, se reporter au chapitre *5.3*).

L'essai peut être répété, mais dans ce cas, le calcul de l'activité doit inclure les résultats de tous les essais valables.

MÉTHODE B. ÉPREUVE DE VIRULENCE SUR SOURIS

*CHOIX ET RÉPARTITION DES ANIMAUX D'EXPÉRIENCE*

Utilisez des souris en bonne santé provenant d'un même élevage, d'une souche reconnue comme appropriée et âgées d'environ 5 semaines. Les souris doivent être du même sexe, sinon mâles et femelles doivent être répartis également entre les groupes. Répartissez-les en au moins 6 groupes égaux : le nombre de souris dans chaque groupe doit être suffisant pour obtenir des résultats qui satisfassent aux conditions de validité prescrites ci-après. S'il n'a pas été démontré que la toxine d'épreuve est stable ou si elle n'est pas standardisée de manière adéquate, ajoutez, pour vérifier son activité, 3 groupes d'au moins 5 souris témoins non vaccinés.

*CHOIX DE LA TOXINE D'ÉPREUVE*

Choisissez une toxine tétanique contenant au minimum 100 fois la dose paralysante 50 pour cent par millilitre. S'il a été démontré que la toxine d'épreuve est stable, il n'est pas nécessaire de contrôler l'activité de la solution de toxine d'épreuve lors de chaque titrage.

*PRÉPARATION DE LA SOLUTION DE TOXINE D'ÉPREUVE*

A partir de cette toxine, préparez immédiatement avant l'emploi dans un diluant approprié (par exemple une solution tampon saline peptonée pH 7,4), une solution stable de toxine d'épreuve contenant environ 50 doses paralysantes 50 pour cent dans 0,5 mL. Si nécessaire, utilisez des solutions diluées aux 1/16, 1/50 et 1/160 dans le même diluant, pour la détermination de l'activité de la toxine.

*DILUTION DES PRÉPARATIONS À EXAMINER ET DE RÉFÉRENCE*

Préparez, dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, des dilutions du vaccin à examiner et de la préparation de référence de façon que chaque groupe de dilutions constitue une série de raison 2,5 au plus, les dilutions intermédiaires, injectées par voie sous-cutanée à raison de 0,5 mL par souris, devant protéger environ 50 pour cent des animaux des effets paralysants provoqués par l'inoculation par voie sous-cutanée de la quantité de toxine tétanique prescrite pour cet essai.

*IMMUNISATION ET ÉPREUVE*

Répartissez les dilutions à raison d'une dilution pour chaque groupe de souris et injectez par voie sous-cutanée à chaque souris 0,5 mL de la dilution attribuée à son groupe. Après 28 jours, inoculez par voie sous-cutanée à chaque animal 0,5 mL de solution de toxine d'épreuve contenant 50 doses paralysantes 50 pour cent.

*DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DE LA TOXINE D'ÉPREUVE*

Si nécessaire, attribuez les 3 dilutions de la solution de toxine d'épreuve, à raison d'une pour chacun des 3 groupes d'au moins 5 souris et inoculez par voie sous-cutanée à chaque souris dans chaque groupe 0,5 mL de la solution de toxine d'épreuve destinée à son groupe.

*LECTURE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS*

Examinez les souris 2 fois par jour. Retirez celles qui présentent des signes spécifiques de paralysie tétanique et euthanasiez-les. 4 jours après l'inoculation de la toxine d'épreuve, notez le nombre de souris exemptes de paralysie. Calculez l'activité du vaccin à examiner par rapport à celle de la préparation de référence sur la base de la proportion d'animaux éprouvés exempts de paralysie dans chaque groupe de souris vaccinées, en utilisant les méthodes statistiques habituelles (*5.3* par exemple).

*CONDITIONS DE VALIDITÉ*

L'essai n'est valable que si :

- pour le vaccin à examiner et pour la préparation de référence, la dose protectrice 50 pour cent se situe entre la dose la plus faible et la dose la plus forte des préparations administrées aux souris ;
- dans les cas appropriés, le nombre d'animaux paralysés dans les 3 groupes d'au moins 5 souris qui ont reçu les dilutions de la solution de toxine d'épreuve indique que la dose d'épreuve est d'environ 50 doses paralysantes 50 pour cent ;
- les limites de confiance ($P$ = 0,95) ne sont pas inférieures à 50 pour cent ni supérieures à 200 pour cent de la valeur estimée ;
- l'analyse statistique montre que les courbes dose-réponse ont une pente significative et ne révèle aucune déviation de la linéarité ni du parallélisme (si des déviations significatives sont observées, se reporter au chapitre *5.3*).

L'essai peut être répété, mais dans ce cas, le calcul de l'activité doit inclure les résultats de tous les essais valables.

MÉTHODE C. DÉTERMINATION DES ANTICORPS CHEZ DES COBAYES

*CHOIX ET RÉPARTITION DES ANIMAUX D'EXPÉRIENCE*

Utilisez des cobayes en bonne santé, provenant d'un même élevage, pesant chacun 250-350 g. Les cobayes doivent être du même sexe, sinon mâles et femelles doivent être répartis également entre les groupes. Répartissez-les en au moins 6 groupes égaux : le nombre de cobayes dans chaque groupe doit être suffisant pour obtenir des résultats qui satisfassent aux conditions de validité décrites ci-après. Utilisez un groupe supplémentaire constitué de cobayes non vaccinés et provenant de la même origine pour fournir un sérum témoin négatif. Si la reproductibilité de l'essai a été démontrée, un sérum témoin négatif de référence peut être utilisé.

*PRÉPARATION DE RÉFÉRENCE*

Utilisez une préparation de référence appropriée telle que le *vaccin tétanique adsorbé PBR* ou un lot de vaccin dont l'efficacité a été démontrée lors des essais cliniques, ou un autre lot représentatif, et qui a été étalonné en Unités Internationales par rapport au *vaccin tétanique adsorbé PBR* ou à l'étalon international d'anatoxine tétanique adsorbée.

*DILUTION DES PRÉPARATIONS À EXAMINER ET DE RÉFÉRENCE*

Préparez, dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, des dilutions en série du vaccin à examiner et de la préparation de référence ; une série de raison 2,5 à 5 s'est avérée

satisfaisante. Utilisez au minimum 3 dilutions, par exemple dans l'intervalle 0,5-16 UI/mL pour chaque série. Utilisez les dilutions pour l'immunisation de préférence dans l'heure qui suit leur préparation. Attribuez une dilution à chaque groupe de cobayes.

*IMMUNISATION*

Injectez à chaque cobaye par voie sous-cutanée 1,0 mL de la dilution attribuée à son groupe.

*PRÉLÈVEMENT SANGUIN*

35-42 jours après l'immunisation, prélevez un échantillon de sang sur chacun des cobayes, vaccinés et témoins, par une méthode appropriée.

*PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS DE SÉRUM*

Evitez les fréquentes congélations et décongélations des échantillons de sérum. Pour éviter une contamination microbienne, il est préférable d'effectuer les manipulations dans une enceinte à flux laminaire.

*DÉTERMINATION DU TITRE EN ANTICORPS*

Déterminez le titre relatif en anticorps ou le score de chaque échantillon de sérum par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). Les méthodes présentées ci-après (titrage par immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA) et inhibition de la liaison de la toxine (ToBI)) ont été jugées satisfaisantes.

*CALCUL DE L'ACTIVITÉ*

Calculez l'activité du vaccin à examiner en Unités Internationales par rapport à la préparation de référence, en utilisant les méthodes statistiques habituelles (*5.3* par exemple).

*CONDITIONS DE VALIDITÉ*

L'essai n'est valable que si :

- les limites de confiance ($P$ = 0,95) ne sont pas inférieures à 50 pour cent ni supérieures à 200 pour cent de la valeur estimée ;
- l'analyse statistique montre que les courbes dose-réponse ont une pente significative et ne révèle aucune déviation de la linéarité ni du parallélisme (si des déviations significatives sont observées, se reporter au chapitre *5.3*).

L'essai peut être répété, mais dans ce cas, le calcul de l'activité doit inclure les résultats de tous les essais valables.

*La section suivante est publiée à titre d'information.*

## Recommandations pour la réalisation du titrage de l'activité du vaccin tétanique adsorbé

MÉTHODE A. ÉPREUVE DE VIRULENCE SUR COBAYES

*LECTURE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS*

Pour réduire la souffrance animale lors de l'essai, il est recommandé de noter le degré de paralysie sur une échelle semblable à celle qui est présentée ci-après. L'échelle fournit des signes typiques pour une injection de la toxine d'épreuve effectuée par voie sous-cutanée dans la région ventrale moyenne, juste derrière le sternum, en pointant l'aiguille vers le cou du cobaye. Le stade T3 est pris comme indicateur de la fin de l'essai, mais avec l'expérience, le stade T3 peut être remplacé par le stade T2. La toxine tétanique produit une paralysie d'au moins 1 patte avant décelable à un stade précoce. Les degrés de paralysie chez le cobaye peuvent être caractérisés à l'aide des signes suivants :

- T1 : légère raideur d'une patte avant, difficile à observer ;
- T2 : parésie d'une patte avant, qui peut toutefois continuer à fonctionner ;
- T3 : paralysie d'une patte avant. L'animal répugne à se mouvoir, le corps est souvent légèrement vouté en raison de la scoliose ;
- T4 : une patte avant est complètement raide et les orteils sont impossibles à bouger. Les contractions musculaires de la patte avant sont très prononcées et on observe généralement une scoliose ;
- T5 : crise tétanique, spasmes toniques continus des muscles ;
- D : mort.

MÉTHODE B. ÉPREUVE DE VIRULENCE SUR SOURIS

*LECTURE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS*

Pour réduire la souffrance animale lors de l'essai, il est recommandé de noter le degré de paralysie sur une échelle semblable à celle qui est présentée ci-après. L'échelle fournit des signes typiques pour une injection de la toxine d'épreuve effectuée dans la région dorsale, près de l'une des pattes arrières. Le stade T3 est pris comme indicateur de la fin de l'essai mais avec l'expérience, le stade T3 peut être remplacé par le stade T2. La toxine tétanique produit une parésie suivie d'une paralysie de la patte arrière à laquelle on a injecté la toxine qui est facilement décelable à un stade précoce. Les degrés de paralysie chez la souris peuvent être caractérisés à l'aide des signes suivants :

- T1 : légère raideur de la patte arrière à laquelle on a injecté la toxine, observée uniquement lorsque la souris est soulevée par la queue ;
- T2 : parésie de la patte arrière à laquelle on a injecté la toxine, mais qui permet encore à l'animal de marcher ;
- T3 : paralysie de la patte arrière à laquelle on a injecté la toxine, qui ne permet plus à l'animal de marcher ;
- T4 : la patte arrière à laquelle on a injecté la toxine est complètement raide et les orteils ne peuvent plus bouger ;
- T5 : crise tétanique, spasmes toniques continus des muscles ;
- D : mort.

MÉTHODE C. DÉTERMINATION DES ANTICORPS CHEZ LE COBAYE

*PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS DE SÉRUM*

Pour la préparation des échantillons de sérum, la technique suivante a été jugée appropriée. Retournez 6 fois les tubes contenant les échantillons de sang et laissez reposer à 37 °C pendant 2 h, puis à 4 °C pendant 2 h. Centrifugez à température ambiante à 800 *g* pendant 20 min. Transférez le sérum dans des tubes stériles et conservez à une température inférieure à – 20 °C. Un rendement d'au moins 40 pour cent de sérum est obtenu selon cette technique.

*DÉTERMINATION DU TITRE EN ANTICORPS*

Les essais ELISA et ToBI présentés ci-après sont donnés à titre d'exemples de méthodes immunochimiques jugées appropriées pour la détermination du titre en anticorps.

**Détermination du titre en anticorps dans du sérum de cobaye par immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA)**. Les dilutions des sérums à examiner et des sérums de référence sont effectuées sur des plaques ELISA recouvertes d'anatoxine tétanique. Un sérum de cobaye témoin positif et un sérum de cobaye témoin négatif sont inclus sur chaque plaque pour contrôler les performances du titrage. Des anticorps de lapin ou de chèvre anti-Ig G de cobaye conjugués à la peroxydase, puis un substrat de peroxydase sont ajoutés. La densité optique est mesurée et le titre relatif en anticorps est calculé à l'aide des méthodes statistiques habituelles (*5.3* par exemple).

*Réactifs et appareillage*

- *Plaques ELISA* : 96 puits, colonnes 1-12, lignes A-H.
- *Sérum de cobaye anti-Clostridium tetani (vaccins pour usage humain) PBR* (sérum témoin positif).
- *Conjugué peroxydase*. Anticorps de lapin ou de chèvre conjugué à de la peroxydase et dirigé contre l'IgG de cobaye.
- *Anatoxine tétanique.*

- *Tampon carbonate pH 9,6*. Dissolvez 1,59 g de *carbonate de sodium anhydre R* et 2,93 g de *bicarbonate de sodium R* dans 1000 mL d'*eau R*. Répartissez dans des bouteilles de 150 mL et stérilisez par chauffage à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min.
- *Solution saline tamponnée phosphate pH 7,4 (PBS)*. Dissolvez en agitant 80,0 g de *chlorure de sodium R*, 2,0 g de *phosphate monopotassique R*, 14,3 g de *phosphate disodique dihydraté R* et 2,0 g de *chlorure de potassium R* dans 1000 mL d'*eau R*. Conservez à température ambiante pour éviter la cristallisation. Diluez la solution au 1/10 avec de l'*eau R* avant l'emploi.
- *Solution d'acide citrique*. Dissolvez 10,51 g d'*acide citrique R* dans 1000 mL d'*eau R* et ajustez à pH 4,0 avec une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 400 g/L.
- *Tampon de lavage*. PBS contenant 0,5 g/L de *polysorbate 20 R*.
- *Tampon de blocage diluant*. PBS contenant 0,5 g/L de *polysorbate 20 R* et 25 g/L de lait écrémé desséché..
- *Substrat de peroxydase*. Peu avant l'emploi, dissolvez 10 mg de *2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) de diammonium R* (ABTS) dans 20 mL de solution d'acide citrique. Immédiatement avant l'emploi, ajoutez 5 µL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R*.

*Mode opératoire*

La description ci-après est donnée à titre d'exemple et d'autres dispositions de plaques peuvent être utilisées. Les puits 1A-H sont utilisés pour le sérum témoin négatif et les puits 2A-H et 12A-H sont utilisés pour le sérum témoin positif (contrôle des performances du titrage). Les puits 3-11A-H sont utilisés pour les échantillons à analyser.

Recouvrez chacun des puits des plaques ELISA avec 100 µL de solution d'anatoxine tétanique (0,5 Lf/mL dans le tampon carbonate pH 9,6). Laissez reposer à 4 °C en atmosphère humide jusqu'au lendemain. Pour éviter les interférences dues au gradient de température, n'empilez pas plus de 4 plaques l'une sur l'autre. Le lendemain, lavez soigneusement les plaques avec le tampon de lavage. Bloquez les plaques par l'addition de 100 µL de tampon de blocage diluant dans chaque puits. Incubez dans une atmosphère humide à 37 °C pendant 1 h. Lavez les plaques soigneusement avec le tampon de lavage. Placez 100 µL de tampon de blocage diluant dans chacun des puits des plaques, à l'exception de ceux de la rangée A. Préparez des dilutions appropriées des sérums témoin négatif et témoin positif (à environ 0,01 UI/mL) et des sérums à examiner. Attribuez le sérum témoin négatif à la colonne 1, le sérum témoin positif aux colonnes 2 et 12, et les sérums à examiner aux colonnes 3-11 et ajoutez 100 µL de chaque sérum aux 2 premiers puits de la colonne à laquelle il est attribué. A l'aide d'une micropipette à dosage multiple, effectuez des séries de dilutions au 1/2 à partir de la rangée B jusqu'à la rangée H en transférant 100 µL au puits suivant. Eliminez 100 µL de la dernière rangée afin que les puits contiennent tous 100 µL. Incubez à 37 °C pendant 2 h. Lavez soigneusement avec le tampon de lavage. Préparez une dilution appropriée (une dilution au 1/2000 a été jugée satisfaisante) de conjugué peroxydase dans le tampon de blocage diluant et ajoutez 100 µL à chaque puits. Incubez à 37 °C dans une atmosphère humide pendant 1 h. Lavez les plaques soigneusement avec le tampon de lavage. Ajoutez 100 µL de substrat de peroxydase à chaque puits. Laissez reposer à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 30 min. Lisez les plaques à 405 nm en respectant l'ordre suivi lors de l'addition du substrat.

**Détermination du titre en anticorps dans du sérum de cobaye par inhibition de la liaison de la toxine ou de l'anatoxine (ToBI)**. La toxine tétanique est ajoutée à des séries de dilutions de sérums à examiner et de sérums de référence ; les mélanges sérum/antigène sont mis en incubation pendant la nuit. Pour déterminer la quantité de toxine ou d'anatoxine libre, les mélanges sont transférés sur une plaque ELISA recouverte d'antitoxine tétanique. De l'IgG antitétanique équine conjuguée à de la peroxydase, puis un substrat de peroxydase sont ajoutés. La densité optique est mesurée et le titre en anticorps est calculé à l'aide des méthodes statistiques habituelles (*5.3* par exemple). Un sérum témoin positif et un sérum témoin négatif sont inclus sur chaque plaque afin de surveiller les performances du titrage.

*Réactifs et appareillage*

- *Plaques de microtitrage en polystyrène rigide, à fond arrondi*.
- *Plaques ELISA à fond plat*.
- *Toxine tétanique ou anatoxine tétanique*.
- *Sérum de cobaye anti-Clostridium tetani (vaccins pour usage humain) PBR* (sérum témoin positif).
- *IgG antitétanique équine*.
- *IgG antitétanique équine conjuguée à de la peroxydase*.
- *Tampon carbonate pH 9,6*. Dissolvez 1,5 g de *carbonate de sodium anhydre R*, 2,39 g de *bicarbonate de sodium R* et 0,2 g d'*azide de sodium R* dans 1000 mL d'*eau R*. Ajustez à pH 9,6 et chauffez à l'autoclave à 121 °C pendant 20 min.
- *Tampon acétate de sodium pH 5,5*. Dissolvez 90,2 g d'*acétate de sodium anhydre R* dans 900 mL d'*eau R*, ajustez à pH 5,5 avec une solution saturée d'*acide citrique monohydraté R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.
- *Solution saline tamponnée phosphate pH 7,2 (PBS)*. Dissolvez 135,0 g de *chlorure de sodium R*, 20,55 g de *phosphate disodique dihydraté R* et 4,80 g de *phosphate monosodique monohydraté R* dans de l'*eau R* et complétez à 15 L avec le même solvant. Chauffez à l'autoclave à 100 °C pendant 60 min.
- *Tampon diluant*. PBS contenant 5 g/L d'*albumine bovine R* et 0,5 g/L de *polysorbate 80 R*.
- *Tampon bloquant*. PBS contenant 5 g/L d'*albumine bovine R*.
- *Solution de tétraméthylbenzidine*. Solution de *tétraméthylbenzidine R* à 6 g/L dans de l'*éthanol à 96 pour cent R*. La substance se dissout en 30-40 min à température ambiante.
- *Substrat de peroxydase*. Mélangez 90 mL d'*eau R*, 10 mL de tampon acétate de sodium pH 5,5, 1,67 mL de solution de tétraméthylbenzidine et 20 µL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R*.
- *Solution de lavage*. Eau courante contenant 0,5 g/L de *polysorbate 80 R*.

*Mode opératoire*

Bloquez les plaques de microtitrage, en plaçant dans chaque puits 150 µL de tampon bloquant. Couvrez les plaques à l'aide d'un couvercle ou d'un film plastique. Incubez en atmosphère humide à 37 °C pendant 1 h. Lavez les plaques soigneusement avec la solution de lavage. Placez 100 µL de PBS dans chaque puits. Placez 100 µL d'antitoxine tétanique de cobaye de référence dans le premier puits d'une rangée. Placez 100 µL de sérums à examiner non dilués dans le premier puits du nombre requis de rangées. A l'aide d'une micropipette à dosage multiple, effectuez des séries de dilutions au 1/2 à travers la plaque (jusqu'à la colonne 10), par transfert de 100 µL au puits suivant. Eliminez 100 µL de la dernière colonne afin que les puits contiennent tous 100 µL. Préparez une solution de toxine ou d'anatoxine tétanique à 0,1 Lf/mL en utilisant le PBS comme diluant. Ajoutez 40 µL de cette solution dans tous les puits, à l'exception de ceux de la colonne 12. Les puits de la colonne 11 sont un témoin positif. Ajoutez 40 µL de PBS aux puits de la colonne 12 (témoin négatif). Agitez doucement les plaques et placez un couvercle sur chaque plaque. Recouvrez les plaques ELISA : immédiatement avant emploi, effectuez une dilution appropriée d'IgG antitétanique équine dans le tampon carbonate pH 9,6 et ajoutez 100 µL de cette solution dans tous les puits. Placez un couvercle sur chaque plaque. Incubez les 2 séries de plaques pendant la nuit en atmosphère humide à 37 °C. Pour éviter les effets du gradient de température, n'empilez pas plus de 4 plaques l'une sur l'autre. Le lendemain,

lavez les plaques ELISA soigneusement avec la solution de lavage. Bloquez les plaques en plaçant dans chaque puits 125 µL de tampon bloquant. Incubez à 37 °C en atmosphère humide pendant 1 h. Lavez les plaques soigneusement avec la solution de lavage. Transférez 100 µL du mélange de pré-incubation des plaques de polystyrène vers les puits correspondant des plaques ELISA, en commençant par la colonne 12, puis en allant des colonnes 1 à 11. Placez un couvercle sur chaque plaque. Incubez à 37 °C en atmosphère humide pendant 2 h. Lavez les plaques ELISA soigneusement avec la solution de lavage. Effectuez une dilution appropriée (une dilution au 1/4000 a été jugée satisfaisante) de l'IgG antitétanique équine conjuguée à de la peroxydase dans le tampon diluant. Ajoutez 100 µL de la dilution dans chaque puits et placez un couvercle sur chaque plaque. Incubez à 37 °C en atmosphère humide pendant 1,5 h. Lavez les plaques ELISA soigneusement avec la solution de lavage. Ajoutez 100 µL de substrat de peroxydase dans chaque puits. Il se forme une coloration bleue. Incubez les plaques à température ambiante. Arrêtez la réaction à un temps donné (dans les 10 min) en ajoutant 100 µL d'*acide sulfurique 2 M* dans chaque puits, dans le même ordre que pour l'addition du substrat. La coloration vire du bleu au jaune. Mesurez l'absorbance à 450 nm immédiatement après l'addition de l'acide sulfurique ou maintenez les plaques dans l'obscurité jusqu'à la mesure.

**07/2009:20709**

# 2.7.9. ESSAI DE LA FONCTION Fc DE L'IMMUNOGLOBULINE

*L'essai de la fonction Fc de l'immunoglobuline est effectué par la méthode A ou B. La méthode B est une adaptation de la méthode A, pour l'utilisation de plaques de microtitrage dans la mesure de l'hémolyse médiée par le complément. Les différences de mode opératoire entre les méthodes A et B sont indiquées dans le texte.*

RÉACTIFS

*Sang humain stabilisé.* Recueillez du sang humain de groupe O sur une solution anticoagulante ACD. Conservez le sang stabilisé à 4 °C pendant 3 semaines au maximum.

*Solution saline tamponnée phosphate pH 7,2.* Dissolvez 1,022 g de *phosphate disodique anhydre R*, 0,336 g de *phosphate monosodique anhydre R* et 8,766 g de *chlorure de sodium R* dans 800 mL d'*eau R* et complétez à 1000 mL avec le même solvant.

*Solution mère de magnésium et de calcium.* Dissolvez 1,103 g de *chlorure de calcium R* et 5,083 g de *chlorure de magnésium R* dans de l'*eau R* et complétez à 25 mL avec le même solvant.

*Solution mère de tampon barbital.* Dissolvez 207,5 g de *chlorure de sodium R* et 25,48 g de *barbital sodique R* dans 4000 mL d'*eau R* et ajustez à pH 7,3 avec de l'*acide chlorhydrique 1 M*. Ajoutez 12,5 mL de solution mère de magnésium et de calcium et complétez à 5000 mL avec de l'*eau R*. Conservez à 4 °C dans un récipient transparent.

*Solution tampon albumine-barbital.* Dissolvez 0,150 g d'*albumine bovine R* dans 20 mL de solution mère de tampon barbital et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*. Préparez immédiatement avant l'emploi.

*Solution d'acide tannique.* Dissolvez 10 mg d'*acide tannique R* dans 100 mL de solution saline tamponnée phosphate pH 7,2. Préparez immédiatement avant l'emploi.

*Complément de cobaye.* Mélangez les sérums préparés à partir du sang de 10 cobayes au moins. Séparez le sérum du sang coagulé par centrifugation à 4 °C environ. Conservez le sérum en petites quantités à une température inférieure à – 70 °C. Immédiatement avant de commencer l'hémolyse à l'aide du complément, diluez à 125-200 $CH_{50}$ par millilitre avec la solution tampon albumine-barbital et maintenez la solution diluée dans un bain de glace pendant l'essai.

*Antigène rubéoleux.* Antigène approprié pour les titrages de l'inhibition d'hémagglutination. Titre > 256 unités HA.

**Traitement des érythrocytes à l'acide tannique**. Séparez les érythrocytes par centrifugation d'un volume approprié de sang humain stabilisé. Lavez les érythrocytes 3 fois au moins avec la solution saline tamponnée phosphate pH 7,2 puis mettez-les en suspension à 2 pour cent *V/V* dans la solution saline tamponnée phosphate pH 7,2. Ajoutez 0,2 mL de solution d'acide tannique à 14,8 mL de solution saline tamponnée phosphate pH 7,2 ; mélangez 1 volume de cette dilution, récemment préparée, et 1 volume de la suspension d'érythrocytes, puis faites incuber à 37 °C pendant 10 min. Recueillez les cellules traitées à l'acide tannique par centrifugation (800 *g* pendant 10 min), jetez le surnageant et lavez les érythrocytes 1 fois avec la solution saline tamponnée phosphate pH 7,2. Remettez les érythrocytes en suspension à 1 pour cent *V/V* dans la solution saline tamponnée phosphate pH 7,2.

**Addition de l'antigène aux érythrocytes**. Prélevez un volume approprié $V_s$ d'érythrocytes traités à l'acide tannique, ajoutez 0,2 mL d'antigène rubéoleux par 1,0 mL d'érythrocytes et faites incuber à 37 °C pendant 30 min. Recueillez les cellules par centrifugation (800 *g* pendant 10 min) et jetez le surnageant. Ajoutez un volume de solution tampon albumine-barbital égal au volume de surnageant jeté, remettez les érythrocytes en suspension, recueillez-les comme décrit ci-dessus et répétez le lavage. Remettez les érythrocytes en suspension avec un volume de solution tampon albumine-barbital correspondant aux 3/4 de $V_s$ ; on obtient ainsi le volume initial $V_i$. Mélangez 900 µL de solution tampon albumine-barbital et 100 µL de $V_i$, qui est ainsi réduit au volume résiduel $V_r$, et déterminez l'absorbance initiale à 541 nm (*A*). Diluez $V_r$ par un facteur égal à *A* à l'aide de solution tampon albumine-barbital. On obtient ainsi le volume final ajusté $V_f = V_r \times A$ d'érythrocytes humains sensibilisés et une valeur pour *A* de 1,0 ± 0,1 dans le cas d'une dilution au 1/10.

**Liaison de l'anticorps aux érythrocytes traités à l'acide tannique et couverts d'antigène**. Préparez les solutions suivantes successivement et en double. Utilisez une cuve semi-micro (par exemple, des cuves à usage unique) ou un tube à essai pour chaque solution.

(1) *Solutions à examiner.* Si nécessaire, ajustez l'immunoglobuline à examiner à pH 7.

Si l'essai est effectué par la méthode A, préparez avec la solution tampon albumine-barbital des dilutions de la préparation à examiner contenant respectivement 30 mg et 40 mg d'immunoglobuline, puis complétez à 900 µL avec la solution tampon albumine-barbital.

Si l'essai est effectué par la méthode B, préparez avec la solution tampon albumine-barbital des dilutions de la préparation à examiner contenant respectivement 15 mg et 30 mg d'immunoglobuline, puis complétez à 1200 µL avec la solution tampon albumine-barbital.

(2) *Solutions de référence.* Préparez les solutions comme décrit pour les solutions à examiner, à partir de l'*immunoglobuline humaine PBR*.

(3) *Témoin complément.* Solution tampon albumine-barbital.

Si l'essai est effectué par la méthode A, ajoutez à chaque cuve/tube à essai 100 µL d'érythrocytes humains sensibilisés et mélangez soigneusement. Laissez reposer pendant 15 min, ajoutez 1000 µL de solution tampon albumine-barbital, recueillez les érythrocytes par centrifugation (1000 *g* pendant 10 min) de la cuve/tube à essai et enlevez 1900 µL du surnageant. Ajoutez 1900 µL de solution tampon albumine-barbital et répétez le lavage en laissant un volume final de 200 µL. Les échantillons peuvent être conservés à 4 °C, dans les cuves/tubes à essai scellés, pendant 24 h au maximum.

Si l'essai est effectué par la méthode B, ajoutez à chaque tube à essai 300 μL d'érythrocytes humains sensibilisés et mélangez soigneusement (la concentration finale d'immunoglobuline est dans une fourchette de 10-20 mg/mL). Laissez reposer pendant 15 min, puis ajoutez 1500 μL de solution tampon albumine-barbital et agitez doucement pour bien homogénéiser. Séparez les érythrocytes par centrifugation (1000 *g* pendant 10 min) et jetez le surnageant, puis ajoutez environ 3 mL de solution tampon albumine-barbital. Répétez cette opération jusqu'à 4 fois en tout, en laissant un volume final de 300 μL. Les échantillons peuvent être conservés à 4 °C, dans les tubes à essai scellés, pendant 24 h au maximum.

**Hémolyse provoquée par le complément**

Pour mesurer l'hémolyse lorsque l'essai est effectué par la méthode A, ajoutez 600 μL de solution tampon albumine-barbital chauffée à 37 °C à l'échantillon à examiner, remettez les érythrocytes en suspension avec précaution en les pipettant plusieurs fois (5 fois au moins) et placez la cuve dans le porte-échantillon d'un spectrophotomètre muni d'un thermostat. Après 2 min, ajoutez 200 μL de complément de cobaye dilué à 125-200 $CH_{50}$/mL, mélangez soigneusement en pipettant le mélange 2 fois puis commencez immédiatement l'enregistrement de l'absorbance à 541 nm en fonction du temps, en utilisant la solution tampon albumine-barbital comme liquide de compensation. Arrêtez l'enregistrement si la courbe de l'absorbance en fonction du temps a clairement dépassé le point d'inflexion.

Pour mesurer l'hémolyse lorsque l'essai est effectué par la méthode B, ajoutez dans chaque tube à essai 900 μL de solution tampon albumine-barbital chauffée à 37 °C, et remettez les érythrocytes en suspension avec précaution en pipettant plusieurs fois (5 fois au moins). La plaque de microtitrage doit être préchauffée à 37 °C. Placez 240 μL de chaque solution dans 4 puits de la plaque puis incubez à 37 °C pendant 6 min, en agitant doucement toutes les 10 s. Ajoutez ensuite dans chaque puits 60 μL de complément de cobaye dilué à 150 $CH_{50}$/mL. Mélangez pendant 10 s et commencez immédiatement l'enregistrement de l'absorbance à 541 nm, en maintenant à 37 °C et en effectuant une mesure toutes les 20 s. Arrêtez l'enregistrement si la courbe de l'absorbance en fonction du temps a clairement dépassé le point d'inflexion.

**Evaluation**. Déterminez, pour chaque cuve/tube à essai/puits, la pente $S$ de la courbe d'hémolyse au point d'inflexion approximatif : délimitez sur la courbe dans la partie à plus forte pente des sections par intervalle de temps approprié (par exemple, $\Delta t$ = 1 min) et calculez $S$, exprimé en $\Delta A$ par minute, entre les points d'intersection adjacents. Trouvez la valeur maximale de la pente $S_{exp}$. Déterminez l'absorbance de départ $A_s$ par extrapolation de la courbe, qui est presque linéaire et parallèle à l'axe du temps dans les premières minutes de l'enregistrement. Corrigez $S_{exp}$ selon l'expression :

$$S' = \frac{S_{\text{exp}}}{A_s}$$

Calculez la moyenne arithmétique des valeurs de $S'$ pour chaque préparation (solution à examiner et solution de référence). Calculez l'indice de la fonction Fc ($I_{Fc}$) à partir de l'expression :

$$I_{Fc} = \frac{100 \times \left(\overline{S'} - \overline{S'}_c\right)}{\overline{S'_s} - \overline{S'}_c}$$

$\overline{S'}$ = moyenne arithmétique de la pente corrigée pour la préparation à examiner,

$\overline{S'_s}$ = moyenne arithmétique de la pente corrigée pour la préparation de référence,

$\overline{S'_c}$ = moyenne arithmétique de la pente corrigée pour le témoin complément.

Calculez l'indice de la fonction Fc de la préparation à examiner. La valeur n'est pas inférieure à celle indiquée dans le feuillet qui accompagne la préparation de référence.

**01/2008:20710**

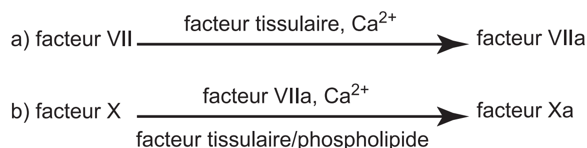
# 2.7.10. DOSAGE DU FACTEUR VII DE COAGULATION HUMAIN

Le dosage du facteur VII de coagulation humain s'effectue par mesure de son activité biologique, c'est-à-dire par mesure de la capacité du complexe de facteur VIIa/facteur tissulaire à activer le facteur X en présence d'ions calcium et de phospholipides. L'activité d'une préparation du facteur VII est estimée par comparaison des quantités respectives de cette préparation et de l'étalon international, ou d'une préparation de référence étalonnée en Unités Internationales, qui sont nécessaires pour obtenir une vitesse donnée de formation du facteur Xa dans un milieu de réaction contenant les différentes substances intervenant dans l'activation du facteur X.

L'Unité Internationale d'activité du facteur VII correspond à l'activité d'une quantité donnée de l'étalon international, qui est constitué actuellement par du plasma cryodesséché. La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

Le *concentré de facteur VII de coagulation humain PBR* est étalonné en Unités Internationales par rapport à l'étalon international.

Le dosage chromogène comporte 2 étapes successives : l'activation du facteur X, sous l'action du facteur VIIa, dans un mélange réactif contenant du facteur tissulaire, des phospholipides et l'ion calcium, puis le clivage enzymatique d'un substrat chromogène par le facteur Xa, qui libère un chromophore quantifiable par spectrophotométrie. Dans des conditions de dosage appropriées, il existe une relation linéaire entre la vitesse de formation du facteur Xa et la concentration du facteur VII. Le schéma suivant résume le principe du dosage.







Les 2 étapes mettent en oeuvre des réactifs disponibles dans le commerce auprès de divers fournisseurs. Bien que la composition de ces réactifs puisse légèrement varier, leurs caractéristiques essentielles sont décrites dans les spécifications qui suivent.

RÉACTIFS

Le mélange réactif de facteurs de coagulation contient notamment des protéines purifiées d'origine humaine ou bovine, à savoir le facteur X, la thromboplastine et le facteur tissulaire phospholipidique en tant qu'activateur du facteur VII. Ces protéines sont partiellement purifiées et ne contiennent pas d'impuretés susceptibles d'interférer dans l'activation du facteur VII ou du facteur X. Le facteur X est présent en quantité telle que sa concentration finale lors de l'étape d'activation soit de 10-350 nmol/l, et de préférence de 14-70 nmol/l. La thromboplastine utilisée, qui peut être d'origine naturelle (cerveau de boeuf ou de lapin) ou synthétique, doit convenir à la détermination du temps de Quick. Elle est diluée de 5 à 50 fois à l'aide d'un tampon de façon que la concentration finale de $Ca^{2+}$ soit de 15-25 mmol/L. L'étape finale de formation du facteur Xa est conduite dans une solution contenant de l'albumine humaine ou bovine à une concentration qui prévient les pertes par adsorption et convenablement tamponnée, à un pH compris entre 7,3 et 8,0. Le facteur VII doit être le seul facteur limitant

la formation du facteur Xa dans le mélange d'incubation final et aucun des composants réactifs du mélange ne doit avoir la capacité seul de provoquer la formation du facteur Xa.

La seconde étape consiste en la quantification du facteur Xa formé à l'étape précédente, au moyen d'un substrat chromogène spécifique du facteur Xa. Ce substrat est généralement un peptide court de 3 à 5 acides aminés, lié à un groupement chromophore. La libération de ce groupement à partir du substrat peptidique entraîne un déplacement du maximum d'absorbance vers une longueur d'onde permettant sa quantification par spectrophotométrie. Le substrat est généralement dissous dans l'*eau R* et utilisé à une concentration finale de 0,2-2 mmol/L. Il peut également comprendre des inhibiteurs appropriés empêchant la poursuite de la formation du facteur Xa (addition d'édétate).

MODE OPÉRATOIRE

Reconstituez le contenu entier d'une ampoule de la préparation de référence et de la préparation à examiner en ajoutant la quantité d'*eau R* voulue et utilisez les préparations reconstituées dans l'heure qui suit. Ajoutez aux préparations reconstituées la quantité de prédiluant requise pour obtenir des solutions à 0,5-2,0 UI de facteur VII par millilitre.

Préparez les dilutions suivantes de la préparation de référence et de la préparation à examiner au moyen d'une solution tampon isotonique sans agent de chélation, contenant 1 pour cent d'albumine humaine ou bovine, et de préférence tamponnée à pH 7,3-8,0. Préparez pour chacune des deux préparations au moins 3 dilutions séparées et indépendantes, de préférence en double. La concentration en facteur VII de ces dilutions doit être ajustée de façon que la concentration finale en facteur VII soit inférieure à 0,005 UI/mL.

Préparez également un témoin contenant l'ensemble des constituants du mélange réactif, à l'exception du facteur VII.

*Toutes les dilutions doivent être préparées dans des tubes en plastique et utilisées dans un délai de 1 h.*

**Etape 1**. A chacune des dilutions, obtenues à partir de la préparation de référence et de la préparation à examiner, ajoutez un volume approprié du réactif de coagulation préchauffé (ou d'un mélange de ses constituants séparés), mélangez et mettez à incuber à 37 °C dans des tubes en plastique ou les cupules d'une microplaque. La concentration des différents constituants pendant la formation du facteur Xa doit être telle que spécifiée plus haut sous Réactifs.

Laissez se dérouler la réaction d'activation du facteur X pendant un temps approprié ; l'arrêt de la réaction doit de préférence intervenir avant que la concentration en facteur Xa ait atteint son niveau maximum, afin que la courbe dose-réponse présente une linéarité satisfaisante. Le temps de réaction est également choisi de façon que la condition de linéarité de la courbe de production du facteur Xa en fonction du temps soit satisfaite. Il est généralement de l'ordre de 2 min à 5 min, mais certaines variations sont admissibles si elles donnent une linéarité acceptable de la courbe dose-réponse.

**Etape 2**. Arrêtez la réaction d'activation par addition du mélange réactif contenant le substrat chromogène. La vitesse de clivage du substrat, qui doit être proportionnelle à la concentration du facteur Xa, est déterminée par mesure, à l'aide d'un spectrophotomètre, de la variation d'absorbance à une longueur d'onde appropriée. On peut soit mesurer l'absorbance en continu, ce qui permet de calculer la vitesse initiale de clivage du substrat, soit interrompre la réaction d'hydrolyse au bout d'un temps approprié en abaissant le pH à l'aide d'un réactif approprié tel que de l'acide acétique à 500 g/L de $C_2H_4O_2$ ou une solution tampon citratée pH 3 (1 mol/L). Ajustez le temps d'hydrolyse de façon que la condition de linéarité de la courbe de formation du chromophore en fonction du temps soit satisfaite. Ce temps est généralement de l'ordre de 3 min à 15 min, mais certaines variations sont tolérées si elles permettent d'améliorer la linéarité de la courbe dose-réponse.

Vérifiez la validité du titrage et calculez l'activité de la préparation à examiner par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple).

**01/2008:20711**

## 2.7.11. DOSAGE DU FACTEUR IX DE COAGULATION HUMAIN

Le principe de ce dosage repose sur la mesure de la capacité d'une préparation de facteur IX à réduire le temps de coagulation prolongé d'un plasma déficient en facteur IX. La réaction est accélérée par addition d'un réactif contenant des phospholipides et un activateur de contact tel que le kaolin, la silice ou l'acide ellagique. L'activité est évaluée par comparaison de la courbe dose-réponse obtenue avec la préparation à examiner à celle obtenue avec une préparation de référence étalonnée en Unités Internationales.

L'Unité Internationale d'activité du facteur IX correspond à l'activité d'une quantité donnée de l'étalon international, qui est constitué par un concentré cryodesséché de facteur IX de coagulation humain. L'équivalence en Unité Internationale de l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

Le *concentré de facteur IX de coagulation humain PBR* est étalonné en Unités Internationales par rapport à l'étalon international.

Reconstituez séparément la préparation à examiner et la préparation de référence selon les indications figurant sur l'étiquette et utilisez-les immédiatement. Si la préparation à examiner contient de l'héparine, déterminez-en la quantité (*2.7.12*) et neutralisez-la, par exemple par addition de *sulfate de protamine R* (10 µg de sulfate de protamine neutralisent 1 UI d'héparine). Diluez au préalable la préparation à examiner et la préparation de référence avec du plasma déficient en facteur IX (par exemple du *substrat de plasma R2*) pour obtenir des solutions à 0,5-2,0 UI/mL. Préparez, avec une solution tampon appropriée (par exemple une *solution tampon imidazole pH 7,3 R*) contenant 10 g/L d'albumine bovine ou humaine, au moins 3 séries de dilutions appropriées pour chaque matière, de préférence en double . Ces dilutions doivent être utilisées immédiatement.

Utilisez un appareil adapté à la mesure des temps de coagulation ou effectuez le dosage avec des tubes à incubation maintenus dans un bain-marie à 37 °C. Dans chaque tube, introduisez 0,1 mL de plasma déficient en facteur IX (par exemple du *substrat de plasma R2*) et 0,1 mL d'une des dilutions de la préparation de référence ou de la préparation à examiner. Ajoutez à chaque tube 0,1 mL d'un réactif APTT (temps de thromboplastine partielle activée) approprié, contenant des phospholipides et un activateur de contact, puis incubez à 37 °C pendant une durée recommandée. Ajoutez à chaque tube 0,1 mL d'une solution de *chlorure de calcium R* à 3,7 g/L chauffée au préalable à 37 °C. A l'aide d'un chronomètre, mesurez le temps de coagulation, c'est-à-dire l'intervalle de temps qui sépare l'addition du chlorure de calcium du premier signe de formation de fibrine. Les volumes indiqués plus haut peuvent être adaptés en fonction du réactif APTT et de l'appareil utilisés. Calculez l'activité par les méthodes statistiques habituelles (voir chapitre *5.3* par exemple).

01/2008:20712

## 2.7.12. DOSAGE DE L'HÉPARINE DANS LES FACTEURS DE COAGULATION

L'héparine est dosée sous sa forme complexée à l'antithrombine III (AT) via son inhibition de l'activité du facteur Xa de coagulation. Un excès d'AT est maintenu dans le mélange réactionnel pour garantir une concentration constante en complexe héparine-AT. Le facteur Xa est neutralisé par le complexe héparine-AT et le facteur Xa résiduel hydrolyse un substrat chromogène peptidique spécifique en libérant un chromophore. La quantité du chromophore est inversement proportionnelle à l'activité de l'héparine.

*Substrat chromogène pour facteur Xa.* Substrat chromogène spécifique du facteur Xa tel que : chlorhydrate de *N*-benzoyl-L-isoleucyl-L-glutamyl-glycyl-L-arginine-4-nitroanilide. Reconstituez suivant les instructions du fabricant.

*Tampon de dilution.* Solution de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* à 6,05 g/L. Ajustez si nécessaire à pH 8,4 avec de l'*acide chlorhydrique R*.

*Solution à examiner.* Diluez la préparation à examiner à l'aide du tampon de dilution de façon à obtenir une solution supposée contenir 0,1 UI d'héparine par millilitre.

*Solution témoin.* Diluez la préparation de référence d'héparine à l'aide du tampon de dilution de façon à obtenir une solution contenant 0,1 UI d'héparine par millilitre.

Les conditions décrites sont applicables aux plaques de microtitrage. Si le dosage est réalisé dans des tubes, ajustez les volumes de façon à maintenir les proportions dans le mélange.

Peu de temps avant l'essai, portez toutes les solutions à 37 °C dans un bain-marie.

Distribuez dans une série de puits, 20 µL de plasma humain normal et 20 µL d'une *solution d'antithrombine III R1*. Ajoutez aux puits une série de volumes (20 µL, 60 µL, 100 µL et 140 µL) de la solution à examiner ou de la solution témoin et complétez le volume de chaque puits à 200 µL en utilisant du tampon de dilution (0,02-0,08 UI d'héparine par milllilitre dans le mélange réactionnel final).

*Méthode point final.* Transférez 40 µL de chaque puits dans une deuxième série de puits, ajoutez 20 µL de *solution de facteur Xa bovin R* et incubez à 37 °C pendant 30 s. Ajoutez 40 µL de solution de substrat chromogène de facteur Xa à 1 mmol/L et incubez à 37 °C pendant 3 min. Arrêtez la réaction en abaissant le pH à l'aide d'un réactif approprié tel qu'une solution à 20 pour cent *V/V* d'*acide acétique glacial R* mesurez l'absorbance à 405 nm (*2.2.25*). Le temps de réaction est généralement de l'ordre de 3 min à 15 min mais certaines variations sont tolérées si elles permettent d'améliorer la linéarité de la courbe dose-réponse.

*Méthode cinétique.* Transférez 40 µL de chaque puits dans une deuxième série de puits, ajoutez 20 µL de *solution de facteur Xa bovin R* et incubez à 37 °C pendant 30 s. Ajoutez 40 µL de solution de substrat chromogène de facteur Xa à 2 mmol/L, incubez à 37 °C et déterminez la vitesse de clivage du substrat en mesurant en continu la variation d'absorbance à 405 nm (*2.2.25*), permettant ainsi de calculer la vitesse initiale de clivage du substrat. Cette vitesse doit être proportionnelle à la concentration en facteur Xa résiduel.

Vérifiez la validité du titrage et calculez l'activité de l'héparine de la préparation à examiner par les méthodes statistiques habituelles pour le modèle à rapport de pente (*5.3*, par exemple).

01/2008:20713

## 2.7.13. DOSAGE DE L'IMMUNOGLOBULINE HUMAINE ANTI-D

PROCÉDÉ A

L'activité de l'immunoglobuline humaine anti-D est évaluée par comparaison de la quantité nécessaire pour produire l'agglutination d'érythrocytes D-positifs avec la quantité d'une préparation de référence, étalonnée en Unités Internationales, nécessaire pour produire le même effet.

L'Unité Internationale correspond à l'activité d'une quantité donnée de la préparation internationale de référence. La correspondance entre l'Unité Internationale et la préparation internationale de référence est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

L'*immunoglobuline humaine anti-D PBR* est étalonnée en Unités Internationales par rapport à l'étalon international et est destinée à être utilisée dans le dosage de l'immunoglobuline humaine anti-D.

Utilisez un mélange d'érythrocytes D-positifs, prélevés au maximum 7 jours auparavant et conservés dans des conditions appropriées, obtenu à partir d'au moins 4 donneurs de groupe O $R_1R_1$. A un volume approprié d'érythrocytes lavés au préalable à 3 reprises avec une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, ajoutez un volume égal de *solution de bromélaïnes R*, laissez reposer à 37 °C pendant 10 min, centrifugez, éliminez le surnageant et lavez les érythrocytes à 3 reprises avec une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L. Mettez en suspension 20 volumes de ces érythrocytes dans un mélange de 15 volumes de sérum inerte, de 20 volumes d'une solution d'*albumine bovine R* à 300 g/L et de 45 volumes d'une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L. Placez la suspension dans de l'eau glacée sous agitation continue.

A l'aide d'un appareil à dilution automatique étalonné, préparez les dilutions appropriées de la préparation à examiner et de la préparation de référence dans une solution contenant 5 g/L d'*albumine bovine R* et 9 g/L de *chlorure de sodium R*.

Utilisez un appareil approprié à l'analyse automatique en continu. Généralement, le protocole suivant convient : maintenez la température à 15,0 °C dans les tubulures, à l'exception des spirales d'incubation. A l'aide de la pompe, introduisez dans les tubulures d'admission de l'appareil la suspension d'érythrocytes à un débit de 0,1 mL/min et une solution de *méthylcellulose 450 R* à 3 g/L à un débit de 0,05 mL/min. Introduisez les dilutions de la préparation à examiner et de la préparation de référence à un débit de 0,1 mL/min pendant 2 min, puis le diluant à un débit de 0,1 mL/min pendant 4 min avant d'introduire la dilution suivante.

Introduisez de l'air à un débit de 0,6 mL/min. Incubez à 37 °C pendant 18 min, puis dispersez les rouleaux par introduction, à un débit de 1,6 mL/min, d'une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L contenant un agent mouillant approprié (par exemple, du *polysorbate 20 R* à une concentration finale de 0,2 g/L) afin d'éviter de rompre la continuité des bulles. Laissez déposer les agglutinats et séparez à 2 reprises, la première fois à 0,4 mL/min et la deuxième fois à 0,6 mL/min. Lysez les érythrocytes non agglutinés à l'aide d'une solution contenant 5 g/L d'*octoxinol 10 R*, 0,2 g/L de *ferricyanure de potassium R*, 1 g/L de *bicarbonate de sodium R* et 0,05 g/L de *cyanure de potassium R*, à un débit de 2,5 mL/min. Un serpentin de retardement de 10 min est introduit pour permettre la transformation de l'hémoglobine. Enregistrez en continu l'absorbance (*2.2.25*) de l'hémolysat à une longueur d'onde de 540 nm à 550 nm. Déterminez l'intervalle de concentrations en anticorps sur lequel existe une relation linéaire entre la concentration et la variation d'absorbance ($\Delta A$). A partir des résultats, construisez une courbe d'étalonnage et utilisez la partie linéaire de la courbe pour déterminer l'activité de la préparation à examiner.

Calculez l'activité de la préparation à examiner par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*).

PROCÉDÉ B

L'activité de l'immunoglobuline humaine anti-D est évaluée par immunoadsorption compétitive à enzyme conjuguée sur plaques de microtitrage couvertes d'érythrocytes. La méthode est basée sur une compétition dans la fixation, entre une préparation d'immunoglobuline anti-D polyclonale et un anticorps anti-D monoclonal biotinylé dirigé contre un épitope spécifique de l'antigène-D. L'activité de la préparation à examiner est comparée à celle d'une préparation témoin étalonnée en Unité Internationales.

L'Unité Internationale correspond à l'activité d'une quantité donnée de la préparation internationale de référence. La correspondance entre l'Unité Internationale et la préparation internationale de référence est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

L'*immunoglobuline humaine anti-D PBR* est étalonnée en Unités Internationales par rapport à l'étalon international et est destinée à être utilisée dans le dosage de l'immunoglobuline humaine anti-D.

*MATÉRIEL*

Les réactifs non spécifiés sont de qualité analytique.

*PBS* (« *Solution saline tamponnée phosphate* »). Dissolvez 8,0 g de *chlorure de sodium R*, 0,76 g de *phosphate disodique anhydre R*, 0,2 g de *chlorure de potassium R*, 0,2 g de *phosphate monopotassique R* et 0,2 g d'*azide de sodium R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000 mL avec le même solvant.

*TBS* (*« Solution tampon tris(hydroxyméthylaminométhane »*). Dissolvez 8,0 g de *chlorure de sodium R* et 0,6 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* dans de l'*eau R*. Ajustez à pH 7,2 avec de l'*acide chlorhydrique 1 M* et complétez à 1000 mL avec le même solvant.

*Solution de papaïne.* Introduisez 1 g de *papaïne R* dans 10 mL de *solution tampon phosphate pH 5,4 (0,067 M) R* et agitez à 37 °C pendant 30 min, centrifugez à 10 000 *g* pendant 5 min, puis filtrez sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,22 µm). Pour activer, mélangez 1 mL de filtrat, 1 mL d'une solution de *L-cystéine R* à 48,44 g/L et 1 mL d'une solution d'*édétate de sodium R* à 3,72 g/L puis complétez à 10 mL avec la *solution tampon phosphate pH 5,4 (0,067 M) R*. Congelez la solution en volumes unitaires à une température inférieure ou égale à – 20 °C.

*Erythrocytes.* Utilisez un mélange d'érythrocytes D-positifs obtenus à partir d'au moins 3 donneurs du groupe O $R_2R_2$. Lavez les cellules 4 fois avec du PBS. Centrifugez les cellules à 1800 *g* pendant 5 min, mélangez un volume approprié du culot cellulaire préchauffé avec un volume approprié de la solution de papaïne préchauffée (2 volumes pour 1 volume convient), puis incubez à 37 °C pendant 10 min. Lavez les cellules 4 fois avec du PBS. Conservez à 4 °C dans un stabilisant approprié pendant au maximum 1 semaine.

*Brad-5 biotinylé.* Suivez les instructions d'utilisation.

*Réactif avidine/streptavidine conjuguées à la phosphatase alcaline.* De préférence modifié de façon à combiner une activité spécifique élevée avec une liaison non spécifique faible. Suivez les instructions d'utilisation.

*Solution de substrat.* Utilisez le phosphate de *para*-nitrophényle en suivant les instructions d'utilisation.

*Tampon de fixation cellulaire.* Dissolvez 18,02 g de *glucose R*, 4,09 g de *chlorure de sodium R*, 1,24 g d'*acide borique R*, 10,29 g de *citrate de sodium R* et 0,74 g d'*édétate de sodium R* dans de l'*eau R*. Ajustez à pH 7,2-7,3 avec de l'*hydroxyde de sodium 1 M* ou de l'*acide chlorhydrique 1 M*, et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*. Conservez à 4 °C et utilisez immédiatement.

*Solution de glutaraldéhyde.* Immédiatement avant l'emploi, ajoutez à 24 mL de PBS froid, 90 µL d'une solution de *glutaraldéhyde R* à 250 g/L.

*Plaques de microtitrage.* Les plaques devant être recouvertes d'érythrocytes sont des plaques de polystyrène à puits à fond plat, aux propriétés de surface optimisées pour l'immunodosage enzymatique et ayant une capacité élevée de fixation des protéines. Les plaques utilisées pour préparer les dilutions d'immunoglobuline sont des plaques de polystyrène ou de poly(chlorure de vinyle) à puits à fond en U ou en V.

*PROCÉDÉ*

Préparez une suspension à 0,1 pour cent (*V/V*) d'érythrocytes traités à la papaïne dans le tampon de fixation cellulaire froid. Introduisez à la pipette 50 µL dans chacun des puits de la plaque de microtitrage à fond plat.

Centrifugez la plaque à 350 *g* pendant 3 min, de préférence à 4 °C. Sans retirer le surnageant, ajoutez doucement 100 µL de solution de glutaraldéhyde dans chaque puits et laissez reposer pendant 10 min.

Videz les puits en retournant la plaque rapidement et lavez avec 3 fois 250-300 µL de PBS. Ceci peut être effectué manuellement ou en utilisant un laveur de plaques automatique approprié. Effectuez le dosage comme décrit ci-après, ou conservez la plaque à 4 °C après avoir éliminé le PBS, ajouté 100 µL de tampon de fixation cellulaire par puits et scellé les puits au moyen d'un film plastique. Les plaques peuvent être conservées à 4 °C pendant au maximum 1 mois.

*Solutions à examiner.* Pour les préparations cryodesséchées, reconstituez la préparation comme indiqué sur l'étiquette. Préparez 4 séries indépendantes de 5 dilutions au 1/2 en commençant à 30 UI/ mL dans du PBS contenant 10 g/L d'*albumine bovine R*. Si nécessaire, ajustez la dilution de départ pour obtenir des réponses situées dans la partie linéaire de la courbe dose-réponse.

*Solutions témoins.* Reconstituez la préparation de référence conformément aux instructions. Préparez 4 séries indépendantes de 5 dilutions au 1/2 en commençant avec 30 UI/ mL dans du PBS contenant 10 g/L d'*albumine bovine R*.

Dans les puits des plaques de microtitrage à fond en U ou en V, ajoutez 35 µL de chaque dilution de la solution à examiner ou de la solution témoin sur chacun des puits d'une série. Dans chaque puits, ajouter 35 µL d'une solution de Brad-5 biotinylé à 250 ng/µL.

Videz les puits de la plaque couverte d'érythrocytes en la retournant et en la déposant sur du papier absorbant. Ajoutez 250 µL de PBS contenant 20 g/L d'*albumine bovine R* et laissez reposer à température ambiante pendant 30 min.

Videz les puits de la plaque couverte d'érythrocytes en la retournant et en la déposant sur du papier absorbant, puis déposez dans les puits 50 µL de chaque dilution de la solution à examiner ou de la solution témoin contenant du Brad-5 biotinylé. Utilisez 50 µL de PBS contenant 10 g/L d'*albumine bovine R* comme témoin négatif. Scellez la plaque au moyen d'un film plastique et incubez à température ambiante pendant 1 h.

Videz le liquide des puits de la plaque couverte d'érythrocytes et lavez avec 3 fois 250-300 µL de TBS.

Diluez le réactif avidine/streptavidine conjuguées à la phosphatase alcaline dans du TBS contenant 10 g/L d'*albumine bovine R* et ajoutez-en 50 µL dans chaque puits. Incubez pendant 30 min à température ambiante.

Videz le liquide des puits de la plaque couverte d'érythrocytes et lavez avec 3 fois 250-300 µL de TBS.

Ajoutez 100 µL de solution de substrat dans chaque puits et incubez à température ambiante et à l'obscurité pendant 10 min. Pour arrêter la réaction, ajoutez 50 µL d'*hydroxyde de sodium 3 M* dans chaque puits.

Mesurez les absorbances à 405 nm et soustrayez la valeur lue pour le témoin négatif. Utilisez les valeurs d'absorbance situées dans la partie linéaire de la courbe de titrage afin d'estimer l'activité de la préparation à examiner par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*).

PROCÉDÉ C

L'activité de l'immunoglobuline humaine anti-D est évaluée par cytométrie en flux sur plaques de microtitrage. La méthode est basée sur la liaison spécifique de l'immunoglobuline anti-D et des érythrocytes D-positifs. L'activité de la préparation à examiner est comparée à celle d'une préparation témoin étalonnée en Unités Internationales.

L'Unité Internationale correspond à l'activité d'une quantité donnée de la préparation internationale de référence. La correspondance entre l'Unité Internationale et la préparation internationale de référence est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

L'*immunoglobuline humaine anti-D PBR* est étalonnée en Unités Internationales par rapport à l'étalon international et est destinée à être utilisée dans le dosage de l'immunoglobuline humaine anti-D.

*MATÉRIEL*

Les réactifs non spécifiés sont de qualité analytique.

*PBS*. Dissolvez 8,0 g de *chlorure de sodium R*, 0,76 g de *phosphate disodique R*, 0,2 g de *chlorure de potassium R* et 0,2 g de *phosphate monopotassique R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000 mL avec le même solvant.

*Solution PBS-BSA*. PBS contenant 10,0 g/L d'*albumine bovine R*.

*Erythrocytes*. Utilisez des érythrocytes D-positifs obtenus à partir d'un donneur unique du groupe O $R_1R_1$ et prélevés au maximum 2 semaines auparavant. Conservez les si nécessaire à 4 °C dans un stabilisant approprié. Lavez les cellules au moins 2 fois avec la solution PBS-BSA et préparez une suspension contenant $1 \times 10^4$ cellules par microlitre sans dépasser $5 \times 10^4$ cellules par microlitre dans de la solution PBS-BSA.

Utilisez des érythrocytes D-négatifs obtenus à partir d'un donneur unique du groupe O rr et préparés de la même manière.

*Anticorps secondaire*. Utilisez un fragment d'anticorps anti-IgG approprié, conjugué à un colorant fluorescent spécifique des IgG humaines ou de parties de celles-ci. Conservez et utilisez conformément aux instructions du fabricant.

*Plaques de microtitrage*. Utilisez des plaques à puits à fond plat n'ayant pas fait l'objet d'un traitement de surface pour les immunodosages enzymatiques.

*PROCÉDÉ*

*Solutions à examiner*. Pour les préparations cryodesséchées, reconstituez la préparation comme indiqué sur l'étiquette. Préparez indépendamment au moins 3 exemplaires d'au moins 3 séries de dilutions de raison 1,5 ou 2 en démarrant avec une concentration dans l'intervalle 1,2-0,15 UI/ mL et en utilisant de la solution PBS-BSA comme diluant. Si nécessaire, ajustez la dilution de départ pour obtenir des réponses situées dans la partie linéaire de la courbe dose-réponse.

*Solutions témoins*. Reconstituez la préparation de référence conformément aux instructions. Préparez indépendamment au moins 3 exemplaires d'au moins 3 séries de dilutions de raison 1,5 ou 2 en démarrant avec une concentration dans l'intervalle 1,2-0,15 UI/ mL et en utilisant de la solution PBS-BSA comme diluant. Si nécessaire, ajustez la dilution de départ pour obtenir des réponses situées dans la partie linéaire de la courbe dose-réponse.

Déposez 50 μL d'érythrocytes D-positifs dans chacun des puits d'une plaque de microtitrage. Ajoutez 50 μL de chacune des dilutions de la solution à examiner ou de la solution témoin dans chaque puits de chacune des séries. Utilisez 50 μL de solution PBS-BSA comme témoin négatif. Déposez 50 μL d'érythrocytes D-négatifs dans 4 puits de la même plaque de microtitrage et ajoutez 50 μL de la dilution la plus faible de la préparation à examiner. Pour contrôler les réactions parasites, déposez 50 μL d'érythrocytes D-positifs dans 4 puits de la même plaque de microtitrage et ajoutez 50 μL de solution PBS-BSA. Scellez au moyen d'un film de plastique et incubez à 37 °C pendant 40 min.

Centrifugez les plaques à 50 *g* pendant 3 min, éliminez le surnageant et lavez les cellules avec 200-250 μL de solution PBS-BSA. Répétez au moins une fois l'opération.

Centrifugez les plaques à 50 *g* pendant 3 min, éliminez le surnageant et ajoutez 50 μL d'anticorps secondaire dilué à une concentration en protéine appropriée dans de la solution PBS-BSA. Scellez au moyen d'un film de plastique et incubez pendant 20 min, à l'abri de la lumière et à température ambiante.

Centrifugez les plaques à 50 *g* pendant 3 min, éliminez le surnageant et lavez les cellules avec 200-250 μL de solution PBS-BSA. Répétez au moins une fois l'opération.

Centrifugez les plaques à 50 *g* pendant 3 min, éliminez le surnageant et lavez les cellules dans 200-250 μL de PBS. Transférez la suspension cellulaire dans un tube adapté à l'équipement de cytométrie en flux disponible et diluez en ajoutant du PBS pour permettre un débit approprié.

Procédez immédiatement à la mesure de la médiane de l'intensité de fluorescence dans un cytomètre en flux. Enregistrez au minimum 10 000 mesures sans fenêtrage mais en excluant les débris.

Utilisez l'intensité médiane de fluorescence située dans la partie linéaire de la courbe dose-réponse pour estimer l'activité de la préparation à examiner par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*).

**01/2011:20714**

## 2.7.14. TITRAGE DE L'ACTIVITÉ DU VACCIN DE L'HÉPATITE A

Le titrage de l'activité du vaccin de l'hépatite A est effectué soit *in vivo*, par comparaison de la capacité respective du vaccin et d'une préparation de référence à induire la formation d'anticorps spécifiques chez la souris dans les conditions données, soit *in vitro*, par une méthode immunochimique de détermination de la teneur en antigène.

ESSAI *IN VIVO*

L'essai sur souris décrit ci-après est donné à titre d'exemple de méthode qui s'est avérée satisfaisante pour un vaccin particulier. D'autres méthodes validées peuvent être utilisées.

**Choix et répartition des animaux d'expérience**. Utilisez des souris saines d'une souche reconnue comme appropriée, provenant d'un même élevage, âgées d'environ 5 semaines. Les animaux doivent être de même sexe. Répartissez-les en au moins 7 groupes égaux d'effectif approprié aux exigences de l'essai.

**Détermination de l'activité du vaccin à examiner**. Préparez au moins 3 dilutions du vaccin à examiner avec une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L contenant l'adjuvant à base d'aluminium utilisé dans le vaccin. Préparez de la même manière des dilutions équivalentes de la préparation de référence. Affectez une dilution différente à chaque groupe de souris et injectez à chaque animal, par voie sous-cutanée, au maximum 1,0 mL de la dilution affectée à son groupe. Un groupe de témoins non vaccinés reçoit une injection sous-cutanée du même volume de diluant. Après 28 à 32 jours, anesthésiez et saignez les animaux, en recueillant séparément les sérums. Effectuez sur chaque sérum un dosage des anticorps spécifiques du virus de l'hépatite A par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

**Calculs**. Effectuez les calculs par les méthodes statistiques habituelles pour les dosages fondés sur une réponse qualitative (*5.3*).

A partir de la distribution des niveaux de réaction mesurés sur tous les sérums du groupe d'animaux non vaccinés, déterminez le niveau de réaction maximal pouvant être attendu chez un animal non vacciné pour le titrage en question. Toute réponse supérieure à ce seuil chez un animal vacciné constitue par définition une séroconversion.

Effectuez une transformation appropriée (par exemple en probits) du pourcentage d'animaux de chaque groupe présentant une séroconversion et analysez les données log dose-réponse selon un modèle en lignes parallèles. Déterminez l'activité relative de la préparation à examiner par rapport à la préparation de référence.

**Conditions de validité**. L'essai n'est valable que si :

– pour la préparation à examiner et la préparation de référence, la $DE_{50}$ se situe entre la plus faible et la plus forte des doses administrées aux animaux,
– l'analyse statistique ne révèle aucun écart de linéarité ou de parallélisme significatif,
– les limites de confiance ($P$ = 0,95) ne sont pas inférieures à 33 pour cent ni supérieures à 300 pour cent de l'activité estimée.

**Exigence d'activité**. La limite de confiance supérieure ($P$ = 0,95) de l'activité relative estimée n'est pas inférieure à 1,0.

ESSAI *IN VITRO*

Effectuez une détermination immunochimique (*2.7.1*) de la teneur en antigène, les critères d'acceptabilité étant validés par rapport à l'essai *in vivo*. Les critères d'acceptabilité sont approuvés par l'Autorité compétente pour une préparation de référence donnée au vu des résultats des études de validation.

Le *vaccin de l'hépatite A (inactivé, non adsorbé) PBR* convient comme préparation de référence.

**01/2008:20715**

## 2.7.15. TITRAGE DE L'ACTIVITÉ DU VACCIN DE L'HÉPATITE B (ADNr)

Le titrage de l'activité du vaccin de l'hépatite B (ADNr) est effectué soit *in vivo*, par comparaison de la capacité respective du vaccin et d'une préparation de référence à induire la formation d'anticorps spécifiques dirigés contre l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) chez la souris ou le cobaye dans des conditions données, soit *in vitro*, par une méthode immunochimique de détermination de la teneur en antigène.

ESSAI *IN VIVO*

**Choix et répartition des animaux d'expérience**. Utilisez des souris saines provenant d'un même élevage, âgées de 5 semaines environ ; la souche de souris choisie doit donner une courbe dose-réponse à l'antigène présentant une pente significative (les souris de l'haplotype $H\text{-}2^q$ ou $H\text{-}2^d$ conviennent). On peut également utiliser des cobayes sains de 300-350 g (âgés de 7 semaines environ) provenant d'un même élevage. Les animaux doivent être de même sexe. Répartissez-les en au moins 7 groupes égaux d'effectif approprié aux exigences de l'essai.

**Détermination de l'activité du vaccin à examiner**. Préparez au moins 3 dilutions du vaccin à examiner avec une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, contenant l'adjuvant à base d'aluminium utilisé dans le vaccin, ou avec un autre diluant approprié. Préparez de la même manière des dilutions équivalentes de la préparation de référence. Affectez une dilution différente à chaque groupe d'animaux et injectez à chaque animal, par voie intrapéritonéale, 1,0 mL au maximum de la dilution affectée à son groupe. Un groupe de témoins non vaccinés reçoit une injection intrapéritonéale du même volume de diluant. Après un délai approprié (par exemple 4 à 6 semaines), anesthésiez et saignez les animaux, en recueillant séparément les sérums. Effectuez sur chaque sérum un dosage des anticorps spécifiques dirigés contre l'HBsAg par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

**Calculs**. Effectuez les calculs par les méthodes statistiques habituelles pour les dosages fondés sur une réponse qualitative (*5.3*).

A partir de la distribution des niveaux de réaction mesurés sur tous les sérums du groupe d'animaux non vaccinés, déterminez le niveau de réaction maximal pouvant être attendu chez un animal non vacciné pour le titrage en question. Toute réponse supérieure à ce seuil chez un animal vacciné constitue par définition une séroconversion.

Effectuez une transformation appropriée (par exemple en probits) du pourcentage d'animaux de chaque groupe présentant une séroconversion et analysez les données log dose-réponse selon un modèle en lignes parallèles. Déterminez l'activité relative de la préparation à examiner par rapport à la préparation de référence.

**Conditions de validité**. L'essai n'est valable que si :

– pour la préparation à examiner et la préparation de référence, la $DE_{50}$ se situe entre la plus faible et la plus forte des doses administrées aux animaux,
– l'analyse statistique ne révèle aucun écart de linéarité ou de parallélisme significatif,
– les limites de confiance ($P$ = 0,95) ne sont pas inférieures à 33 pour cent ni supérieures à 300 pour cent de la valeur estimée.

**Exigence d'activité**. La limite de confiance supérieure ($P$ = 0,95) de l'activité relative calculée n'est pas inférieure à 1,0.

ESSAI *IN VITRO*

Effectuez une détermination immunochimique (*2.7.1*) de la teneur en antigène, les critères d'acceptabilité étant validés par rapport à l'essai *in vivo*.

Un dosage par immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA) ou un dosage radioimmunologique (RIA) utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques aux épitopes de l'HBsAg qui produisent un effet protecteur, se sont avérés satisfaisants. L'essai comporte un nombre approprié de dilutions du vaccin à examiner et de la préparation de référence, et les données sont analysées selon un modèle en lignes parallèles après transformation appropriée, si nécessaire. Il existe dans le commerce des nécessaires de dosage *in vitro* de l'HBsAg, dont le mode opératoire peut être adapté à la détermination *in vitro* de l'activité du vaccin.

Les critères d'acceptabilité sont approuvées pour une préparation de référence donnée par l'Autorité compétente au vu des résultats des études de validation.

*Le vaccin de l'hépatite B (ADNr) méthode A PBR* et le *vaccin de l'hépatite B (ADNr) méthode B PBR* conviennent pour le titrage *in vitro* de l'activité de certains vaccins, comme décrit dans la notice jointe à l'emballage.

**01/2008:20716**

## 2.7.16. TITRAGE DE L'ACTIVITÉ DU VACCIN COQUELUCHEUX ACELLULAIRE

La capacité du vaccin à induire la formation d'anticorps spécifiques est comparée à celle d'une préparation de référence examinée en parallèle. Le titre en anticorps est déterminé par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) du type immunoadsorption avec enzyme conjuguée (ELISA) par exemple. L'essai chez la souris décrit ci-après emploie un modèle à 3 points mais un modèle comportant une seule dilution peut être utilisé pour les essais de routine, après validation.

*Vaccin de référence*. Est utilisé comme vaccin de référence un lot de vaccin dont l'efficacité a été démontrée lors d'essais cliniques, ou un autre lot représentatif. Un lot représentatif doit être préparé par un procédé strictement identique à celui utilisé pour le lot soumis aux essais cliniques. La stabilité du vaccin de référence doit être attestée par des documents.

*Immunosérum de référence*. L'*immunosérum de souris de Bordetella pertussis PBR* convient comme immunosérum de référence.

*Exigence d'activité*. La capacité du vaccin à induire la formation d'anticorps n'est pas significativement ($P$ = 0,95) inférieure à celle du vaccin de référence.

*L'essai décrit ci-après est donné à titre d'exemple de méthode qui s'est avérée satisfaisante.*

*Choix des animaux et répartition en groupes.* Utilisez des souris saines (par exemple, de la souche CD1) provenant du même élevage et âgées d'environ 5 semaines. Répartissez les animaux en 6 groupes d'effectif approprié aux exigences de l'essai. Utilisez 3 dilutions du vaccin à examiner et 3 dilutions du vaccin de référence, en affectant une dilution différente à chaque groupe d'animaux. Injectez à chaque souris, par voie intrapéritonéale ou sous-cutanée, 0,5 mL de la dilution affectée à son groupe.

*Collecte des échantillons de sérum.* 4 à 5 semaines après la vaccination, anesthésiez les souris et saignez-les individuellement. Conservez le sérum à – 20 °C jusqu'au moment de la détermination du titre en anticorps.

*Détermination du titre en anticorps.* Déterminez séparément le titre en anticorps spécifiques de chaque sérum par une méthode validée telle que le titrage ELISA décrit ci-après.

*Titrage ELISA.* Recouvrez des plaques de microtitrage (en poly(chlorure de vinyl) ou polystyrène, selon l'antigène considéré) avec l'antigène purifié, à une concentration de 100 ng par puits. Lavez, puis bloquez les sites libres par mise en incubation avec une solution de sérum-albumine bovine et lavez à nouveau. Préparez directement sur les plaques des dilutions au demi du sérum des souris vaccinées avec le vaccin à examiner ou avec le vaccin de référence. Incubez à 22-25 °C pendant 1 h, puis lavez les plaques. Ajoutez dans chaque puits une solution appropriée d'IgG anti-souris conjuguée à une enzyme et incubez à 22-25 °C pendant 1 h. Lavez à nouveau, puis faites réagir avec un substrat chromogène à partir duquel l'enzyme conjuguée libère un chromophore qui peut être quantifié par mesure de l'absorbance (*2.2.25*). Les conditions de l'essai sont choisies de façon à obtenir une réponse linéaire pour l'absorbance en fonction de la teneur en anticorps sur la gamme d'absorbance utilisée et des valeurs d'absorbance situées entre 0,1 et 2,0.

Un immunosérum de référence ayant une activité nominale connue est utilisé comme base de calcul du titre en anticorps des sérums à examiner. Un sérum témoin standardisé est également utilisé.

L'essai n'est pas valable si :

– la valeur obtenue pour le sérum témoin diffère de la valeur nominale de plus de 2 fois l'écart type,
– les limites de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée sont inférieures à 50 pour cent ou supérieures à 200 pour cent.

*Calculs.* Calculez le titre en anticorps des sérums de souris vaccinées avec le vaccin à examiner et avec le vaccin de référence. A partir des valeurs obtenues, calculez l'activité du vaccin à examiner par rapport au vaccin de référence, par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*).

**01/2008:20717**

## 2.7.17. TITRAGE DE L'ANTITHROMBINE III HUMAINE

La teneur en antithrombine III de la préparation à examiner est évaluée en comparant sa capacité à inactiver la thrombine en présence d'un excès d'héparine, à celle d'une préparation de référence de concentré d'antithrombine III humaine étalonnée en Unités Internationales. Des quantités variables de la préparation à examiner sont mélangées à une quantité fixe de thrombine et l'activité thrombinique résiduelle est déterminée à l'aide d'un substrat chromogène approprié.

L'Unité Internationale correspond à l'activité d'une quantité donnée de l'Etalon International de concentré d'antithrombine III humaine. L'équivalence entre l'Unité Internationale et l'Etalon International est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

*Mode opératoire.* Pour la préparation à examiner et pour la préparation de référence, préparez, à l'aide de *solution tampon tris-EDTA ASB pH 8,4 R* contenant 15 UI d'héparine par millilitre, 2 séries indépendantes de 3 ou 4 dilutions comprises entre 1/75 et 1/200 à partir de 1 UI/mL.

Chauffez 200 µL de chaque dilution à 37 °C pendant 1-2 min. Ajoutez à chaque dilution 200 µL d'une solution de *thrombine bovine R* contenant 2 UI/mL dans de la *solution tampon tris-EDTA ASB pH 8,4 R*. Mélangez et maintenez à 37 °C pendant exactement 1 min. Ajoutez 500 µL d'un substrat chromogène approprié (par exemple, le D-phénylalanyl-L-pipécolyl-L-arginine-4-nitroanilide ; dissolvez ce substrat dans de l'*eau R* pour obtenir une solution contenant 4 mmol/L puis diluez à l'aide de la *solution tampon tris-EDTA ASB pH 8,4 R* sans albumine jusqu'à une concentration appropriée pour le titrage). Commencez immédiatement la mesure de l'absorbance à 405 nm (*2.2.25*) et continuez la mesure pendant au moins 30 s. Calculez la variation de l'absorbance (Δ*A*/min). (On peut utiliser également un titrage à point final en arrêtant la réaction avec de l'acide acétique et en mesurant l'absorbance à 405 nm.)

La variation de l'absorbance (Δ*A*/min) est inversement proportionnelle à l'activité de l'antithrombine III.

Vérifiez la validité du titrage et calculez l'activité de la préparation à examiner par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple).

**01/2008:20718**

## 2.7.18. DOSAGE DU FACTEUR II DE COAGULATION HUMAIN

Le dosage du facteur II de coagulation humain s'effectue après activation spécifique en facteur IIa, qui est alors estimé par comparaison de son activité, en tant qu'agent de clivage d'un substrat chromogène peptidique spécifique, avec celle de l'étalon international ou d'une préparation de référence étalonnée en Unités Internationales.

L'Unité Internationale de facteur II correspond à l'activité d'une quantité donnée de l'étalon international, qui est constitué de concentré cryodesséché de facteur II de coagulation sanguine humain. La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

Le dosage chromogène comporte 2 étapes : activation du facteur II au moyen de venin de serpent, puis clivage enzymatique par le facteur IIa, d'un substrat chromogène qui libère un chromophore quantifiable par spectrophotométrie. Dans des conditions de dosage appropriées, il existe une relation linéaire entre l'activité du facteur IIa et le clivage du substrat chromogène.

*RÉACTIFS*

*Activateur spécifique du facteur II issu du venin de vipère* (écarine). Protéine obtenue à partir du venin de la vipère des pyramides (*Echis carinatus*), qui active spécifiquement le facteur II. Reconstituez la préparation suivant les instructions du fabricant. Conservez la préparation reconstituée à 4 °C et utilisez-la dans le mois qui suit.

*Substrat chromogène pour facteur IIa.* Substrat chromogène spécifique du facteur IIa tel que : dichlorhydrate de *H*-D-phénylalanyl-L-pipécolyl-L-arginine-4-nitroanilide, 4-toluènesulfonyl-glycyl-prolyl-L-arginine-4-nitroanilide, *H*-D-cyclohexylglycyl-α-aminobutyryl-L-arginine-4-nitroanilide, D-cyclohexylglycyl-L-alanyl-L-arginine-4-nitroanilide-diacétate. Reconstituez suivant les instructions du fabricant.

*Tampon de dilution.* Solution contenant 6,06 g/L de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R*, 17,53 g/L de *chlorure de sodium R*, 2,79 g/L d'*acide (éthylènedinitrilo)tétraacétique R* et 1 g/L d'*albumine bovine R* ou d'*albumine humaine R*. Ajustez si nécessaire à pH 8,4 avec de l'*acide chlorhydrique R*.

*MODE OPÉRATOIRE*

*Solution à examiner.* Diluez la préparation à examiner à l'aide du tampon de dilution de façon à obtenir une solution contenant 0,015 UI de facteur II par millilitre. Préparez au moins 3 dilutions supplémentaires de cette solution dans le tampon de dilution.

*Solution témoin.* Diluez la préparation de référence à l'aide du tampon de dilution de façon à obtenir une solution contenant 0,015 UI de facteur II par millilitre. Préparez au moins 3 dilutions supplémentaires de cette solution dans le tampon de dilution.

Peu de temps avant l'essai, portez toutes les solutions à 37 °C dans un bain-marie.

Les conditions décrites sont applicables aux plaques de microtitration. Si le dosage est réalisé dans des tubes, ajustez les volumes de façon à maintenir les proportions dans le mélange.

Introduisez 25 µL des différentes dilutions de la solution à examiner et de la solution témoin dans une série de puits d'une plaque de microtitrage maintenue à 37 °C Ajoutez dans chaque puits 125 µL de tampon de dilution, puis 25 µL d'écarine. Incubez pendant exactement 2 min. Ajoutez dans chaque puits 25 µL de substrat chromogène pour facteur IIa.

Procédez à la lecture de la vitesse de variation de l'absorbance à 405 nm (*2.2.25*) et continuez pendant 3 min pour obtenir la vitesse moyenne de la variation de l'absorbance ($\Delta A$/min). Si une surveillance continue n'est pas possible, mesurez l'absorbance à 405 nm à des intervalles consécutifs appropriés, par exemple toutes les 40 s. Tracez le graphe linéaire des valeurs de l'absorbance en fonction du temps et calculez $\Delta A$/min (pente de la droite). A partir des valeurs individuelles de $\Delta A$/min pour chaque dilution de l'étalon et de la substance à examiner, calculez l'activité de la préparation à examiner et vérifiez la validité du dosage selon les méthodes statistiques habituelles (*5.3*).

**01/2008:20719**

## 2.7.19. DOSAGE DU FACTEUR X DE COAGULATION HUMAIN

Le dosage du facteur X de coagulation humain s'effectue après activation spécifique en facteur Xa, qui est alors estimé par comparaison de son activité, en tant qu'agent de clivage d'un substrat chromogène peptidique spécifique, avec celle de l'étalon international ou d'une préparation de référence étalonnée en Unités Internationales.

L'Unité Internationale de facteur X correspond à l'activité d'une quantité donnée de l'étalon international, qui est constitué de concentré cryodesséché de facteur X de coagulation humain. La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

Le dosage chromogène comporte 2 étapes : activation du facteur X au moyen de venin de serpent, puis clivage enzymatique par le facteur Xa, d'un substrat chromogène qui libère un chromophore quantifiable par spectrophotométrie. Dans des conditions de dosage appropriées, il existe une relation linéaire entre l'activité du facteur Xa et le clivage du substrat chromogène.

RÉACTIFS

*Activateur spécifique du facteur X issu du venin de vipère de Russel* (VVR). Protéine obtenue à partir du venin de la vipère de Russell (*Vipera russelli*), qui active spécifiquement le facteur X. Reconstituez la préparation suivant les instructions du fabricant. Conservez la préparation reconstituée à 4 °C et utilisez-la dans le mois qui suit.

*Substrat chromogène pour facteur Xa.* Substrat chromogène spécifique du facteur Xa tel que : dichlorhydrate de *N*-α-benzyloxycarbonyl-D-arginyl-L-glycyl-L-arginine-4-nitroanilide, chlorhydrate de *N*-benzoyl-L-isoleucyl-L-glutamyl-glycyl-L-arginine-4-nitroanilide, méthanesulfonyl-D-leucyl-glycyl-L-arginine-4-nitroanilide, acétate de méthoxycarbonyl-D-cyclohexylalanyl-glycyl-L-arginine-4-nitroanilide. Reconstituez suivant les instructions du fabricant.

*Tampon de dilution.* Solution contenant 3,7 g/L de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R*, 18,0 g/L de *chlorure de sodium R*, 2,1 g/L d'*imidazole R*, 0,02 g/L de *bromure d'hexadiméthrine R* et 1 g/L d'*albumine bovine R* ou d'*albumine humaine R*. Ajustez si nécessaire à pH 8,4 avec de l'*acide chlorhydrique R*.

MODE OPÉRATOIRE

*Solution à examiner.* Diluez la préparation à examiner à l'aide du tampon de dilution de façon à obtenir une solution contenant 0,18 UI de facteur X par millilitre. Préparez au moins 3 dilutions supplémentaires de cette solution dans le tampon de dilution.

*Solution témoin.* Diluez la préparation de référence à l'aide du tampon de dilution de façon à obtenir une solution contenant 0,18 UI de facteur X par millilitre. Préparez au moins 3 dilutions supplémentaires de cette solution dans le tampon de dilution.

Peu de temps avant l'essai, portez toutes les solutions à 37 °C dans un bain-marie.

Les conditions décrites sont applicables aux plaques de microtitrage. Si le dosage est réalisé dans des tubes, ajustez les volumes de façon à maintenir les proportions dans le mélange.

Introduisez 12,5 µL des différentes dilutions de la solution à examiner et de la solution témoin dans une série de puits d'une plaque de microtitrage maintenue à 37 °C. Ajoutez dans chaque puits 25 µL de VVR. Incubez pendant exactement 90 s. Ajoutez dans chaque puits 150 µL de substrat chromogène pour facteur Xa dilué 6 fois dans le tampon de dilution.

Procédez à la lecture de la vitesse de variation de l'absorbance à 405 nm (*2.2.25*) et continuez pendant 3 min pour obtenir la vitesse moyenne de la variation de l'absorbance ($\Delta A$/min). Si une surveillance continue n'est pas possible, mesurez l'absorbance à 405 nm à des intervalles consécutifs appropriés, par exemple toutes les 40 s. Tracez le graphe linéaire des valeurs de l'absorbance en fonction du temps et calculez $\Delta A$/min (pente de la droite). A partir des valeurs individuelles de $\Delta A$/min pour chaque dilution de l'étalon et de la substance à examiner, calculez l'activité de la préparation à examiner et vérifiez la validité du dosage selon les méthodes statistiques habituelles (*5.3*).

**01/2008:20720**

## 2.7.20. TITRAGE DE L'ACTIVITÉ *IN VIVO* DU VACCIN POLIOMYÉLITIQUE INACTIVÉ

La capacité du vaccin à induire la formation d'anticorps neutralisants est déterminée *in vivo* par l'une des méthodes suivantes.

ESSAI SUR POUSSINS OU COBAYES

Préparez une série appropriée d'au moins 3 dilutions du vaccin à examiner à l'aide d'une solution saline tamponnée appropriée. Répartissez par groupes de 10, des poussins âgés de 3 semaines ou des cobayes pesant 250-350 g, de façon à utiliser un groupe séparé pour chaque dilution de vaccin. Injectez par voie intramusculaire à chaque animal 0,5 mL de la dilution attribuée à son groupe. Saignez les animaux après 5-6 jours, en gardant séparément les sérums. Recherchez la présence d'anticorps neutralisants pour chacun des virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3 dans les sérums dilués au 1/4. Mélangez 100 $DICC_{50}$ du virus avec la dilution du sérum et incubez à 37 °C pendant 4,5-6 h. Maintenez ensuite à 5 ± 3 °C pendant 12-18 h, si la régularité des résultats le nécessite. Inoculez les mélanges à des cultures cellulaires afin de déceler la présence de virus non neutralisés et lisez le résultat jusqu'au 7$^{e}$ jour

après l'inoculation. Pour chaque groupe d'animaux, relevez le nombre de sérums contenant des anticorps neutralisants et calculez la dilution du vaccin donnant une réponse en anticorps chez 50 pour cent des animaux. Effectuez en parallèle un essai témoin avec une préparation de référence appropriée. Le vaccin satisfait à l'essai si, dilué au 1/100 ou davantage, il induit une réponse en anticorps pour chacun des 3 types de virus chez 50 pour cent des animaux.

ESSAI CHEZ LE RAT

Une méthode de titrage *in vivo* appropriée consiste en une injection intramusculaire dans le(s) membre(s) inférieur(s) d'au moins 3 dilutions du vaccin à examiner et d'un vaccin de référence, en utilisant pour chaque dilution un groupe de 10 rats issus d'une souche appropriée et exempts de microorganismes pathogènes spécifiés. Il est généralement nécessaire d'utiliser 4 dilutions afin d'obtenir des résultats valables pour les 3 sérotypes. Le nombre d'animaux par groupe doit être suffisant pour obtenir des résultats qui satisfont aux critères de validité ; des groupes de 10 rats sont généralement suffisants mais des résultats valables peuvent être obtenus avec des groupes plus petits. Si des animaux de sexes différents sont utilisés, mâles et femelles sont répartis également entre tous les groupes. Des rats pesant 175-250 g conviennent. Utilisez un inoculum de 0,5 mL par rat. La gamme de doses est choisie de façon qu'une réponse soit obtenue pour les 3 types de poliovirus. Saignez les animaux après 20-22 jours. Pour les 3 types de poliovirus, mesurez séparément les titres en anticorps neutralisants avec 100 $DICC_{50}$ de souches Sabin comme virus d'épreuve, des cellules Vero ou Hep2 comme indicateurs, et sous les conditions de neutralisation suivantes : 3 h à 35-37 °C, puis, si la régularité des résultats le nécessite, 18 h à 2-8 °C. Après 7 jours d'incubation à 35 °C, effectuez la fixation et la coloration, puis lisez les résultats. Pour que soit valable le dosage des anticorps, il doit être démontré que le titre en chacun des virus d'épreuve se situe entre 10 $DICC_{50}$ et 1000 $DICC_{50}$, et le titre en anticorps neutralisants d'un sérum témoin ne doit pas s'écarter de plus de 2 dilutions au demi de la moyenne géométrique du titre du sérum. Calculez l'activité en comparant la proportion d'animaux présentant une réponse au vaccin à examiner et au vaccin témoin, soit par la méthode des probits, soit, après validation, en appliquant un modèle en lignes parallèles. Pour la méthode des probits, il est nécessaire d'établir un titre seuil en anticorps neutralisants pour chaque type de poliovirus permettant de définir une réponse positive. Du fait des variations interlaboratoires, il n'est pas possible de définir des valeurs seuils applicables à tous les laboratoires. Les valeurs seuils sont donc plutôt déterminées pour chaque laboratoire sur la base d'une série d'au moins 3 essais avec le vaccin de référence. Utilisez comme valeur seuil le point médian, sur une échelle $\log_2$, entre les titres minimaux et maximaux (en moyenne géométrique) de la série de 3 essais ou plus. Pour chacun des 3 types de poliovirus, l'activité du vaccin n'est pas inférieure de façon significative à celle de la préparation de référence. L'essai n'est valable que si :

– pour la préparation à examiner et la préparation de référence, la $DE_{50}$ est comprise entre la plus petite et la plus forte des doses administrées aux animaux,
– l'analyse statistique ne révèle aucune déviation significative de la linéarité ou du parallélisme,
– les limites de confiance ($P$ = 0,95) ne sont pas inférieures à 25 pour cent ni supérieures à 400 pour cent de l'activité estimée.

*La section suivante est publiée à titre d'information.*

## Recommandations pour la dérogation au titrage de l'activité *in vivo* du vaccin poliomyélitique inactivé monovalent ou combiné

*Ces recommandations s'appliquent aux vaccins issus de souches sauvages du poliovirus. La validation décrite devra être effectuée pour chaque produit préalablement à la dérogation au titrage in vivo et devra être renouvelée à chaque modification importante du procédé de fabrication pouvant affecter les titrages in vitro ou in vivo.*

La Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques exige de renoncer aux essais sur animaux s'il existe une alternative relativement accessible et pratique qui soit satisfaisante d'un point de vue scientifique. Les présentes recommandations ont donc pour but de promouvoir la dérogation au titrage de l'activité *in vivo* chaque fois qu'il pourra être établi pour un produit donné que le titrage de l'activité *in vitro* (détermination de l'antigène D) apporte une garantie suffisante d'une activité satisfaisante pour le contrôle de routine des lots.

En ce qui concerne le titrage de l'activité *in vivo*, l'essai sur rats est considéré comme étant la méthode recommandée. Les vaccins pour lesquels le titrage de l'activité utilise des poussins ou des cobayes et qui disposent d'un historique de production établi et documenté, pourront déroger au titrage de l'activité *in vivo* si le titrage sur rats est également appliqué aux lots inclus dans l'étude de validation décrite ci-après. Pour les vaccins n'ayant pas encore été approuvés, les résultats du titrage sur rats de tous les vracs finals devraient être inclus dans toutes les données générées pour démontrer la régularité de production avant de pouvoir déroger au titrage de l'activité *in vivo*.

Une fois obtenue la dérogation au titrage de l'activité *in vivo*, les lots de vaccin seront libérés sur la base du titrage de l'activité *in vitro* et le titrage *in vivo* ne pourra pas être utilisé comme alternative pour la libération d'un lot n'ayant pas satisfait au titrage *in vitro*. La répétition du titrage de l'activité *in vitro* peut être effectuée conformément à une procédure autorisée.

PROCÉDURE

Les conditions suivantes doivent être remplies avant de procéder à l'étude de validation :

– expérience appropriée du titrage sur rats ;
– validation complète du titrage de l'antigène D (linéarité, répétabilité, précision intermédiaire, exactitude et limites de quantification) ;
– établissement des critères d'acceptation relatifs au titrage de l'antigène D et basés sur un nombre approprié de lots finals consécutifs ;
– établissement de la régularité de la production sur des vracs finals récents en utilisant le titrage de l'activité *in vivo* approuvé en vigueur ; les vracs finals doivent correspondre aux lots finals utilisés pour établir les critères d'acceptation relatifs au titrage de l'antigène D et doivent représenter différentes récoltes inactivées de chacun des 3 types de poliovirus.

L'étude de validation doit être effectuée sur :

– un vrac/lot final représentatif de la méthode de production actuelle ;
– 2 lots dont l'activité a été atténuée, par exemple en chauffant le vaccin normal ou en le mélangeant avec un vaccin ayant subi un traitement thermique ; les titres attendus des lots d'activité atténuée devront être inférieurs de moitié environ à ceux d'un vrac/lot final représentatif.

Ces lots sont titrés en utilisant comme préparation de référence un lot de production homologue :

– par le titrage de l'activité *in vivo* approuvé en vigueur pour le vaccin,
– par le titrage sur rats s'il ne s'agit pas du titrage de l'activité *in vivo* approuvé en vigueur,
– par le titrage de l'antigène D.

La dérogation au titrage de l'activité *in vivo* est acceptable si le vrac/lot final représentatif satisfait aux titrages de l'activité *in vivo* et *in vitro* et si les lots d'activité atténuée n'y satisfont pas. Si un lot d'activité atténuée ne satisfait pas au titrage de l'antigène D mais satisfait au titrage de l'activité *in vivo*, ce dernier peut être répété.

**01/2008:20721**

## 2.7.21. DOSAGE DU FACTEUR WILLEBRAND HUMAIN

Les fonctions biologiques du facteur Willebrand humain sont multiples. Son dosage est actuellement possible sur la base de son activité de type cofacteur de la ristocétine ou de sa capacité de liaison au collagène. La détermination de l'activité du facteur Willebrand humain est effectuée par comparaison, dans des conditions données, de l'activité de la préparation à examiner et d'une préparation de référence étalonnée par rapport à l'étalon international, le cas échéant en Unités Internationales.

L'Unité Internationale correspond à l'activité d'une quantité donnée de l'étalon international, qui est constitué par un concentré de facteur Willebrand humain cryodesséché. La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

### ACTIVITÉ DE TYPE COFACTEUR DE LA RISTOCÉTINE

L'activité de type cofacteur de la ristocétine du facteur Willebrand est déterminée par mesure de l'agglutination d'une suspension de plaquettes en présence de ristocétine A. Le dosage peut être effectué à l'aide d'instruments automatisés dans le cas des déterminations quantitatives ou, dans le cas des déterminations semi-quantitatives, par évaluation visuelle du seuil d'agglutination dans une série de dilutions. Un dosage quantitatif est préférable.

*RÉACTIFS*

*Suspension de plaquettes.* Utilisez une préparation titrée de plaquettes humaines fraîchement isolées et lavées, fixée par exemple à l'aide de formaldéhyde ou de paraformaldéhyde. La suspension peut également être cryodesséchée. Elle peut être additionnée si nécessaire d'une quantité appropriée de ristocétine A. Certains réactifs plaquettaires contiennent déjà de la ristocétine A.

*Préparation de référence.* La préparation de référence de facteur Willebrand est l'étalon international de concentré de facteur Willebrand de l'OMS.

*MODE OPÉRATOIRE*

*Dosage semi-quantitatif.* Préparez des dilutions appropriées de la préparation à examiner et de la préparation de référence avec, comme diluant, une solution contenant 9 g/L de *chlorure de sodium R* et 10-50 g/L d'*albumine humaine R*. Ajoutez à chaque dilution une quantité appropriée de la suspension de plaquettes et si nécessaire de la ristocétine A. Mélangez sur une lame de verre en imprimant doucement à celle-ci un mouvement circulaire pendant 1 min. Laissez reposer encore pendant 1 min et lisez le résultat sur fond sombre, avec éclairage latéral. La dernière dilution à laquelle est observée une agglutination nettement visible indique le titre de l'échantillon en termes d'activité de type cofacteur de la ristocétine. Utilisez le diluant comme témoin négatif.

*Dosage quantitatif.* Juste avant l'emploi, reconstituez le contenu total d'une ampoule de la préparation de référence, ainsi que la préparation à examiner, en ajoutant la quantité voulue du diluant recommandé (par exemple de l'*eau R*). Ajoutez aux préparations reconstituées la quantité de prédiluant nécessaire pour obtenir des solutions à 0,5-2,0 UI/mL. Le prédiluant est constitué d'une solution tampon isotonique sans agent chélateur, contenant par exemple 1-5 pour cent d'albumine humaine ou bovine et additionnée de tris(hydroxyméthyl)aminométhane ou d'imidazole convenablement tamponné.

Effectuez le dosage conformément aux instructions du fabricant en préparant au moins 2 séries comportant autant de dilutions que nécessaire pour obtenir au total au moins 3 concentrations différentes dans l'intervalle de linéarité.

Vérifiez la validité du dosage et calculez l'activité de la préparation à examiner par les méthodes statistiques habituelles (*5.3* par exemple).

### CAPACITÉ DE LIAISON AU COLLAGÈNE

La capacité de liaison au collagène est déterminée par immunoadsorption à enzyme conjuguée sur plaques de microtitrage recouvertes de collagène. Après liaison spécifique du facteur Willebrand avec du collagène fibrillaire, la révélation est effectuée au moyen d'un anticorps polyclonal anti-facteur Willebrand conjugué à une enzyme qui, en présence d'un substrat chromogène, donne un produit quantifiable par spectrophotométrie. Dans des conditions opératoires appropriées, il existe une relation linéaire entre l'activité de liaison au collagène du facteur Willebrand et l'absorbance.

*RÉACTIFS*

*Collagène.* Utilisez des fibrilles de collagène natif, équin ou humain, de type I ou III. Pour faciliter les manipulations, du collagène en solution peut être utilisé.

*Diluant du collagène.* Dissolvez 50 g de *glucose R* dans de l'*eau R*, ajustez à pH 2,7-2,9 avec de l'*acide chlorhydrique 1 M* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

*Solution saline tamponnée phosphate (PBS).* Dissolvez 8,0 g de *chlorure de sodium R*, 1,05 g de *phosphate disodique dihydraté R*, 0,2 g de *phosphate monosodique R* et 0,2 g de *chlorure de potassium R* dans de l'*eau R*. Ajustez à pH 7,2 avec de l'*hydroxyde de sodium 1 M* ou de l'*acide chlorhydrique 1 M*, puis complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

*Tampon de lavage.* PBS contenant 1 g/L de *polysorbate 20 R*.

*Réactif de blocage.* PBS contenant 1 g/L de *polysorbate 20 R* et 10 g/L d'*albumine bovine R*.

*Tampon de dilution.* PBS contenant 1 g/L de *polysorbate 20 R* et 50 g/L d'*albumine bovine R*.

*Conjugué.* Sérum de lapin anti-facteur Willebrand humain, conjugué à de la peroxydase de raifort. Utilisez le conjugué suivant les instructions du fabricant.

*Solution de substrat.* Immédiatement avant emploi, dissolvez un comprimé de dichlorhydrate d'*o*-phénylènediamine et un comprimé de peroxyde d'urée dans 20 mL d'*eau R*, ou utilisez un volume approprié de peroxyde d'hydrogène. Maintenez à l'abri de la lumière.

*Plaques de microtitrage.* Plaques de polystyrène à puits à fond plat, présentant des propriétés de surface optimisées pour les immunodosages enzymatiques et une capacité élevée de liaison aux protéines.

*MODE OPÉRATOIRE*

*Solutions à examiner.* Reconstituez la préparation à examiner comme indiqué sur l'étiquette, puis diluez-la avec le tampon de dilution de façon à obtenir une solution possédant environ 1 UI de facteur Willebrand. Préparez 2 séries d'au moins 3 autres dilutions chacune dans le tampon de dilution.

*Solutions de référence.* Reconstituez la préparation de référence comme indiqué, puis diluez-la avec le tampon de dilution de façon à obtenir une solution possédant environ 1 UI de facteur Willebrand. Préparez 2 séries d'au moins 3 autres dilutions chacune dans le tampon de dilution.

Laissez la solution de collagène se réchauffer à température ambiante, puis diluez-la avec le diluant du collagène de façon à obtenir une solution de collagène à 30-75 µg/mL et mélangez doucement pour obtenir une suspension uniforme des fibrilles de collagène. Transférez à la pipette 100 µL de suspension dans chaque puits de la plaque de microtitrage. Couvrez la plaque avec un film plastique et incubez à 37 °C pendant une nuit. Videz les puits en retournant et laissant égoutter la plaque sur du papier absorbant. Ajoutez 250 µL de tampon de lavage. Videz à nouveau les puits en retournant et laissant égoutter la plaque sur du papier absorbant. Répétez 3 fois cette opération. Ajoutez dans chaque puits 250 µL de réactif de blocage, couvrez la plaque avec un film plastique et incubez à 37 °C pendant 1 h. Videz les puits en retournant et laissant égoutter la plaque sur du papier absorbant. Ajoutez 250 µL de tampon de lavage. Videz à nouveau les puits en retournant et laissant égoutter la plaque sur du papier absorbant. Répétez 3 fois cette opération.

Placez dans les puits soit 100 µL d'une des solutions à examiner ou des solutions de référence, soit 100 µL du tampon de dilution (témoins négatifs). Couvrez la plaque avec un film plastique et incubez à 37 °C pendant 2 h. Videz les puits en retournant et laissant égoutter la plaque sur du papier absorbant. Ajoutez 250 µL de tampon de lavage. Videz à nouveau les puits en retournant et laissant égoutter la plaque sur du papier absorbant. Répétez 3 fois cette opération.

Préparez une dilution appropriée du conjugué (par exemple 1/4000) dans du PBS contenant 5 g/L d'*albumine bovine R*, et ajoutez dans chaque puits 100 µL de cette dilution. Couvrez la plaque avec un film plastique et incubez à 37 °C pendant 2 h. Videz les puits en retournant et laissant égoutter la plaque sur du papier absorbant. Ajoutez 250 µL de tampon de lavage. Videz à nouveau les puits comme indiqué. Répétez 3 fois cette opération.

Ajoutez dans chaque puits 100 µL de solution de substrat et incubez à température ambiante, à l'obscurité, pendant 20 min. Ajoutez dans chaque puits 100 µL d'*acide chlorhydrique 1 M*.

Mesurez l'absorbance à 492 nm. A partir des valeurs de l'absorbance, déterminez l'activité de la préparation à examiner par les méthodes statistiques habituelles (par exemple *5.3*).

Le dosage n'est pas valable si les absorbances mesurées pour les témoins négatifs sont supérieures à 0,05.

**01/2008:20722**

## 2.7.22. DOSAGE DU FACTEUR XI DE COAGULATION HUMAIN

Le principe de ce dosage repose sur la mesure de la capacité d'une préparation de facteur XI à réduire le temps de coagulation prolongé d'un plasma déficient en facteur XI. La réaction est accélérée par addition d'un réactif contenant des phospholipides et un activateur de contact tel que le kaolin, la silice ou l'acide ellagique. L'activité est évaluée par comparaison de la courbe dose-réponse obtenue avec la préparation à examiner à celle obtenue avec une préparation de référence constituée de plasma humain normal.

1 unité de facteur XI correspond à l'activité de 1 mL de plasma humain normal. Le plasma humain normal est préparé par mélange d'unités de plasma provenant d'au moins 30 donneurs et conservé à une température inférieure ou égale à – 30 °C.

Reconstituez séparément la préparation à examiner et la préparation de référence selon les indications figurant sur l'étiquette, et utilisez-les immédiatement. Si la préparation à examiner contient de l'héparine, déterminez-en la quantité (*2.7.12*) et neutralisez-la, par exemple par addition de *sulfate de protamine R* (10 µg de sulfate de protamine neutralisent 1 UI d'héparine). Diluez au préalable la préparation à examiner et la préparation de référence avec du plasma déficient en facteur XI (par exemple du *substrat de plasma R3*) pour obtenir des solutions à 0,5-2,0 unités/mL. Préparez au moins 3 séries de dilutions appropriées pour chaque matière, de préférence en double, avec une solution tampon appropriée (par exemple de la *solution tampon imidazole pH 7,3 R*) contenant 10 g/L d'albumine bovine ou humaine. Ces dilutions doivent être utilisées immédiatement.

Utilisez un appareil approprié à la mesure des temps de coagulation ou effectuez le dosage avec des tubes à incubation maintenus dans un bain-marie à 37 °C. Dans chaque tube, introduisez 0,1 mL de plasma déficient en facteur XI (par exemple du *substrat de plasma R3*) et 0,1 mL d'une des dilutions de la préparation de référence ou de la préparation à examiner. Ajoutez à chaque tube 0,1 mL d'un réactif APTT (temps de thromboplastine partielle activée) approprié contenant des phospholipides et un activateur de contact, puis incubez à 37 °C pendant une durée recommandée. Ajoutez à chaque tube 0,1 mL d'une solution de *chlorure de calcium R* à 3,7 g/L chauffée au préalable à 37 °C. A l'aide d'un chronomètre, mesurez le temps de coagulation, c'est-à-dire l'intervalle de temps qui sépare l'addition du chlorure de calcium du premier signe de formation de fibrine. Les volumes indiqués plus haut peuvent être adaptés en fonction du réactif APTT et de l'appareil utilisés. Calculez l'activité par les méthodes statistiques habituelles (voir chapitre *5.3* par exemple).

**01/2008:20723**

## 2.7.23. NUMÉRATION DES CELLULES CD34/CD45+ DANS LES PRODUITS HÉMATOPOÏÉTIQUES

La présente méthode décrit le marquage immunologique et l'analyse par cytométrie en flux (*2.7.24*) pour déterminer le nombre de cellules CD34/CD45+ contenues dans les produits hématopoïétiques. La détermination se fait par méthode simple plateforme utilisant des billes fluorescentes calibrées, après la lyse des globules rouges de l'échantillon, si nécessaire.

Cette méthode s'applique à tous types de préparations et au sang total. Néanmoins, le niveau de précision atteint est tout particulièrement adapté aux préparations contenant de très faibles pourcentages de cellules CD34/CD45+ .

**Evaluation de la qualité du greffon par la mesure du nombre de cellules CD34/CD45+**

Différentes études ont établi que les cellules de la moelle osseuse qui expriment l'antigène de surface CD34 (1-3 pour cent) sont capables de reconstituer une hématopoïèse multilignée à long terme, après une thérapie myéloablative. On trouve également des cellules CD34/CD45+ dans la circulation périphérique d'individus normaux, mais à des taux extrêmement bas (0,01-0,1 pour cent). Cependant, des cellules CD34/CD45+ peuvent aussi être mobilisées en grand nombre à partir de la moelle vers la circulation périphérique par des cytokines hématopoïétiques comme le facteur stimulant les colonies de granulocytes et/ou par chimiothérapie.

La technique utilisée pour la numération des cellules CD34/CD45+ doit satisfaire aux exigences suivantes :

– sensibilité élevée, du fait de la rareté des cellules souches hématopoïétiques,
– exactitude, par souci de pertinence clinique des résultats,
– reproductibilité, par souci de fiabilité clinique des résultats,
– rapidité, pour une analyse en temps réel.

**Sélection des paramètres**

Le titrage par cytométrie en flux utilise des anticorps monoclonaux disponibles dans le commerce qui sont directement couplés et marqués par un fluorochrome, des procédures de routine de marquage et de lyse du sang total, une stratégie de fenêtrage (*gating*) utilisant la dispersion de la lumière et une analyse par immunofluorescence utilisant une combinaison d'anticorps monoclonaux CD45/CD34.

Il est possible de déterminer la viabilité des cellules CD34/CD45+ par une coloration appropriée des acides nucléiques, à l'aide d'un colorant qui ne traverse pas la membrane cellulaire intacte (par exemple, avec la 7-aminoactinomycine D).

**Sélection des anticorps monoclonaux**

*Anticorps anti-CD34.* Utilisez des anticorps anti-CD34 de classe III pouvant déceler toutes les glycoformes de la molécule (par exemple, les clones 8G12 ou 581). Pour permettre la détection d'évènements rares, utilisez un anticorps conjugué au fluorochrome le plus brillant excitable à l'aide d'un cytomètre en flux à laser argon, par exemple, la phycoérythrine (PE).

*Anticorps anti-CD45.* Il est nécessaire d'utiliser des anticorps de type pan anti-CD45 pouvant déceler toutes les isoformes et toutes les glycoformes de cette structure. Un anticorps anti-CD45 conjugué au fluorochrome, tel l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), est généralement utilisé (par exemple, J33, HLe1, 2D1).

*Contrôles isotypiques ou isocloniques.* Un témoin négatif est analysé pour déceler tout signal non spécifique dans la région de fluorescence de la PE. Dans le cas d'un témoin isotypique (un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène irrelevant du même isotype que l'anticorps CD34 utilisé), l'isotype conjugué à la PE est combiné au complexe CD45-FITC (ou PerCP). Dans le cas d'un témoin isoclonique, l'anticorps monoclonal CD34 non conjugué (en excès) et le même anticorps conjugué à la PE sont combinés au CD45 conjugué. Des combinaisons alternatives peuvent être utilisées.

**Valeur absolue des CD34/CD45+**

*Billes fluorescentes calibrées.* Selon la technique utilisée, l'étalon interne est constitué de billes calibrées en suspension ou est directement introduit par le fabricant dans les tubes associés.

La valeur absolue des cellules CD34/CD45+ par microlitre est calculée à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A}{B} \times C$$

$A$ = nombre de cellules CD34/CD45+ comptées,

$B$ = nombre de billes comptées,

$C$ = concentration connue en billes.

**Stratégies de fenêtrage**

L'objet du fenêtrage séquentiel est de sélectionner la population d'intérêt, tout en réduisant au minimum les interférences dues aux débris et aux cellules matures auxquelles les anticorps peuvent se lier de manière non spécifique. Si un kit commercial est utilisé, appliquez le fenêtrage recommandé par le fabricant. Si un titrage mis au point en interne est utilisé, il est préférable d'appliquer une des stratégies actuellement recommandées. Une stratégie de fenêtrage qui utilise les paramètres de la dispersion de la lumière et la fluorescence CD34/CD45 facilitera une identification exacte et la numération des cellules CD34/CD45+.

**Nombre d'événements analysés**

Un nombre suffisant d'évènements est analysé pour maintenir une précision acceptable, par exemple, au minimum 100 événements CD34+ et au minimum 60 000 événements CD45+ ; le nombre total de cellules comptées peut être supérieur si le pourcentage de CD34 est inférieur ou égal à 0,1 pour cent.

**Prélèvement des échantillons**

L'ACD (acide citrique, citrate de sodium, dextrose) formule A est l'anticoagulant utilisé dans les procédures d'aphérèse. Cet anticoagulant permet d'effectuer sur un même échantillon une numération leucocytaire automatisée et une évaluation par cytométrie en flux. L'acide édétique (EDTA) est l'anticoagulant de choix pour ce qui concerne l'échantillonnage du sang périphérique.

**Transport des échantillons**

Les conditions de transport visent à garantir la sécurité physique et thermique des échantillons.

**Intégrité et conservation des échantillons**

Les produits d'aphérèse frais (datant de moins de 24 h), les échantillons de sang total, de sang de cordon ombilical ou de moelle osseuse peuvent être traités. Les échantillons plus anciens (de plus de 24 h) et ceux qui ont été décongelés sont marqués avec un colorant mesurant la viabilité. A réception, la température est vérifiée à l'intérieur de l'emballage.

TECHNIQUE

**Préparation de l'échantillon**

Veillez à ce que la concentration en leucocytes soit appropriée avant le marquage par les anticorps monoclonaux. Si nécessaire, diluez l'échantillon dans un milieu compatible avec le produit à analyser et le système de lyse. Notez le facteur de dilution. Il est recommandé d'effectuer l'essai avec un témoin négatif.

**Analyse par cytométrie en flux**

*Auto-standardisation*

Pour l'analyse des cellules marquées à l'aide d'un kit disponible dans le commerce, les fabricants ont mis au point certains outils de qualité pour le réglage du cytomètre en flux. Ces réglages sont ensuite automatiquement transférés sur l'analyse de protocoles des échantillons. Des billes fluorescentes spécifiques sont utilisées pour régler le photomultiplicateur (PMT) sur les valeurs cibles, la compensation est réglée et le système vérifié à l'aide d'une préparation témoin.

*Paramétrage du système*

– *Discriminateur/seuil* : le seuil de diffusion frontale de la lumière est fixé de manière à exclure les débris (diffusion frontale basse) du tracé tout en conservant les petits lymphocytes.
– *Réglages du haut voltage du PMT* : ces réglages doivent être conformes à une analyse du marquage de surface cellulaire ; ils doivent être établis au sein de chaque laboratoire de façon à pouvoir faire une distinction entre les populations cellulaires négatives et positives à densité antigénique modérée. Les voltages du PMT sont examinés et ajustés périodiquement conformément aux procédures de laboratoire standardisées.
– *Compensation* : elle doit être acceptable vis-à-vis de la superposition spectrale des couleurs (par exemple, FITC/PE) rencontrée dans l'analyse du marquage de surface cellulaire. La compensation des fluorochromes est analysée et ajustée conformément aux procédures de laboratoire standardisées.
– *Débit* : le débit doit permettre une analyse de routine des marqueurs de surface cellulaires.
– *Fenêtrage des régions* : les régions établies par le fenêtrage pour les échantillons CD34/CD45 sont conservées en l'état pour l'analyse de la région négative.

**Calcul du nombre absolu de cellules CD34/CD45+**

Le nombre absolu de cellules CD34/CD45+ est calculé à partir de l'expression suivante :

$$n \times D \times V$$

$n$ = nombre total de cellules CD34/CD45+ par microlitre,

$D$ = facteur de dilution,

$V$ = volume de produit à analyser, en microlitres.

Les résultats sont enregistrés à la fois en pourcentage de cellules CD34/CD45+ et en nombre absolu par microlitre. Ils peuvent aussi être enregistrés en nombre absolu par kilogramme de masse corporelle du receveur, chaque fois que possible.

01/2008:20724

# 2.7.24. CYTOMÉTRIE EN FLUX

La cytométrie en flux consiste en une analyse multiparamétrique des propriétés optiques de particules individuelles dans un système fluidique.

Des cellules ou des particules en suspension sont individuellement réparties en un flux linéaire (courant) qui s'écoule à travers un dispositif de détection. Les tissus solides doivent être réduits en une suspension de cellules individuelles préalablement à l'analyse.

Le spectre des paramètres mesurables par cytométrie en flux comprend le volume et la complexité morphologique des cellules ou des structures d'apparence cellulaire, les pigments cellulaires, le contenu en ADN, le contenu en ARN, les protéines, les marqueurs de surface, les marqueurs intracellulaires, l'activité enzymatique, le pH et la fluidité membranaire.

Il est possible de capter 2 paramètres morphologiques plus 1 signal de fluorescence ou davantage par cellule. L'analyse multiparamétrique permet de définir des populations cellulaires par leur phénotype.

## APPAREILLAGE

La mise au point, le grossissement et le choix de la source lumineuse sont optimisés pour permettre la détection et la mesure automatiques des différences morphologiques et des profils de fluorescence. L'analyse cytofluorimétrique nécessite les critères suivants :

– le choix de la source de lumière en fonction des critères à analyser,
– l'ajustement des réglages instrumentaux en fonction du type cellulaire à analyser (par exemple, cultures cellulaires, leucocytes, plaquettes, bactéries, spermatozoïdes, levures) et de l'analyse à effectuer (par exemple, phénotypage, cycle cellulaire, apoptose, cytokines, fluidité membranaire, protéine fluorescente).

La cytométrie en flux est caractérisée par la quantification automatisée des paramètres fixés pour un nombre élevé de cellules individuelles lors de chaque session d'analyse. Par exemple, 100 000 particules ou plus (pratiquement aucune limite supérieure) sont généralement analysées l'une après l'autre en environ 1 min. La limite de détection peut être de seulement 100 molécules fluorescentes par cellule.

Un appareil de cytométrie en flux est composé de 5 éléments principaux :

– un système fluidique et une chambre d'écoulement,
– une source de lumière,
– un système de détection et de conversion analogique/numérique (CAN),
– un système d'amplification,
– un ordinateur fourni avec un logiciel permettant l'analyse des signaux.

*SYSTÈME FLUIDIQUE ET CHAMBRE D'ÉCOULEMENT*

Les cellules sont individuellement exposées à la source de lumière et détectées dans une chambre d'écoulement. Le système fluidique transporte l'une après l'autre les cellules en suspension du tube à échantillon vers le point d'interception avec le laser. Pour y parvenir, le courant d'échantillon est étiré par une veine liquide en un flux très fin dans la chambre d'écoulement (focalisation hydrodynamique). 2 lentilles confocales focalisent le faisceau lumineux en une forme elliptique sur la buse à travers laquelle circulent les cellules. Le débit doit être constant lors de l'analyse de routine des marqueurs de surface cellulaire et garantir le maintien entre les cellules d'une distance appropriée permettant le décompte cellulaire.

*SOURCES DE LUMIÈRE*

Les sources lumineuses couramment utilisées sont :

– des lampes (mercure, xénon),
– des lasers à haute puissance refroidis à l'eau (argon, krypton, laser à colorant),
– des lasers à basse puissance refroidis à l'air (argon (488 nm), hélium-néon rouge (633 nm), hélium-néon vert, hélium-cadmium (UV)),
– des lasers à diode (bleu, vert, rouge, violet).

*DÉTECTION DU SIGNAL*

Quand une particule passe à travers le faisceau lumineux, elle diffuse une partie de la lumière dans toutes les directions. Si la particule présente un marqueur fluorescent, le marqueur excité émet sa propre lumière (fluorescence). Cette lumière fluorescente irradie également dans toutes les directions. 2 types de signaux peuvent ainsi être générés :

– la diffusion de la lumière,
– l'émission de fluorescence.

Les détecteurs de lumière de l'appareil captent une partie de cette lumière diffusée ou fluorescente et produisent des signaux électroniques proportionnels à la quantité de lumière recueillie.

**Diffusion**. 2 paramètres de diffusion de la lumière sont mesurés :

– l'intensité de diffusion principalement frontale (diffusion frontale (*forward scatter (FS)*),
– l'intensité de diffusion à 90° par rapport à la direction du faisceau lumineux (diffusion latérale (*side scatter (SS)*)).

La diffusion frontale est en corrélation avec le volume cellulaire, tandis que la diffusion latérale dépend de paramètres tels que la forme du noyau, la quantité et le type de granules cytoplasmiques ou encore la rugosité de la membrane et est en corrélation avec la complexité morphologique de la cellule, de telle sorte que plus l'intensité de la diffusion latérale est élevée, plus la complexité cellulaire est élevée. Etant fonction des caractéristiques morphologiques des cellules, les signaux de diffusion sont toujours générés lors d'une analyse en flux ; ils sont définis comme paramètres intrinsèques.

**Fluorescence**. Selon le type et le nombre de sources lumineuses, quand une cellule passe à travers la zone de captage, elle émet une lumière fluorescente. Des signaux de fluorescence sont générés par les marqueurs fluorescents naturellement présents dans les cellules (par exemple, co-enzymes, chlorophylle, pigments d'algues) et/ou par des sondes fluorescentes absorbées par les cellules lors du marquage pour l'analyse de caractéristiques spécifiques (par exemple, anticorps fluorescents, marqueurs des acides nucléiques, sondes pH, sondes calciques, protéines fluorescentes). De par leurs types et leur nombre, les sondes fluorescentes disponibles constituent désormais une gamme très vaste. Les filtres optiques doivent être adaptés aux fluorochromes utilisés et changés si nécessaire. Chaque sonde fluorescente est caractérisée par son spectre d'excitation et son spectre d'émission. Elles sont choisies en fonction de la nature de la source d'excitation et du système de détection de l'appareil et selon l'objet spécifique de l'analyse.

*GESTION DU SIGNAL ET CONVERSION ANALOGIQUE EN NUMÉRIQUE*

Les signaux de diffusion et de fluorescence émis par les cellules quand elles passent à travers le faisceau laser sont triés et dirigés vers les détecteurs à l'aide de filtres optiques. Les détecteurs sont des transducteurs (photomultiplicateurs (PMT)) qui convertissent les signaux lumineux irradiant des cellules en impulsions de tension.

Le procédé consistant à compter chaque impulsion dans le canal approprié est connu sous le terme de conversion analogique numérique (CAN). Les résultats sont finalement classés selon un histogramme de fréquence.

**Amplification**. Les impulsions de tension doivent être amplifiées pour une visualisation optimale. Le procédé d'amplification accentue les différences entre les signaux cellulaires et augmente ainsi la résolution entre des populations cellulaires

aux caractéristiques différentes (permettant par exemple, la différenciation entre les cellules viables et non viables ou entre la fluorescence non spécifique et la fluorescence spécifique à un antigène après marquage par un anticorps monoclonal).

Il existe 2 voies d'amplification : linéaire ou logarithmique ; le choix entre les 2 types se fait pour chacun des signaux en fonction des caractéristiques morphologiques des cellules et des marqueurs utilisés (par exemple, anticorps monoclonaux fluorescents, marqueurs d'acides nucléiques).

L'*amplification linéaire*, qui accentue les différences entre les impulsions fortes, est utilisée avec les paramètres qui génèrent des signaux d'intensité élevée, comme par exemple :

– la diffusion de la lumière par les cellules,
– la fluorescence des marqueurs des acides nucléiques pour les études des cycles cellulaires.

L'*amplification logarithmique*, au contraire, concerne des impulsions et paramètres faibles ou des conditions analytiques pouvant générer à la fois des impulsions fortes et des impulsions faibles, comme par exemple :

– les antigènes cellulaires,
– la diffusion de la lumière par les plaquettes, les bactéries, les levures,
– la fluorescence de marqueurs d'acides nucléiques pour les études d'apoptose.

**Compensation des signaux de fluorescence**. Chaque marqueur fluorescent a un spectre de longueur d'onde d'absorption et un spectre plus élevé de longueur d'onde d'émission. Si 2 sondes fluorescentes ou plus sont utilisées simultanément pour marquer les cellules (comme par exemple, un immunophénotypage sur 4 antigènes), les spectres d'émission des fluorochromes peuvent se superposer. En conséquence, chaque détecteur de fluorescence capte la lumière fluorescente qui lui est spécifique et des quantités variables de lumière émises par d'autres sondes fluorescentes. Il en résulte une surestimation du signal et une mauvaise séparation des populations cellulaires.

La solution consiste à utiliser une matrice électronique permettant de soustraire sélectivement les signaux interférents de chaque signal de fluorescence capté par le détecteur (compensation de la fluorescence).

La compensation de la fluorescence nécessite l'utilisation d'étalons de fluorescence, de préférence des échantillons cellulaires positifs marqués avec les fluorochromes d'intérêt combinés de façon équivalente à l'anticorps utilisé pour l'analyse.

*TRACÉ DU SIGNAL ET REPRÉSENTATION*

Après amplification et compensation, les signaux sont représentés en 2 ou 3 dimensions. Les histogrammes représentent l'intensité des signaux en fonction du nombre de cellules pour un paramètre donné. Les cytogrammes, où chaque cellule est représentée par un point, résultent de la combinaison de 2 intensités de signaux (représentation biparamétrique). Le type et le nombre de points et de combinaisons de signaux sont choisis sur la base des échantillons et des sondes utilisés. Pendant l'analyse des données acquises, le logiciel de cytométrie en flux peut en outre générer d'autres types de graphiques (superpositions, courbes de niveau, tomographie, contour 3D, diagramme d'isodensités, tracés superposés). Des données statistiques comme les intensités fluorescentes moyennes (et leurs variations avec le temps ou selon la fonction cellulaire) peuvent en outre être utilisées.

*ANALYSE DES DONNÉES*

Au sein des suspensions de cellules à analyser, différentes sortes de populations cellulaires peuvent être présentes ; certaines peuvent être indésirables (cellules mortes, débris ou macro-agrégats), ou simplement non pertinentes pour l'analyse (par exemple, des granulocytes dans le cadre d'une étude des lymphocytes). Cela dépend du type d'échantillon cellulaire (sang total, moelle osseuse, cultures cellulaires, liquides biologiques, suspensions cellulaires issues de tissus solides) et des procédures de manipulation (comme par exemple, les méthodes de coloration, la lyse, la fixation, la cryoconservation, la décongélation, la préparation des tissus inclus dans la paraffine).

En conséquence, tous les signaux générés au cours d'une analyse par cytométrie en flux n'appartiennent pas aux cellules à examiner. 2 stratégies sont adoptées pour exclure les signaux cellulaires indésirables ou non pertinents.

La 1$^{e}$ est utilisée lors de l'acquisition des données. Elle consiste en un seuil de bruit, appliqué à 1 (ou plusieurs) paramètre(s) significatif(s), fixé de telle façon que seuls soient enregistrés les signaux cellulaires d'intensité supérieure à la valeur discriminatoire prédéfinie pour un paramètre donné. La diffusion frontale se caractérisant par un signal fort associé à de faibles interférences, ce paramètre est le plus souvent utilisé comme discriminateur.

La 2$^{nde}$ stratégie, appliquée pendant l'analyse des données, consiste à utiliser des combinaisons de régions (*gating*) pour restreindre l'analyse aux seuls signaux provenant des populations qui satisfont à des caractéristiques morphologiques et de profil d'expression données. 2 types de combinaisons logiques de régions sont couramment utilisés. Le 1$^{er}$ est le fenêtrage morphologique. Les populations cellulaires sont identifiées par leurs signaux morphologiques (FS et SS). Une combinaison de régions est tracée autour de la population d'intérêt (comme par exemple les lymphocytes ou les cellules viables) puis le pointage des signaux de fluorescence se fait au sein des régions choisies. Le 2$^{nd}$ type de fenêtrage est basé sur la fluorescence. La population cellulaire d'intérêt est identifiée sur la base de l'intensité de l'expression d'un antigène ou d'un marqueur. Le contour de la région délimitant cette population est alors tracé. Le pointage des signaux de fluorescence se fait ensuite au sein des régions choisies.

Le logiciel d'analyse permet la création de fenêtrages multiples, suivant un ordre logique séquentiel. Cette fonction est particulièrement utile pour l'étude de populations cellulaires rares ou à des fins de tri.

*CONTRÔLES*

**Contrôle interne**. L'alignement optique du système doit être validé avant l'analyse à l'aide de fluorosphères adaptées et la stabilité fluidique optimale est vérifiée. Les données obtenues sont enregistrées et permettent l'examen des valeurs issues des contrôles périodiques en les comparant à la valeur moyenne de performance. Un contrôle positif est grandement souhaitable pour prouver que l'anticorps à examiner est fonctionnel et pour permettre un réglage approprié du cytomètre. Le contrôle positif doit comprendre des échantillons dont il est établi qu'ils sont positifs pour le marqueur en question.

**Contrôle externe**. Pour garantir la fiabilité des données obtenues ou vérifier la reproductibilité entre laboratoires, il est recommandé de participer à une étude de performance.

**07/2009:20725**

## 2.7.25. DOSAGE DE L'INHIBITEUR DE PLASMINE HUMAIN

L'inhibiteur de plasmine humain, aussi appelé $\alpha_2$-antiplasmine humaine, est une protéine plasmatique qui agit comme inhibiteur de la voie de fibrinolyse réalisée par la plasmine, une sérine-protéase, en formant rapidement un complexe avec la plasmine libre. Par ailleurs, lors de la coagulation sanguine, l'inhibiteur de plasmine humain forme un réseau avec les brins de fibrine sous l'action du facteur XIII et empêche la fixation de la proenzyme plasminogène à la fibrine.

L'activité de l'inhibiteur de plasmine humain est estimée par comparaison de la capacité respective de la préparation à examiner et d'un étalon de référence d'inhibiteur de plasmine

humain à inhiber le clivage par la plasmine d'un substrat chromogène spécifique, ce clivage libérant un chromophore quantifiable par spectrophotométrie.

Les réactifs requis sont disponibles dans le commerce séparément ou sous forme de kits, et il existe des méthodes au point final et des méthodes cinétiques. Les procédures et réactifs peuvent varier selon les kits et il convient de se conformer aux instructions du fabricant. Les grandes lignes de la méthode sont décrites ci-après à partir de l'exemple d'une méthode cinétique sur plaque de microtitrage.

RÉACTIFS

*Tampon de dilution pH 7,5.* Tampon de dilution approprié conforme aux instructions du fabricant. Ajustez le pH si nécessaire.

*Plasmine.* De préférence, préparation de plasmine humaine ne contenant pas d'autres protéases en quantité significative. Reconstituez et conservez la préparation suivant les instructions du fabricant.

*Substrat chromogène de la plasmine.* Substrat chromogène approprié spécifique de la plasmine : chlorhydrate de H-D-cyclohexylalanyl-norvalyl-lysyl-*p*-nitroaniline (H-D-CHA-Nva-Lys-*p*NA.HCl) ou chlorhydrate de L-pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-lysyl-*p*-nitroaniline (Glp-Phe-Lys-*p*NA.HCl). Reconstituez avec de l'*eau R* suivant les instructions du fabricant, de façon à obtenir une concentration appropriée.

MODE OPÉRATOIRE

La méthode consiste à mélanger des quantités variables de la préparation à examiner avec une quantité donnée de plasmine, puis à déterminer l'activité plasmine résiduelle au moyen d'un substrat chromogène approprié.

Reconstituez ou décongelez la préparation à examiner suivant les instructions du fabricant. Diluez avec le tampon de dilution pH 7,5 et préparez au moins 2 séries indépendantes de 3 ou 4 dilutions de la préparation à examiner et de la préparation de référence.

Mélangez 0,020 mL de chaque dilution avec 0,020 mL du tampon de dilution pH 7,5 et chauffez à 37 °C. Ajoutez 0,040 mL d'une solution de plasmine de concentration comprise entre 0,2 nkat/mL et 1,6 nkat/mL, préalablement chauffée à 37 °C, et placez à 37 °C pendant 1 min. Ajoutez à chaque mélange 0,020 mL de la solution de substrat chromogène, préalablement chauffée à 37 °C. Procédez immédiatement à la mesure de la variation d'absorbance (*2.2.25*) à 405 nm au moyen d'un lecteur de plaques de microtitrage. Calculez la vitesse de variation d'absorbance (ΔA/min). Il est également possible de procéder à une mesure en point final en stoppant la réaction avec de l'acide acétique avant de mesurer l'absorbance à 405 nm.

Dans les deux cas, il convient de choisir la durée du clivage du substrat chromogène de façon à obtenir un accroissement linéaire de l'absorbance à 405 nm, avant que l'épuisement du substrat devienne significatif. Si le dosage est effectué dans des tubes à essai ou des cuves au moyen d'une méthode spectrophotométrique, il convient d'adapter en conséquence les volumes de solutions utilisés.

Soustrayez la densité optique obtenue avec le blanc (préparé avec le tampon de dilution pH 7,5) de la densité optique obtenue avec la préparation à examiner. Vérifiez la validité du dosage et calculez l'activité de la préparation à examiner par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*).

**01/2008:20727**

# 2.7.27. INDICE DE FLOCULATION (Lf) DES TOXINES ET ANATOXINES DIPHTÉRIQUES ET TÉTANIQUES (TITRAGE DE RAMON)

La teneur en toxine ou anatoxine dans un échantillon peut être exprimée par un indice de floculation (Lf) en utilisant le titrage de Ramon. Dans ce titrage, l'antitoxine est ajoutée en concentrations croissantes à des séries de tubes contenant une quantité constante de toxine ou d'anatoxine. Au point d'équivalence toxine/anatoxine et antitoxine, une floculation se produit dans 1 ou plusieurs tubes. Le 1^er^ tube dans lequel la floculation a lieu est utilisé pour déterminer l'indice Lf de l'échantillon.

L'indice Lf d'une toxine ou anatoxine est déterminé par le nombre d'unités d'antitoxine qui, mélangées à l'échantillon, produisent un mélange floculant maximal (titrage de Ramon).

L'expérience pratique a montré que la calibration des antitoxines en Unités Internationales (UI), par exemple par comparaison à des étalons internationaux d'antitoxines, dépend de la méthode immunochimique utilisée. Pour cette raison, les antitoxines utilisées pour le titrage de Ramon doivent être directement calibrées par rapport aux *réactifs biologiques internationaux de référence pour les essais de floculation des anatoxines diphtériques ou tétaniques*, en utilisant les principes décrits ci-après. La concentration ainsi déterminée peut être indiquée en équivalents Lf par millilitre (éq-Lf/mL).

Par définition, 1 Lf est la quantité de toxine ou d'anatoxine qui permet la floculation la plus rapide en présence de 1 éq-Lf d'antitoxine spécifique.

Une gamme de volumes de l'étalon de référence d'antitoxine ajustée à une concentration de 100 éq-Lf/mL est répartie dans une série de tubes de floculation de 7 cm × 1 cm par exemple. Une quantité suffisante de solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L est ajoutée à chaque tube pour obtenir un volume total constant de par exemple 1 mL. L'échantillon à examiner est dilué à une concentration supposée d'environ 50 Lf/mL, et des aliquotes de par exemple 1 mL de cette dilution sont distribuées dans chacun des tubes contenant l'antitoxine. Les tubes sont correctement mélangés en secouant, puis placés dans un bain-marie à température constante entre 30 °C et 52 °C, et observés à intervalles réguliers afin de déceler la première apparition des flocules. Ces observations peuvent nécessiter l'utilisation d'une loupe sous fort éclairage.

Les 1^er^ et 2^nd^ mélanges à floculer sont notés ainsi que le temps écoulé avant l'apparition de la 1^re^ floculation. 2 tubes peuvent floculer simultanément.

Le 1^er^ tube à floculer est celui qui contient la quantité d'antitoxine la plus proche en équivalence de la quantité d'antigène présente dans l'échantillon. La teneur en antitoxine de ce tube peut être utilisée pour calculer l'indice Lf de l'échantillon. Si 2 tubes floculent en même temps, le résultat est obtenu en faisant la moyenne des tubes.

Le temps écoulé avant la 1^re^ floculation (Kf) constitue un indicateur utile de la qualité de l'antigène. Une augmentation par rapport à la normale de la valeur Kf à une température et une concentration d'anatoxine et d'antitoxine données indique que l'antigène a été détérioré. La valeur Kf peut également varier avec la qualité de l'antitoxine utilisée.

*Exemple*

| Tube | A | B | C | D | E | F |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Antitoxine ajoutée (éq-Lf) | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 |
| Antitoxine ajoutée (mL) | 0,40 | 0,45 | 0,50 | 0,55 | 0,60 | 0,65 |
| Solution saline ajoutée (mL) | 0,60 | 0,55 | 0,50 | 0,45 | 0,40 | 0,35 |
| Echantillon dilué ajouté | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |

Dans cet exemple, si le 1er tube à présenter une floculation est le tube C, l'indice Lf de l'échantillon dilué est donc de 50 Lf/mL. Cependant, si le 1er tube à présenter une floculation est le tube A ou le tube F, il ne peut y avoir d'indication d'équivalence à ce niveau. Il serait dans ce cas nécessaire de répéter l'essai en modifiant la dilution de l'échantillon à examiner ou la gamme des doses d'antitoxine de référence.

Une plus grande précision peut être obtenue en tenant compte de la séquence de floculation après le 1er tube. Ainsi, dans l'exemple cité, si le 2nd tube à présenter une floculation est le tube D, l'indice final relatif à l'échantillon dilué sera de 52, alors que si le 2nd tube à présenter une floculation est le tube B, l'indice final sera de 48. L'essai peut être effectué en double avec des dilutions légèrement différentes de l'échantillon à examiner.

S'il n'existe aucune indication de l'indice Lf supposé de l'échantillon disponible, il est conseillé d'obtenir une estimation approximative en utilisant une gamme plus large de teneurs en antitoxine dans les tubes avant de procéder à l'essai final.

*Exemple*

| Tube | A | B | C | D | E | F |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Teneur en antitoxine (éq-Lf) | 20 | 30 | 45 | 70 | 100 | 150 |

Les niveaux de concentration en toxine ou anatoxine et en antitoxine dans l'essai peuvent varier mais cela peut affecter considérablement le temps de floculation, si bien qu'à des niveaux très bas l'essai durera trop longtemps, tandis qu'à une concentration élevée, la floculation risque de survenir si brusquement qu'elle rendra difficile la distinction entre le 1er et le 2nd tube à présenter une floculation.

**Titrage des faibles concentrations par floculation après mélange**

Pour les concentrations très faibles, il est préférable de mesurer les toxines ou les anatoxines par la méthode de floculation après mélange. Cette méthode consiste à comparer l'indice Lf d'une toxine ou d'une anatoxine connue avec celui d'un mélange de l'échantillon et de cette toxine ou anatoxine.

Dans le cas d'un mélange d'une toxine ou anatoxine d'indice Lf connu et d'une toxine ou anatoxine d'indice Lf inconnu, l'indice Lf obtenu correspondra à la somme de leurs indices respectifs si elles sont homogènes. Si des toxines ou anatoxines non homogènes sont mélangées, elles produiront un profil aberrant avec 2 maximums de floculation.

**01/2008:20728**

# 2.7.28. TITRAGE DES PROGÉNITEURS HÉMATOPOÏÉTIQUES HUMAINS FORMANT COLONIE

Le système hématopoïétique représente un continuum de cellules dont les phénotypes et propriétés changent au cours de leur progression de l'état de cellules souches à celui de cellules différenciées.

Les progéniteurs hématopoïétiques ont la propriété de former des colonies ou « amas cellulaires » dans des cultures en milieu semi-solide ; ils sont dits clonogéniques. La quantification du nombre de cellules formant colonie (CFC) dans un produit cellulaire constitue un indicateur de la capacité fonctionnelle des progéniteurs et est un critère prédictif de la reconstitution hématopoïétique. Le nombre mesuré de CFC est corrélé au nombre minimal de progéniteurs présents dans l'échantillon.

## MARQUEURS DE LA SURFACE CELLULAIRE

La capacité des cellules formant colonie à donner naissance à des colonies hématopoïétiques *in vitro* et/ou à reconstituer le système hématopoïétique a été corrélée à l'expression d'antigènes spécifiques de la surface cellulaire. L'expression de l'antigène membranaire CD34 est un marqueur reconnu pour la plupart des progéniteurs et des cellules souches hématopoïétiques.

## SPÉCIFICITÉ DU TITRAGE DE COLONIES

Les cellules formant colonie sont identifiées selon une nomenclature basée sur les lignées des cellules matures présentes dans la colonie (par exemple, CFU-Mix, CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-G, CFU-M, BFU-E, CFU-E, CFU-Meg) et constituent une population de progéniteurs capable de donner lieu à la formation de colonies contenant une ou plusieurs lignées de cellules hématopoïétiques. Par comparaison aux cellules souches les plus immatures une capacité d'autorenouvellement faible ou nulle a été attribuée à cette population de progéniteurs hématopoïétiques humains.

La quantité et le type de facteurs de croissance fournis lors de la culture modulent le type et la taille des colonies formées.

Une plus grande spécificité sur la classe générale des progéniteurs hématopoïétiques et sur leur potentiel relatif de prolifération est fournie par le temps nécessaire à la différenciation *in vitro* en cellules matures. La durée nécessaire aux cellules post-natales formant colonie pour générer une colonie constituée de cellules matures *in vitro* est de 10-14 jours.

## ASSURANCE QUALITÉ RELATIVE AU TITRAGE DES CFC

L'application d'une approche strictement standardisée est essentielle à la qualité globale du titrage des cellules formant colonie. Il est donc recommandé de procéder à des validations intra- et inter-laboratoires. La source des matériaux, y compris les réactifs, les facteurs de croissance et le matériel à usage unique est identifiée.

Les principaux facteurs de variabilité dans le titrage des CFC sont le nombre de cellules ensemencées et l'identification des colonies. Une variabilité intra-laboratoire allant jusqu'à 15 pour cent peut être observée pour le même essai. S'il est nécessaire d'évaluer le nombre de cellules formant colonie dans une population de cellules purifiées, il est possible d'utiliser une approche par dilution limite dans laquelle le nombre de puits positifs pour la prolifération cellulaire est mesuré par un système automatisé.

L'autre source principale de variabilité provient de l'utilisation de matériaux non définis (par exemple, sérum bovin foetal ou sérum-albumine bovine) dans le titrage des CFC. Ces produits dérivent de mélanges de matières premières et fournissent une stimulation non spécifique de la prolifération cellulaire. Cependant, il n'est pas rare de disposer de lots à caractéristiques particulières qui stimulent sélectivement la prolifération de lignées hématopoïétiques spécifiques.

Enfin, un faible niveau d'endotoxines (moins de 0,01 UI/mL ou moins de 0,01 UI/mg) est recommandé dans tous les matériaux utilisés pour le titrage clonogénique car des niveaux plus élevés entraînent, dans un premier temps, une déviation progressive de l'expression des lignées hématopoïétiques dans les cultures et, ultérieurement, une inhibition plus générale de la prolifération cellulaire et de la clonogénèse.

## TITRAGE CLONOGÉNIQUE DES CFC

Le titrage des CFC est basé sur la capacité des progéniteurs, ensemencés dans un milieu semi-solide ou dans un gel, à former une colonie en présence de facteurs de croissance spécifiques. Différents types de milieux semi-solides peuvent être utilisés (méthylcellulose, collagène, agar et *plasma-clot* par exemple)

en fonction de la lecture souhaitée du résultat. Les milieux disponibles dans le commerce donnent généralement des résultats plus reproductibles.

*MATÉRIAUX*

Une validation est effectuée au moins pour les matériaux critiques suivants.

**Facteurs de croissance**. Des facteurs de croissance à la fois multipotents (tels que le Kit-ligand ou le SCF, l'interleukine-3, le GM-CSF) et spécifiques à une lignée (érythropoïétine, G-CSF) sont nécessaires pour obtenir le plus grand nombre de colonies à partir d'une suspension cellulaire contenant une population mixte de progéniteurs hématopoïétiques.

**Autres composants des milieux**. Les milieux peuvent être supplémentés en sérum (notamment en sérum bovin foetal) et/ou en albumine.

*MISE EN CULTURE*

**Cellules**. L'échantillon mis en culture doit être représentatif du produit cellulaire injecté. Des suspensions cellulaires sont nécessaires pour ce titrage. Dans le cas d'aspirats de moelle osseuse, de telles suspensions peuvent être obtenues en forçant le passage de la moelle osseuse à travers un tamis ou à travers des aiguilles de calibrage de plus en plus petit. Des passages répétés à travers une aiguille de 21 gauges suffisent généralement à disperser les agrégats cellulaires afin d'obtenir une suspension cellulaire.

*ENSEMENCEMENT ET LECTURE*

Les cellules diluées dans le milieu de culture sont mélangées au milieu semi-solide. Il est courant d'ensemencer 1 mL du mélange dans une boîte de Pétri stérile non traitée (Ø 35 mm).

Du fait de la viscosité du milieu, la solution ne peut pas être ensemencée avec des pipettes à déplacement d'air et il est nécessaire d'utiliser des seringues munies d'une aiguille de gros calibre (≤ 18 gauges).

Le nombre de cellules à ensemencer dépend de la concentration en progéniteurs hématopoïétiques dans l'échantillon à examiner. Pour éviter qu'une colonie ne dérive de 2 progéniteurs hématopoïétiques différents, le nombre de cellules ensemencées doit permettre d'obtenir un nombre de colonies par boîte (Ø 35 mm) compris entre 40 et 80. Le nombre de colonies « ciblé » par boîte est obtenu soit à partir du pourcentage de CD34+ (ou concentration de cellules CD34+/mL) déterminé par cytométrie en flux (*2.7.24*), soit à partir de différentes dilutions de la suspension cellulaire (généralement 2 concentrations sont testées).

Incubez les boîtes dans des conditions aérobies à une concentration en dioxyde de carbone de 5 pour cent, à 37 °C et en atmosphère humide (à saturation) pendant 10-14 jours. Comptez ensuite le nombre de colonies sous un microscope inversé. Pendant la manipulation des boîtes contenant les colonies veillez à ce que le milieu à base de méthylcellulose soit visqueux mais pas gélifié. Une boîte inclinée entraînera la formation de colonies mixtes en forme de comète, ce qui est susceptible de fausser le comptage.

*IDENTIFICATION DES COLONIES*

La taille et la structure des colonies dépendent du type de cellules matures qui les constituent. Une concentration de 50 cellules par colonie est généralement considérée comme un minimum. La présence de cellules hémoglobinisées identifie les progéniteurs de la lignée érythroïde. Etant donné que la quantité de cellules matures pour chaque lignée dépend en grande partie des facteurs de croissance ajoutés aux cultures, il n'est pas recommandé d'effectuer des dénombrements différenciés sauf indication contraire.

*EXPRESSION DES RESULTATS*

Les résultats de la culture des CFC sont habituellement exprimés comme la moyenne arithmétique des colonies comptées sur au moins 3 boîtes au cours de l'essai. Le nombre moyen de colonies est ensuite rapporté à $10^4$ ou $10^5$ cellules nucléées viables mises en culture.

**01/2008:20729**

# 2.7.29. NUMÉRATION ET VIABILITÉ DES CELLULES NUCLÉÉES

La détermination de la qualité des suspensions cellulaires implique des mesures exactes à la fois de la concentration cellulaire et du pourcentage de cellules viables. Ces données sont essentielles au processus de prise de décision pour la préparation de produits cellulaires et le maintien de conditions de culture optimales. La numération des cellules peut être exprimée en fonction du volume de suspension cellulaire. La viabilité peut être exprimée par le nombre de cellules viables en fonction du volume de suspension cellulaire. La procédure de numération des cellules peut être réalisée manuellement (hémocytomètre) ou à l'aide d'un automate (compteur de particules, cytomètre en flux, par exemple). D'autres méthodes que celles décrites ci-après peuvent être utilisées.

NOMBRE DE CELLULES

*MÉTHODES MANUELLES DE NUMÉRATION*

*Description du matériel et principe de l'essai*. Le matériel suivant est nécessaire :

– un hémocytomètre : cellule de numération spécialisée de microscope, disponible en différents modèles. Il est constitué d'une lame et d'une lamelle épaisses, montées de façon à délimiter une chambre d'un volume spécifique défini pour chaque modèle. La lame épaisse des différents hémocytomètres comprend des cellules de comptage séparées par de profonds sillons pour éviter tout écoulement entre les cellules. La cellule de comptage gravée dans le verre comporte un quadrillage spécifique au modèle,
– un microscope optique à grossissement de faible puissance 10× à 40×,
– des pipettes d'une gamme appropriée de volumes.

L'hémocytomètre est utilisé pour quantifier le nombre de cellules dans une solution donnée en calculant la concentration cellulaire (*C*) à l'aide de l'expression suivante :

$$a \times 10^n \times d$$

*a* = nombre de cellules comptées,

*d* = facteur de dilution (dans les cas appropriés),

*n* = facteur variant en fonction du volume de la chambre de l'hémocytomètre.

Dans le cas de populations cellulaires mixtes, il est possible de distinguer les populations entre elles, sous réserve que les cellules diffèrent en taille ou en pigmentation (leucocytes et érythrocytes, par exemple).

*Préparation de la cellule de numération et analyse*. Assemblez la lamelle (légèrement humidifiée sur les bords) et la lame. Déplacez la lamelle d'avant en arrière au-dessus de la lame de comptage, en appliquant une légère pression sur les côtés. Préparez une dilution appropriée de la suspension cellulaire en tampon isotonique ou en tampon de lyse des hématies.

Ajoutez un volume adapté de la dilution dans la cellule de comptage. Le liquide est déposé sur le bord de la lamelle puis s'écoule par capillarité à l'intérieur de la cellule. Placez minutieusement l'hémocytomètre sous le microscope et effectuez la mise au point. Comptez les cellules dans une zone du quadrillage. Calculez la concentration cellulaire dans l'échantillon dilué et dans l'échantillon d'origine.

Pour une plus grande exactitude de la mesure, il est important de respecter les précautions de base suivantes :

– n'utilisez que des lamelles d'épaisseur appropriée ;
– chaque fois que possible, comptez plus de 100 cellules (en prenant en compte, si nécessaire, un plus grand nombre de surfaces de comptage) ;

– si des agrégats de cellules sont décelés (si la suspension cellulaire n'est pas constituée de cellules bien séparées), renouvelez la mise en suspension des cellules avant l'échantillonnage et répétez la numération ;
– veillez à obtenir un volume exact en évitant tout remplissage insuffisant ou excessif de la cellule.

*MÉTHODES AUTOMATISÉES DE NUMÉRATION*

*Compteurs de particules basés sur la variation de la conductivité.* Les instruments de comptage électronique des particules mesurent la taille et le nombre des particules dans une solution.

Les compteurs de particules sont étalonnés avant emploi à l'aide d'une solution de particules de taille et de concentration connues. Pour permettre le comptage de particules plus grandes, des tubes munis d'orifices de calibres différents sont disponibles. Ces appareils ne permettent pas la discrimination entre cellules mortes et vivantes. Les débris cellulaires pouvant également générer des impulsions et être ainsi à l'origine d'erreurs, les compteurs sont également munis d'un système de contrôle du seuil qui n'autorise que le comptage des particules les plus grandes.

L'appareil doit être qualifié pour la numération du produit cellulaire (en termes de linéarité, exactitude, ...).

*Compteurs de particules basés sur la cytométrie en flux* (*2.7.24*). Le cytomètre en flux doit être étalonné à l'aide de particules de référence de taille et de concentration connues pour donner un nombre absolu de cellules par volume. Cependant, pour les instruments utilisant 2 électrodes insérées dans la cellule d'échantillonnage, une solution d'étalonnage n'est plus nécessaire. Les dimensions de la cellule d'échantillonnage et la distance entre les 2 électrodes sont fixes et permettent de mesurer le contenu d'un volume fixé. Il est rarement nécessaire d'étalonner ce type d'instruments après le réglage initial.

VIABILITÉ

Cette section s'applique au marquage cellulaire par des colorants de viabilité, et à l'analyse manuelle ou automatisée sous microscope optique ou par cytométrie en flux, d'une suspension cellulaire de manière à déterminer le pourcentage de cellules viables.

Selon le type de cellules et la méthode utilisée, les résultats peuvent différer.

*MÉTHODE MANUELLE PAR COLORATION D'EXCLUSION*

*Principe de l'essai.* Cet essai est basé sur l'exclusion du colorant par les cellules viables alors que les cellules mortes ou endommagées absorbent le marqueur et sont colorées. Il fournit des informations sur l'intégrité de la membrane cytoplasmique mais ses résultats ne reflètent pas nécessairement la fonctionnalité cellulaire. Des cellules vivantes récemment traitées à la trypsine ou des cellules décongelées peuvent présenter des membranes perméables qui absorberont le colorant.

*Colorant.* Le bleu trypan est le colorant le plus couramment utilisé pour distinguer les cellules viables des cellules non viables, mais d'autres colorants appropriés peuvent être utilisés, comme l'érythrosine B ou la nigrosine. C'est un colorant acide ($M_r$ 961). En tant qu'anion comprenant 4 groupes sulfonate, il peut facilement se lier aux protéines. La concentration en protéines de la préparation à examiner doit donc être aussi faible que possible.

*Conditions de l'essai.* La fixation du colorant est fortement influencée par le pH, dans un intervalle allant de 6,6 à 7,6. La fixation est optimale à pH 7,5. Les autres conditions, comme la concentration du colorant et la durée de la coloration sont validées.

*Conditions de conservation du colorant.* Une solution de bleu trypan à 0,4 ou 0,5 pour cent dans une solution saline tamponnée phosphate stérile est généralement utilisée. Conservez la solution à l'abri de la lumière et de l'air.

*Préparation de l'essai et analyse.* Colorez la suspension cellulaire à la dilution souhaitée (généralement dans une solution saline tamponnée phosphate) avec, par exemple, une solution de bleu trypan de 0,1 à 0,2 pour cent au final. Mélangez doucement. Laissez incuber pendant au maximum 2-4 min, à température ambiante. Mélangez doucement et placez un volume approprié de la solution dans une cellule de comptage. Débutez la numération sans attendre.

Déterminez le pourcentage de cellules viables à partir du rapport entre le nombre de cellules non colorées et le nombre total de cellules observées sous un microscope optique, en considérant que toutes les cellules colorées sont mortes. La viabilité (*V*) est exprimée en pourcentage et calculée en utilisant l'expression suivante :

$$\frac{n}{N} \times 100$$

$n$ = nombre de cellules non colorées (viables),

$N$ = nombre total de cellules (colorées et non colorées).

Il est essentiel que la durée de l'incubation soit au maximum de 4 min car le nombre de cellules colorées peut augmenter de manière significative après ce délai. Pour effectuer une nouvelle détermination, il peut donc être nécessaire de préparer un nouvel essai.

*MÉTHODES AUTOMATISÉES*

**Cytométrie en flux**

*Principe de l'essai.* L'essai est basé sur la capacité de certains marqueurs à traverser les membranes endommagées et à se fixer à l'ADN en s'intercalant entre les bases, de telle façon que les cellules mortes deviennent fluorescentes et peuvent être détectées par cytométrie en flux (*2.7.24*). Les cellules non viables, positives au marquage, sont évaluées et discriminées tandis que les cellules viables demeurent non marquées. Cette analyse est généralement effectuée avec de la 7-aminoactinomycine D (7-AAD) ou de l'iodure de propidium (IP), mais d'autres marqueurs appropriés peuvent également être utilisés.

*Marqueur.* La 7-AAD et l'IP sont proposés comme exemples de molécules auxquelles la membrane est imperméable et qui peuvent être utilisées comme marqueurs de la viabilité.

La 7-AAD est un analogue de l'actinomycine D qui contient une fonction amine substituée sur la position 7 du chromophore. Elle s'intercale entre les bases cytosine et guanine de l'ADN. Les propriétés spectrales de la 7-AAD rendent cette molécule particulièrement appropriée pour une analyse par cytométrie. L'absorption maximale du complexe 7-AAD/ADN se situe dans la région spectrale verte et est donc appropriée pour un cytomètre équipé d'un laser argon (longueur d'onde d'excitation de 488 nm). L'émission de fluorescence rouge foncé du marqueur de viabilité 7-AAD (635 nm à 675 nm) facilite l'utilisation de la sonde en combinaison avec des anticorps conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (ITCF) ou à la phycoérythrine (PE) car, par rapport à l'IP, le complexe 7-AAD/ADN présente une superposition minimale avec l'ITCF et la PE.

L'IP se lie à l'ADN double brin en s'intercalant entre les bases avec peu ou pas de préférence entre les séquences et avec une stoechiométrie de 1 marqueur toutes les 4-5 paires de bases d'ADN. Une fois le marqueur fixé aux acides nucléiques, sa fluorescence est multipliée par un facteur 20 à 30, le maximum d'excitation de la fluorescence se déplace d'environ 30-40 nm vers le rouge et le maximum d'émission de fluorescence (615 nm) se déplace d'environ 15 nm vers le bleu. Bien que son absorptivité soit assez basse, l'IP présente un déplacement de Stokes suffisamment important pour permettre la détection simultanée des acides nucléiques et des anticorps marqués à la fluorescéine, sous réserve que des filtres optiques appropriés soient utilisés.

*Conditions de conservation de la solution de marquage des acides nucléiques* : 5 ± 3 °C.

*Préparation de l'essai et analyse.* Dans le cas de cellules hématopoïétiques, le marqueur peut être ajouté après marquage CD45 pour obtenir une meilleure séparation entre les cellules et les débris ou plaquettes grâce à une stratégie de fenêtrage basée sur la diffusion latérale des cellules CD45 positives (SS/CD45+). Les conditions d'incubation de la suspension cellulaire avec le marqueur ont été préalablement validées.

L'incubation est effectuée à température ambiante à l'abri de la lumière. Si nécessaire, la lyse des érythrocytes est effectuée en utilisant, par exemple, du chlorure d'ammonium. Sinon, ajoutez seulement un tampon.

Les pourcentages de cellules viables sont donnés directement par le cytomètre en flux et déduits de l'analyse des cellules positives (cellules mortes) dans le cytogramme SS/7-AAD ou SS/PI (histogrammes biparamétriques).

Des témoins positifs peuvent être constitués de cellules stabilisées (cellules mortes) mélangées selon une valeur cible à des cellules viables fraîches.

**Imagerie numérique des cellules colorées**. L'imagerie numérique permet d'automatiser les méthodes de coloration d'exclusion. La suspension cellulaire et la solution de colorant de viabilité sont directement mélangées par une machine. Le système, qui permet l'aspiration de l'échantillon, la manipulation du réactif, et le nettoyage ultérieur des instruments, est complètement automatisé. Une fois la suspension cellulaire aspirée et mélangée à la solution de colorant, elle est envoyée dans une chambre d'écoulement pour imagerie. La suspension cellulaire colorée est aspirée à travers une chambre dans laquelle une lumière stroboscopique permet à une caméra de photographier les cellules circulantes. Les images sont numérisées et le nombre de cellules mortes ou vivantes est déterminé par le logiciel.

**07/2008:20730**
**corrigé 7.0**

## 2.7.30. DOSAGE DE LA PROTÉINE C HUMAINE

### 1. DOSAGE CHROMOGÈNE

La protéine C humaine est une protéine plasmatique dépendante de la vitamine K qui, transformée en protéine C activée (PCA), peut inhiber la coagulation sanguine par clivage protéolytique des facteurs Va et VIIIa. L'activité de la protéine C humaine est estimée par une méthode en 2 étapes : une 1[re] étape d'activation de la protéine C humaine contenue dans la préparation, par un activateur spécifique provenant d'un venin de serpent, et une 2[de] étape de clivage, par la PCA, d'un substrat chromogène spécifique qui libère un chromophore pouvant être quantifié par spectrophotométrie.

**Etape 1**

protéine C humaine —(activateur de la protéine C humaine)→ PCA

**Etape 2**

substrat chromogène —(PCA)→ peptide + chromophore

L'activité de la protéine C humaine est estimée par comparaison de la capacité respective de la préparation à examiner et d'un étalon de référence de protéine C humaine, étalonnée en Unités Internationales, à cliver un substrat chromogène.
L'Unité Internationale correspond à l'activité d'une quantité définie de l'étalon international de protéine C humaine.
La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

Les réactifs requis sont disponibles dans le commerce séparément ou sous forme de kits. Il existe des méthodes au point final et des méthodes cinétiques. Les procédures et réactifs peuvent varier selon les kits et il convient de se conformer aux instructions du fabricant. Les grandes lignes de la méthode sont décrites dans l'exemple suivant d'une méthode au point final sur plaque de microtitrage.

RÉACTIFS

*Tampon de dilution pH 8,4.* Dissolvez 6,055 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* et 16,84 g de *chlorure de césium R* dans de l'*eau R*. Ajustez le pH si nécessaire, puis complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

*Activateur de la protéine C humaine.* Protéine isolée à partir du venin de la vipère *Agkistrodon contortrix contortrix*, qui active spécifiquement la protéine C humaine. Reconstituez et conservez suivant les instructions du fabricant. Avant emploi dans le dosage, diluez avec de l'*eau R* de façon à obtenir une concentration de 0,25 U/mL.

*Substrat chromogène de la protéine C activée.* Substrat chromogène spécifique de la PCA, par exemple chlorhydrate de L-pyroglutamyl-L-prolyl-L-arginyl-*p*-nitroaniline (pyroGlu-Pro-Arg-pNA.HCl). Reconstituez avec de l'*eau R* de façon à obtenir une concentration de 4,5 mmol/L. Avant emploi dans le dosage, diluez à nouveau avec le tampon de dilution pH 8,4 de façon à obtenir une concentration de 1,1 mmol/L.

MODE OPÉRATOIRE

Reconstituez ou décongelez la préparation à examiner suivant les instructions du fabricant. Diluez avec de l'*eau R* pour préparer au moins 3 dilutions séparées de chaque préparation sur un domaine de concentration de 0,050-0,200 UI/mL, de préférence en double.

**Etape 1**. Mélangez 0,025 mL de chaque dilution et 0,050 mL d'activateur de la protéine C humaine, tous deux préalablement chauffés à 37 °C, puis placez à 37 °C pendant exactement 10 min. Pour chaque dilution, préparez un blanc de la même façon en utilisant l'*eau R* à la place de l'activateur de la protéine C humaine.

**Etape 2**. A chaque mélange, ajoutez 0,150 mL de substrat chromogène dilué, préalablement chauffé à 37 °C, puis placez à 37 °C pendant exactement 10 min. Si nécessaire, ajustez le temps d'incubation pour que la courbe de libération du chromophore en fonction du temps soit linéaire. Arrêtez la réaction en ajoutant 0,050 mL d'une solution d'*acide acétique glacial R* à 50 pour cent *V/V*.

Le clivage du substrat chromogène par la PCA entraîne la libération du chromophore pNA en quantité proportionnelle à la concentration de protéine C humaine dans la préparation. Mesurez la densité optique à 405 nm. Soustrayez la densité optique obtenue avec le blanc de la densité optique obtenue avec l'échantillon à examiner. Vérifiez la validité du dosage et calculez l'activité de la préparation à examiner par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*).

### 2. DOSAGE PAR COAGULATION

L'activité de la protéine C humaine est déterminée après clivage en PCA par un activateur spécifique extrait du venin de la vipère *Agkistrodon contortrix contortrix*. La PCA résultante inactive les facteurs Va et VIIIa, prolongeant ainsi le temps de thromboplastine partielle activée (APTT) dans un système où sont présents tous les facteurs de coagulation, en quantité constante et en excès, sauf la protéine C humaine qui provient de la préparation examinée. L'allongement du temps de coagulation est proportionnel à la concentration de protéine C humaine dans la préparation.

L'activité de la protéine C humaine est estimée par comparaison de la capacité respective de la préparation à examiner et d'un étalon de référence de protéine C humaine, étalonnée en Unités Internationales, à allonger le temps de coagulation.
L'Unité Internationale correspond à l'activité d'une quantité

définie de l'étalon international de protéine C humaine.
La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

Les réactifs requis sont disponibles dans le commerce séparément ou sous forme de kits. Les procédures et réactifs peuvent varier selon les kits et il convient de se conformer aux instructions du fabricant. Les grandes lignes de la méthode sont décrites dans l'exemple suivant.

RÉACTIFS

*Tampon de dilution pH 7,4.* Tampon isotonique non chélatant.

*Plasma déficient en protéine C humaine.* Plasma humain citraté ne contenant pas de protéine C humaine à teneur mesurable. Reconstituez et conservez suivant les instructions du fabricant.

*Activateur de la protéine C humaine.* Protéine isolée à partir du venin de la vipère *Agkistrodon contortrix contortrix*, qui active spécifiquement la protéine C humaine. Reconstituez et conservez suivant les instructions du fabricant.

*Activateur de coagulation.* Un réactif APTT approprié contenant des phospholipides et un activateur de contact peut être utilisé. Il peut être combiné avec l'activateur de protéine C humaine.

MODE OPÉRATOIRE

Reconstituez ou décongelez la préparation à examiner suivant les instructions du fabricant. Diluez avec le tampon de dilution pH 7,4 pour préparer au moins 3 dilutions séparées de chaque préparation sur un domaine de concentration de 0,010-0,150 UI/mL, de préférence en double.

Mélangez 1 volume de chaque dilution avec 1 volume de plasma déficient en protéine C humaine et 1 volume d'activateur de la protéine C humaine (combiné avec le réactif APTT dans les cas appropriés), tous trois préalablement chauffés à 37 °C. Ajoutez 1 volume de *solution de chlorure de calcium 0,025 M R* préalablement chauffé à 37 °C, et enregistrez le temps de coagulation.

Le temps de coagulation est proportionnel à la concentration de protéine C humaine dans les dilutions examinées. Vérifiez la validité du dosage et calculez l'activité de la préparation à examiner par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*).

**07/2008:20731**

## 2.7.31. DOSAGE DE LA PROTÉINE S HUMAINE

La protéine S humaine est une protéine plasmatique dépendante de la vitamine K qui agit comme cofacteur de la protéine C activée (PCA) dans sa fonction anticoagulante. L'activité de la protéine S humaine peut être déterminée par l'essai de coagulation décrit ci-après, qui repose sur la capacité de la protéine S humaine à accélérer l'inactivation du facteur Va par la PCA. En pratique, ce dosage est réalisé par addition de la protéine S humaine à un mélange réactif comprenant de la PCA, du facteur Va et du plasma déficient en protéine S humaine. L'allongement du temps de coagulation est proportionnel à la concentration de protéine S humaine dans la préparation. Les méthodes où la PCA est directement ajoutée comme réactif sont préférables aux méthodes où la PCA est générée en cours de dosage par addition d'un activateur spécifique de la protéine C humaine, extrait du venin de serpent. L'activation de la coagulation est amorcée par addition d'un agent activateur tel que la thromboplastine ou le facteur X activé, ainsi que de phospholipides et de chlorure de calcium. Au cours de l'essai, le facteur Va est généré à partir du facteur V dans le plasma déficient en protéine S humaine suite à l'activation de la coagulation. La procédure de dosage doit apporter l'assurance que la protéine S humaine constitue le seul facteur limitant.

L'activité de la protéine S humaine est estimée par comparaison de la capacité respective de la préparation à examiner et d'un étalon de référence de protéine S humaine, étalonnée en Unités Internationales, à allonger le temps de coagulation.
L'Unité Internationale correspond à l'activité d'une quantité définie de l'étalon international de protéine S humaine.
La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

Les réactifs requis sont disponibles dans le commerce séparément ou sous forme de kits. Les procédures et réactifs peuvent varier selon les kits et il convient de se conformer aux instructions du fabricant. Les grandes lignes de la méthode sont décrites dans l'exemple suivant.

RÉACTIFS

*Tampon de dilution pH 7,4.* Tampon isotonique non chélatant, préparé comme suit : dissolvez 6,08 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* et 8,77 g de *chlorure de sodium R* dans de l'*eau R*. Ajustez le pH si nécessaire. Ajoutez 10 g d'*albumine bovine R* ou d'*albumine humaine R*. Complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

*Plasma déficient en protéine S humaine.* Plasma humain citraté ne contenant pas de protéine S humaine à teneur mesurable et, de préférence, également exempt de protéine de liaison à C4b.

*Activateur de coagulation.* Ce réactif sert à amorcer la coagulation dans le plasma déficient en protéine S humaine et fournit ainsi une source de facteur V activé. Il peut s'agir de facteur tissulaire, de facteur X activé ou d'un agent capable d'activer directement le facteur X, qui peut être isolé à partir du venin de la vipère de Russell (*Vipera russelli*). Le réactif contient aussi de la PCA, des phospholipides et du *chlorure de calcium R*. Il est également possible d'ajouter le chlorure de calcium séparément après un temps d'activation défini.

MODE OPÉRATOIRE

Reconstituez ou décongelez la préparation à examiner suivant les instructions du fabricant. Diluez avec le tampon de dilution pH 7,4 pour préparer au moins 3 dilutions séparées de chaque préparation sur un domaine de concentration de 0,020-0,100 UI/mL, de préférence en double.

Mélangez 1 volume de chaque dilution et 1 volume de plasma déficient en protéine S humaine, tous deux préalablement chauffés à 37 °C. Ajoutez 2 volumes d'activateur de coagulation préalablement chauffé à 37 °C, puis enregistrez le temps de coagulation.

D'autres procédures utilisent un activateur de coagulation sans chlorure de calcium, et comportent un temps d'activation précisément mesuré préalablement à l'addition du chlorure de calcium et à la mesure du temps de coagulation.

Le temps de coagulation est proportionnel à la concentration de protéine S humaine dans les dilutions examinées. Vérifiez la validité du dosage et calculez l'activité de la préparation à examiner par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*).

**07/2008:20732**

## 2.7.32. DOSAGE DE L'INHIBITEUR D'α-1-PROTÉINASE HUMAIN

La teneur en inhibiteur d'α-1-protéinase humain (également appelé α-1-antitrypsine ou α-1-antiprotéinase) est déterminée par comparaison de la capacité respective de la préparation à examiner et d'un étalon de référence d'inhibiteur d'α-1-protéinase humain, étalonné en milligrammes d'inhibiteur d'α-1-protéinase actif (fonctionnel), à inactiver une sérine protéase, l'élastase (élastase pancréatique porcine ou élastase neutrophile humaine). Des quantités variables de la préparation à examiner sont mélangées à une quantité donnée d'élastase ;

l'activité élastase résiduelle est ensuite déterminée au moyen d'un substrat chromogène approprié. La méthode décrite ci-après est donnée à titre d'exemple.

RÉACTIFS

*Solution tampon tris-albumine.* Dissolvez 24,23 g de *trométamol R* dans de l'*eau R*, ajustez à pH 8,0 ± 0,3 avec de l'*acide chlorhydrique R1* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*. A 100 mL de cette solution, ajoutez 0,5 mL d'une solution d'*albumine humaine R* à 20 pour cent ou d'une solution d'*albumine bovine R* à 20 pour cent.

Préparez la solution tampon contenant l'albumine humaine ou bovine le jour de son utilisation ou traitez-la par filtration stérile (0,2 μm) ; la solution filtrée peut être conservée pendant 2 semaines à 2-8 °C.

MODE OPÉRATOIRE

Préparez 2 séries de 4 ou 5 dilutions de la préparation à examiner et de l'étalon de référence dans la solution tampon tris-albumine, sur un intervalle de concentration en inhibiteur d'α-1-protéinase humain approprié.

Déposez 50 μL des dilutions de la solution témoin dans les puits d'une plaque de microtitrage et ajoutez dans chaque puits 150 μL d'une solution d'élastase pancréatique porcine ajustée à une concentration appropriée avec la solution tampon tris-albumine. Incubez à température ambiante pendant un temps défini, compris entre 3 min et 10 min. L'activité des solutions des différentes élastases pancréatiques porcines étant variable, ajustez la concentration en élastase à l'aide de blancs contenant l'élastase mais non l'inhibiteur d'α-1-protéinase humain, de façon à obtenir une variation d'absorbance à 405 nm appropriée dans les conditions effectives du dosage.

Ajoutez dans chaque puits 100 μL d'une solution du substrat chromogène, *N*-succinyl-tri-L-alanyl 4-p-nitroanilide (Suc-Ala-Ala-Ala-pNA), reconstitué avec du *diméthylsulfoxyde R* de façon à donner une solution à 4,5 mg/mL, puis ajusté avec la solution tampon tris-albumine à une concentration de 0,45 mg/mL. Procédez immédiatement à la mesure de la variation d'absorbance (*2.2.25*) 405 nm au moyen d'un lecteur de plaques de microtitrage, pendant au moins 5 min. Calculez la vitesse de variation de l'absorbance (ΔA/min). Il est également possible de procéder à une mesure en point final en stoppant la réaction avec de l'acide acétique avant de mesurer l'absorbance à 405 nm. Si le dosage est effectué dans des tubes à essai, en suivant la variation d'absorbance à 405 nm au moyen d'un spectrophotomètre, il convient d'adapter en conséquence les volumes de solutions utilisés.

La vitesse de variation de l'absorbance (ΔA/min) est inversement proportionnelle à l'activité de l'inhibiteur d'α-1-protéinase humain.

Vérifiez la validité du dosage et calculez l'activité de la préparation à examiner par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*).

# 2.8. MÉTHODES DE PHARMACOGNOSIE

# 2.8. MÉTHODES DE PHARMACOGNOSIE

**01/2008:20801**

## 2.8.1. CENDRES INSOLUBLES DANS L'ACIDE CHLORHYDRIQUE

Les cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique sont constituées par le résidu obtenu après extraction des cendres sulfuriques ou des cendres totales par l'acide chlorhydrique et rapporté à 100 g de drogue.

Dans le creuset, ajoutez au résidu obtenu lors de la détermination des cendres sulfuriques ou totales 15 mL d'*eau R* et 10 mL d'*acide chlorhydrique R*. Recouvrez d'un verre de montre, faites bouillir doucement pendant 10 min et laissez refroidir. Filtrez le résidu sur un filtre sans cendres et lavez à l'*eau R* chaude jusqu'à ce que le filtrat soit neutre. Desséchez, incinérez jusqu'au rouge sombre, laissez refroidir dans un dessiccateur et pesez. Recommencez l'incinération jusqu'à ce que la différence entre 2 pesées consécutives n'excède pas 1 mg.

**01/2008:20802**

## 2.8.2. ÉLÉMENTS ÉTRANGERS

Les drogues végétales devraient être exemptes de moisissures, d'insectes et d'autres contaminations animales.

Les éléments étrangers se composent, en totalité ou en partie, des :

1) *parties étrangères* : tout élément qui provient de la plante-mère mais ne constitue pas la drogue,

2) *matières étrangères* : tout élément qui est étranger à la plante-mère, d'origine végétale ou minérale.

DÉTERMINATION DES ÉLÉMENTS ÉTRANGERS

Pesez 100 g à 500 g de l'échantillon ou la quantité minimale indiquée dans la monographie et répartissez en couche mince. Les éléments étrangers sont décelés par examen à l'oeil nu ou à l'aide d'une loupe (6 ×). Séparez les éléments étrangers, pesez-les et calculez-en le pourcentage.

**01/2008:20803**

## 2.8.3. STOMATES ET INDICE STOMATIQUE

STOMATES

Parmi les types de stomates (voir figure 2.8.3-1) qui se distinguent par la forme et la disposition des cellules qui les entourent, se trouvent :

1) le type *anomocytique* (cellules irrégulières) ; les stomates se trouvent entourés d'un nombre variable de cellules qui ne diffèrent en aucune façon des cellules de l'épiderme en général,

2) le type *anisocytique* (cellules inégales) ; les stomates sont normalement entourés par 3 cellules annexes dont une est nettement plus petite que les autres,

3) le type *diacytique* (cellules transversales) ; les stomates sont accompagnés par 2 cellules annexes dont les parois communes font un angle droit avec les cellules de garde des stomates,

4) le type *paracytique* (cellules parallèles) ; les stomates possèdent de chaque côté une ou plusieurs cellules annexes parallèles à l'axe longitudinal de l'ostiole et des cellules de garde des stomates.

INDICE STOMATIQUE

$$\text{Indice stomatique} = \frac{100 \times \text{S}}{\text{E} + \text{S}}$$

S = nombre de stomates pour une surface de feuille donnée,

E = nombre de cellules épidermiques (trichomes inclus) pour une même surface de feuille.

Pour chaque échantillon de feuilles, calculez la moyenne de 10 déterminations au moins.

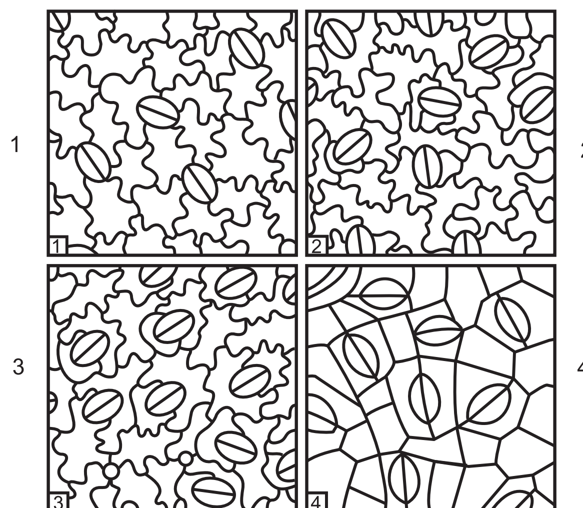



Figure 2.8.3.-1

**01/2008:20804**

## 2.8.4. INDICE DE GONFLEMENT

L'indice de gonflement est le volume en millilitres occupé par 1 gramme de drogue, y compris le mucilage qui y adhère, qui a été mis à gonfler dans un liquide aqueux pendant 4 h.

Dans une éprouvette graduée de 25 mL à bouchon rodé dont la graduation divisée en 0,5 mL occupe une hauteur de 125 ± 5 mm, introduisez 1,0 g de drogue entière ou dans l'état de division prescrit dans la monographie. Sauf indication contraire, humectez la drogue avec 1,0 mL d'*alcool R* et ajoutez 25 mL d'*eau R*. Bouchez l'éprouvette. Agitez énergiquement toutes les 10 min pendant 1 h. Laissez reposer pendant 3 h. 90 min après le début de l'essai, éliminez par rotation autour de l'axe vertical la plus grande partie de liquide retenu au niveau de la drogue et les particules de celle-ci flottant à la surface du liquide. Mesurez le volume occupé par la drogue, y compris le mucilage qui y adhère. Effectuez 3 essais simultanément.

L'indice de gonflement est donné par la moyenne des 3 essais.

**01/2008:20805**

## 2.8.5. EAU DANS LES HUILES ESSENTIELLES

Mélangez 10 gouttes d'huile essentielle avec 1 mL de *sulfure de carbone R*. La solution reste limpide au repos.

**01/2008:20806**

## 2.8.6. ESTERS ÉTRANGERS DANS LES HUILES ESSENTIELLES

Chauffez pendant 2 min au bain-marie, 1 mL d'huile essentielle avec 3,0 mL d'une solution extemporanée d'*hydroxyde de potassium R* à 100 g/L dans l'*alcool R*. Il ne se forme pas de cristaux dans les 30 min qui suivent, même après refroidissement.

01/2008:20807

## 2.8.7. HUILES GRASSES ET HUILES ESSENTIELLES RÉSINIFIÉES DANS LES HUILES ESSENTIELLES

Faites tomber 1 goutte d'huile essentielle sur du papier filtre ; la goutte doit s'évaporer entièrement dans les 24 h sans laisser de tache translucide ou grasse.

01/2008:20808

## 2.8.8. ODEUR ET SAVEUR DES HUILES ESSENTIELLES

Mélangez 3 gouttes d'huile essentielle avec 5 mL d'*alcool à 90 pour cent V/V R* et agitez avec 10 g de *saccharose R* pulvérisé. L'odeur et la saveur sont semblables à celles de la plante ou des parties de la plante à partir de laquelle l'huile essentielle est obtenue.

01/2008:20809

## 2.8.9. RÉSIDU D'ÉVAPORATION DES HUILES ESSENTIELLES

Le résidu d'évaporation d'une huile essentielle est le pourcentage en masse de l'huile essentielle restant après évaporation au bain-marie, dans les conditions précisées ci-après.

*Appareillage* (voir figure 2.8.9.-1). Il est constitué par :

– un bain-marie avec un couvercle ayant des trous de 70 mm de diamètre,
– une capsule d'évaporation de verre thermo-résistant inerte vis-à-vis du contenu,
– un dessiccateur.

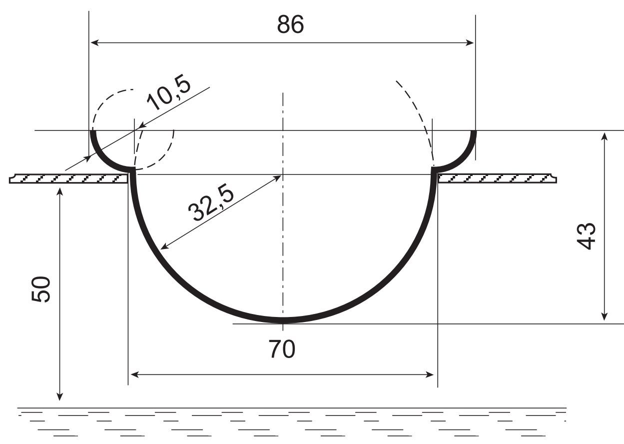



Figure 2.8.9.-1

*Dimensions en millimètres*

*Mode opératoire.* Pesez la capsule d'évaporation après l'avoir chauffée au bain-marie pendant 1 h et laissez refroidir dans un dessiccateur. Introduisez et pesez dans la capsule 5,00 g d'huile essentielle, sauf indication particulière. Evaporez au bain-marie, à l'abri des courants d'air pendant le temps prescrit. Laissez refroidir dans le dessiccateur, puis pesez.

Pendant l'essai, le niveau d'eau dans le bain-marie doit rester constant à 50 mm environ au-dessous du niveau du couvercle.

01/2008:20810

## 2.8.10. SOLUBILITÉ DANS L'ALCOOL DES HUILES ESSENTIELLES

Dans une éprouvette à bouchon rodé de 25 mL à 30 mL, introduisez 1,0 mL de l'huile essentielle à examiner. Placez dans un thermostat à 20 ± 0,2 °C. A l'aide d'une burette de 20 mL au moins, ajoutez par fractions de 0,1 mL, jusqu'à dissolution complète, l'alcool dont le titre est prescrit dans la monographie et continuez à ajouter le solvant par fractions de 0,5 mL jusqu'à 20 mL, en agitant fréquemment et énergiquement. Notez le volume d'alcool utilisé lorsqu'une solution limpide a été obtenue et, si la solution devient trouble ou opalescente avant que le volume ajouté n'atteigne 20 mL, notez le volume utilisé au moment de l'apparition du trouble ou de l'opalescence puis, le cas échéant, au moment de la disparition du trouble ou de l'opalescence.

Si une solution limpide n'est pas obtenue après addition de 20 mL d'alcool de titre indiqué, répétez l'essai avec un alcool de titre plus élevé.

Une huile essentielle est dite « soluble dans $n$ volumes et plus d'alcool d'un titre donné $t$ » si la solution limpide dans $n$ volumes demeure limpide comparée à l'huile essentielle non diluée, après addition progressive de nouvelles quantités d'alcool de même titre, jusqu'à concurrence de 20 volumes d'alcool.

Une huile essentielle est dite « soluble dans $n$ volumes d'alcool d'un titre donné $t$, devenant trouble après dilution » si la solution limpide dans $n$ volumes devient trouble dans $n_1$ volumes ($n_1$ inférieur à 20) et le demeure après addition progressive de nouvelles quantités d'alcool de même titre, jusqu'à concurrence de 20 volumes d'alcool.

Une huile essentielle est dite « soluble dans $n$ volumes d'alcool d'un titre donné $t$, avec un trouble compris entre $n_1$ et $n_2$ volumes » si la solution limpide dans $n$ volumes devient trouble dans $n_1$ volumes ($n_1$ inférieur à 20) et le demeure après addition progressive de nouvelles quantités d'alcool de même titre, jusqu'à concurrence de $n_2$ volumes d'alcool, la solution redevenant limpide ($n_2$ inférieur à 20).

Une huile essentielle est dite « soluble avec opalescence » si la solution alcoolique présente la même teinte bleuâtre qu'une solution opalescente préparée extemporanément comme suit : mélangez 0,5 mL de *solution de nitrate d'argent R2* à 0,05 mL d'*acide nitrique R*. Ajoutez 50 mL d'une solution de *chlorure de sodium R* à 12 mg/L. Mélangez et laissez reposer à l'abri de la lumière pendant 5 min.

01/2008:20811

## 2.8.11. DOSAGE DU 1,8-CINÉOLE DANS LES HUILES ESSENTIELLES

Dans un tube bien sec, pesez 3,00 g d'huile essentielle récemment desséchée sur du *sulfate de sodium anhydre R* et ajoutez 2,10 g de *crésol R* fondu. Placez le tube dans l'appareil pour la détermination du point de solidification (*2.2.18*), laissez cristalliser en refroidissant et en remuant à l'aide de l'agitateur. Lorsque la cristallisation se produit, il y a une légère élévation de température. Notez la valeur maximale $t_1$ obtenue. Faites fondre à nouveau le mélange au bain-marie en chauffant à une température qui ne dépasse pas la valeur $t_1$ de plus de 5 °C. Placez le tube dans l'appareil et maintenez la température à 5 °C au-dessous de la valeur $t_1$. Lorsque la cristallisation commence ou lorsque la température du mélange est descendue à 3 °C au-dessous de la valeur $t_1$, remuez le mélange à l'aide de l'agitateur. Notez la température maximale $t_2$ à laquelle le mélange cristallise. Répétez l'opération jusqu'à ce que les 2 valeurs maximales obtenues pour $t_2$ ne s'écartent pas de plus de 0,2 °C. En cas de surfusion, amorcez la cristallisation en ajoutant un petit cristal du complexe constitué par 3,00 g

de *cinéole R* et 2,10 g de *crésol R* fondu. Si la valeur $t_2$ est inférieure à 27,4 °C, répétez le dosage après avoir ajouté 5,10 g du complexe.

La teneur en cinéole qui correspond à la température maximale observée $t_2$ est indiquée dans le tableau 2.8.11.-1. Si les 5,10 g du complexe ont été ajoutés, calculez la teneur en cinéole d'une prise d'essai exprimée en pourcentage *m/m* à l'aide de l'expression :

$$2\,(A - 50)$$

où $A$ est la valeur indiquée dans le tableau 2.8.11.-1.

La teneur en cinéole correspondant à la température maximale observée $t_2$ est obtenue, si nécessaire, par interpolation.

Tableau 2.8.11.-1

| $t_2$ °C | pour cent *m/m* en cinéole | $t_2$ °C | pour cent *m/m* en cinéole | $t_2$ °C | pour cent *m/m* en cinéole | $t_2$ °C | pour cent *m/m* en cinéole |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 24 | 45,5 | 32 | 56,0 | 40 | 67,0 | 48 | 82,0 |
| 25 | 47,0 | 33 | 57,0 | 41 | 68,5 | 49 | 84,0 |
| 26 | 48,5 | 34 | 58,5 | 42 | 70,0 | 50 | 86,0 |
| 27 | 49,5 | 35 | 60,0 | 43 | 72,5 | 51 | 88,5 |
| 28 | 50,5 | 36 | 61,0 | 44 | 74,0 | 52 | 91,0 |
| 29 | 52,0 | 37 | 62,5 | 45 | 76,0 | 53 | 93,5 |
| 30 | 53,5 | 38 | 63,5 | 46 | 78,0 | 54 | 96,0 |
| 31 | 54,5 | 39 | 65,0 | 47 | 80,0 | 55 | 99,0 |

**01/2008:20812**

# 2.8.12. DÉTERMINATION DES HUILES ESSENTIELLES DANS LES DROGUES VÉGÉTALES

La détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales est effectuée par entraînement à la vapeur d'eau, dans un appareil spécial, dans les conditions précisées ci-après. Le distillat est recueilli dans le tube gradué, en présence de xylène pour fixer l'huile essentielle, tandis que la fraction aqueuse retourne automatiquement dans le ballon générateur de vapeur.

*Appareil.* L'appareil comprend :

(a) un ballon approprié à fond rond, à col court et portant un rodage d'un diamètre intérieur de 29 mm environ à l'extrémité la plus large ;

(b) un appareil de condensation (voir figure 2.8.12.-1) s'adaptant exactement sur le ballon, comprenant diverses parties entièrement soudées en verre de faible dilatation thermique :

– le bouchon (*K'*) est percé et la tubulure (*K*) de 10 mm de diamètre intérieur à la partie la plus large du tube rodé, est munie d'un orifice correspondant de 1 mm de diamètre environ,

– un renflement en forme de toupie (*J*) de 3 mL,

– le tube gradué (*JL*) est divisé en 0,01 mL,

– le renflement (*L*) est en forme de boule et contient 2 mL environ,

– le robinet (*M*) à 3 voies,

– la jonction (*B*) est à un niveau supérieur de 20 mm à celui du sommet de la graduation ;

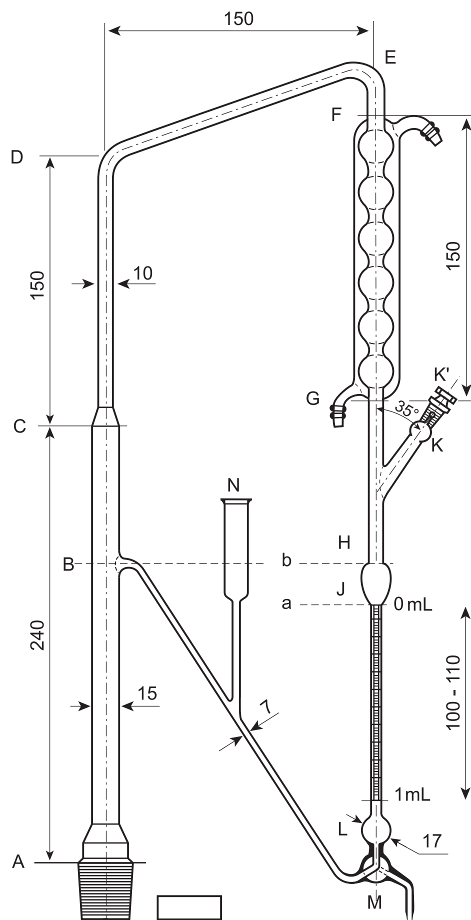



Figure 2.8.12.-1. – *Appareil pour la détermination des huilles essentielles dans les drogues végétales*

*Dimensions en millimètres*

(c) un dispositif de chauffage approprié permettant un réglage précis ;

(d) un support vertical avec un anneau horizontal recouvert d'une matière isolante.

*Mode opératoire.* Utilisez un appareil parfaitement nettoyé. Procédez au dosage suivant la nature de la drogue à examiner. Dans le ballon, introduisez le volume du liquide indiqué pour l'entraînement à la vapeur et quelques fragments de pierre poreuse. Adaptez au ballon l'appareil de condensation. Versez de l'*eau R* par le tube de remplissage (*N*) jusqu'à l'affleurement en (*B*). Enlevez le bouchon (*K'*) et introduisez la quantité prescrite de *xylène R* avec une pipette, en appuyant la pointe au fond de la tubulure (*K*). Replacez le bouchon (*K'*) en vérifiant que les 2 orifices coïncident. Chauffez le liquide du ballon jusqu'à début d'ébullition et distillez à la vitesse de 2-3 mL/min, sauf indication contraire.

Pour déterminer la vitesse de distillation, abaissez le niveau de l'eau au moyen du robinet à 3 voies pendant la distillation, de façon que le ménisque se trouve au trait inférieur (a) (voir figure 2.8.12.-2). Fermez ensuite le robinet et chronométrez le temps nécessaire pour le remplissage du tube jusqu'au trait (b) supérieur. Ouvrez le robinet et continuez la distillation. Modifiez le chauffage pour régler la vitesse de distillation. Distillez pendant 30 min. Arrêtez le chauffage et lisez, après 10 min au moins, le volume de xylène dans le tube gradué.

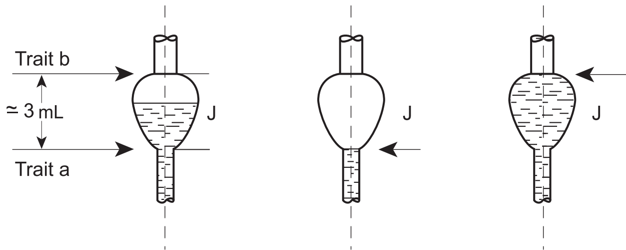



Figure 2.8.12.-2

Dans le ballon, introduisez la quantité de drogue prescrite et procédez à l'entraînement à la vapeur, comme prescrit ci-dessus, pendant la durée et à la vitesse indiquées. Arrêtez le chauffage et lisez après 10 min le volume du liquide recueilli dans le tube gradué. Soustrayez du volume total le volume de xylène déterminé précédemment. La différence représente la quantité d'huile essentielle dans la prise d'essai. Calculez le résultat en millilitres par kilogramme de drogue.

Lorsque l'huile essentielle est destinée à d'autres opérations analytiques, le mélange xylène-huile essentielle exempt d'eau peut être récupéré comme suit : enlevez le bouchon (*K'*) et introduisez 0,1 mL d'une solution de *fluorescéinate de sodium R* à 1 g/L et 0,5 mL d'*eau R*. Abaissez le niveau du mélange xylène-huile essentielle dans la boule (*L*) au moyen du robinet à 3 voies. Laissez reposer pendant 5 min, puis laissez le mélange s'écouler lentement, exactement jusqu'au niveau du robinet (*M*). Ouvrez le robinet dans le sens inverse des aiguilles d'une montre de façon que l'eau puisse s'écouler du tube de communication (*BM*). Rincez ce dernier avec de l'*acétone R*, puis avec un peu de *toluène R* versés par le tube de remplissage (*N*). Tournez ensuite le robinet dans le même sens afin de récupérer le mélange xylène-huile essentielle dans un flacon approprié.

**07/2008:20813**

# 2.8.13. RÉSIDUS DE PESTICIDES

**Définition**. Pour les besoins de la Pharmacopée, est considérée comme pesticide toute substance ou association de substances qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs et les espèces indésirables de plantes et d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la mise sur le marché de drogues végétales. Le terme comprend les substances destinées à être utilisées comme régulateurs de croissance des plantes, comme défoliants, comme agents de dessiccation ainsi que les substances appliquées sur les cultures, soit avant, soit après la récolte pour protéger les produits contre la détérioration durant l'entreposage et le transport. Des résidus de pesticides peuvent être présents et sont contrôlés dans les drogues végétales ainsi que dans les préparations à base de drogues végétales.

**Limites**. Sauf mention contraire dans la monographie, la drogue végétale à examiner satisfait au moins aux limites indiquées dans le tableau 2.8.13.-1. Les limites applicables aux pesticides qui ne figurent pas dans le tableau 2.8.13.-1 et dont il y a lieu de soupçonner la présence pour une raison quelconque, sont établies sur la base des limites (teneurs) référencées par le Règlement (CE) N° 396/2005, annexes et mises à jour successives comprises. Les limites applicables aux pesticides qui ne figurent ni dans le tableau 2.8.13.-1 ni dans les textes de l'Union Européenne sont calculées à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{DJA \times M}{MDD_{HD} \times 100}$$

*DJA* = dose journalière admissible de la FAO/OMS, en milligrammes par kilogramme de masse corporelle,

*M* = masse corporelle en kilogrammes (60 kg),

$MDD_{HD}$ = consommation journalière de la drogue végétale, en kilogrammes.

Les limites en pesticides de ces préparations sont calculées à l'aide des expressions suivantes :

Si RDE ≤ 10 :

$$LMR_{HD} \times RDE$$

Si RDE > 10 :

$$\frac{DJA \times M}{MDD_{HP} \times 100}$$

$LMR_{HD}$ = limite maximale de résidus de pesticides dans la drogue végétale, comme indiqué dans le tableau 2.8.13.-1 ou dans les textes de l'Union Européenne ou calculé en utilisant l'expression mentionnée ci-dessus,

*RDE* = rapport drogue/extrait c'est-à-dire le rapport de la quantité de drogue végétale utilisée pour la fabrication de la préparation à base de drogues végétales et la quantité de préparation à base de drogues végétales obtenue,

$MDD_{HP}$ = posologie journalière de la préparation à base de drogues végétales, en kilogrammes.

L'Autorité compétente peut accorder une dispense totale ou partielle de l'essai lorsque l'historique complet (nature et quantité des pesticides employés, date de chaque traitement pendant la culture et après la récolte) du traitement du lot est connu et peut être contrôlé de façon précise conformément aux bonnes pratiques agricoles et de récolte (BPAC).

Tableau 2.8.13.-1

| Substance | Limite (mg/kg) |
|---|---|
| Acéphate | 0,1 |
| Alachlor | 0,05 |
| Aldrine et dieldrine (somme) | 0,05 |
| Azinphos-éthyle | 0,1 |
| Azinphos-méthyle | 1 |
| Bromure, inorganique (calculé en ion bromure) | 50 |
| Bromophos-éthyle | 0,05 |
| Bromophos-méthyle | 0,05 |
| Bromopropylate | 3 |
| Chlordane (somme de *cis*-, *trans* - et oxychlordane) | 0,05 |
| Chlorfenvinphos | 0,5 |
| Chlorpyriphos-éthyle | 0,2 |
| Chlorpyriphos-méthyle | 0,1 |
| Chlorthal-diméthyle | 0,01 |
| Cyfluthrine (somme) | 0,1 |
| λ-Cyhalothrine | 1 |
| Cyperméthrine (et isomères) | 1 |

| Substance | Limite (mg/kg) |
|---|---|
| DDT (somme de *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *o,p'*-TDE et *p,p'*-TDE) | 1 |
| Deltaméthrine | 0,5 |
| Diazinon | 0,5 |
| Dichlofluanide | 0,1 |
| Dichlorvos | 1 |
| Dicofol | 0,5 |
| Diméthoate et ométhoate (somme) | 0,1 |
| Dithiocarbamates (exprimés en $CS_2$) | 2 |
| Endosulfan (somme des isomères et sulfate d'endosulfan) | 3 |
| Endrine | 0,05 |
| Ethion | 2 |
| Etrimphos | 0,05 |
| Fenchlorphos (somme de fenchlorphos et fenchlorphos-oxon) | 0,1 |
| Fenitrothion | 0,5 |
| Fenpropathrine | 0,03 |
| Fensulfothion (somme de fensulfothion, fensulfothion-oxon, fensulfothion-oxon-sulfone et fensulfothion-sulfone) | 0,05 |
| Fenthion (somme de fenthion, fenthion-oxon, fenthion-oxon-sulfone, fenthion-oxon-sulfoxyde, fenthion-sulfone et fenthion-sulfoxyde) | 0,05 |
| Fenvalérate | 1.5 |
| Flucytrinate | 0,05 |
| τ-Fluvalinate | 0,05 |
| Fonophos | 0,05 |
| Heptachlore (somme d'heptachlore, *cis*-heptachlore-époxyde et *trans*-heptachlore-époxyde) | 0,05 |
| Hexachlorobenzène | 0,1 |
| Hexachlorocyclohexane (somme des isomères α-, β-, δ- et ϵ) | 0,3 |
| Lindane (γ-hexachlorocyclohexane) | 0,6 |
| Malathion et malaoxon (somme) | 1 |
| Mécarbam | 0,05 |
| Méthacriphos | 0,05 |
| Méthamidophos | 0,05 |
| Méthidathion | 0,2 |
| Méthoxychlore | 0,05 |
| Mirex | 0,01 |
| Monocrotophos | 0,1 |
| Parathion-éthyle et paraoxon-éthyle (somme) | 0,5 |
| Parathion-méthyle et paraoxon-méthyle (somme) | 0,2 |
| Pendiméthaline | 0,1 |
| Pentachloranisol | 0,01 |
| Perméthrine (somme des isomères) | 1 |
| Phosalone | 0,1 |
| Phosmet | 0,05 |
| Pipéronyl butoxyde | 3 |
| Pirimiphos-éthyle | 0,05 |
| Pirimiphos-méthyle (somme de pirimiphos-méthyle et *N*-déséthyl-pirimiphos-méthyle) | 4 |
| Procymidone | 0,1 |
| Profénophos | 0,1 |
| Prothiophos | 0,05 |
| Pyrètres (somme de cinérine I, cinérine II, jasmoline I, jasmoline II, pyréthrine I et pyréthrine II) | 3 |
| Quinalphos | 0,05 |
| Quintozène (somme de quintozène, pentachloraniline et pentachlorophénysulfure de méthyle) | 1 |
| S-421 | 0,02 |
| Tecnazène | 0,05 |
| Tétradifon | 0,3 |
| Vinclozoline | 0,4 |

**Echantillonage**. L'échantillonage est effectué selon le chapitre général *2.8.20. Echantillonage et préparation d'échantillons de drogues végétales.*

**Analyse qualitative et quantitative des résidus de pesticides**. Les procédés analytiques utilisés doivent être validés (par exemple conformément au document n° SANCO/10232/2006). Ils satisfont notamment aux critères suivants :

- la méthode choisie, en particulier les étapes de purification, convient à la combinaison résidus de pesticides/substance à examiner et aucun effet dû à des co-extraits n'interfère significativement avec les résultats,
- la présence naturelle de certains constituants est prise en considération pour l'interprétation des résultats (cas, par exemple, du disulfure dans les crucifères),
- la concentration des solutions à examiner et des solutions témoins, ainsi que les réglages de l'appareillage, sont choisis de telle sorte que les réponses utilisées pour la quantification des résidus de pesticides soient comprises dans l'intervalle de mesure du détecteur. Les solutions à examiner contenant des résidus de pesticides à une teneur non comprise dans l'intervalle de mesure peuvent être diluées dans les limites de l'intervalle d'étalonnage, à condition que la concentration de la matrice dans la solution soit ajustée lorsqu'il est nécessaire que les solutions d'étalonnage soient adaptées à la matrice,
- le recouvrement est de 70 pour cent à 110 pour cent pour chaque pesticide,
- répétabilité de la méthode : ETR pas supérieur aux valeurs indiquées dans le tableau 2.8.13.-2,
- reproductibilité de la méthode : ETR pas supérieur aux valeurs indiquées dans le tableau 2.8.13.-2.

Tableau 2.8.13.-2

| Intervalle de concentration de l'analyte (mg/kg) | Répétabilité (ETR) (pour cent) | Reproductibilité (ETR) (pour cent) |
|---|---|---|
| 0,001 - 0,01 | 30 | 60 |
| > 0,01 - 0,1 | 20 | 40 |
| > 0,1 - 1 | 15 | 30 |
| > 1 | 10 | 20 |

**01/2008:20814**

## 2.8.14. DÉTERMINATION DES TANINS DANS LES DROGUES VÉGÉTALES

*Effectuez toutes les opérations d'extraction et de dilution à l'abri de la lumière.*

Dans le cas d'une drogue végétale ou d'un extrait sec, introduisez les quantités prescrites de drogue pulvérisée (180) (*2.9.12*) ou d'extrait dans un ballon de 250 mL et ajoutez 150 mL d'*eau R*. Chauffez au bain-marie pendant 30 min. Refroidissez à l'eau courante et transvasez quantitativement dans une fiole jaugée de 250 mL. Rincez le ballon et introduisez

les eaux de rinçage dans la fiole jaugée, puis complétez à 250,0 mL avec de l'*eau R*. Laissez décanter, puis filtrez le liquide sur un papier filtre d'un diamètre de 125 mm. Eliminez les 50 premiers millilitres du filtrat.

Dans le cas d'un extrait fluide ou d'une teinture, complétez les quantités prescrites d'extrait fluide ou de teinture à 250,0 mL avec de l'*eau R*. Filtrez le mélange sur un papier filtre d'un diamètre de 125 mm. Eliminez les 50 premiers millilitres du filtrat.

*Polyphénols totaux*. Prélevez 5,0 mL de filtrat et complétez à 25,0 mL avec de l'*eau R*. Prélevez 2,0 mL de cette solution, ajoutez 1,0 mL de *réactif phosphomolybdotungstique R* et 10,0 mL d'*eau R*, mélangez et complétez à 25,0 mL avec une solution de *carbonate de sodium R* à 290 g/L. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 760 nm ($A_1$) après 30 min en utilisant l'*eau R* comme liquide de compensation.

*Polyphénols non adsorbés sur la poudre de peau*. A 10,0 mL du filtrat, ajoutez 0,10 g de *poudre de peau SCR* et agitez fortement pendant 60 min. Filtrez. Prélevez 5,0 mL du filtrat et complétez à 25,0 mL avec de l'*eau R*. Prélevez 2,0 mL de solution, ajoutez 1,0 mL de *réactif phosphomolybdotungstique R* et 10,0 mL d'*eau R*, mélangez et complétez à 25,0 mL avec une solution de *carbonate de sodium R* à 290 g/L. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 760 nm ($A_2$) après 30 min en utilisant l'*eau R* comme liquide de compensation.

*Témoin*. Dissolvez immédiatement avant l'emploi 50,0 mg de *pyrogallol R* dans de l'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Prélevez 5,0 mL de solution et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Prélevez 2,0 mL de solution, ajoutez 1,0 mL de *réactif phosphomolybdotungstique R* et 10,0 mL d'*eau R*, mélangez et complétez à 25,0 mL avec une solution de *carbonate de sodium R* à 290 g/L. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 760 nm ($A_3$) après 30 min en utilisant l'*eau R* comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en tanins exprimés en pyrogallol à l'aide de l'expression :

$$\frac{62,5\,(A_1 - A_2)\,m_2}{A_3 \times m_1}$$

$m_1$ = masse de la prise d'essai, en grammes,

$m_2$ = masse de pyrogallol, en grammes.

**01/2008:20815**

## 2.8.15. INDICE D'AMERTUME

L'indice d'amertume d'un composé, d'un liquide ou d'un extrait est l'inverse de la dilution qui peut être qualifiée d'amère. Il est déterminé par comparaison au chlorhydrate de quinine, dont l'indice d'amertume est fixé à 200 000.

*Détermination du facteur de correction*

Il est recommandé de faire effectuer l'essai par un jury composé d'au moins 6 personnes. Il faut se rincer la bouche avec de l'*eau R* avant l'essai.

Pour tenir compte des différences individuelles de perception de l'amertume au sein du jury, il est nécessaire de déterminer un facteur de correction pour chaque personne.

*Solution mère*. Dissolvez 0,100 g de *chlorhydrate de quinine R* dans de l'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*.

*Solutions de référence*. Préparez une série de dilutions en introduisant dans un premier tube 3,6 mL de solution mère, et en augmentant progressivement le volume de 0,2 mL dans les tubes suivants jusqu'à atteindre 5,8 mL dans le dernier tube. Complétez le contenu de chaque tube à 10,0 mL avec de l'*eau R*.

Déterminez comme suit la dilution qui correspond à la plus faible concentration ayant une saveur amère : prenez dans la bouche 10,0 mL de la solution la plus diluée de la série et, pendant 30 s, faites passer la solution d'un côté à l'autre de la bouche, sur le dessus de la langue. Si la solution n'est pas jugée amère, recrachez-la et attendez 1 min, puis rincez-vous la bouche avec de l'*eau R*. Après 10 min, utilisez la solution de concentration immédiatement supérieure.

Calculez le facteur de correction *k* pour chaque membre du jury à l'aide de l'expression :

$$k = \frac{n}{5,00}$$

$n$ = nombre de millilitres de solution mère contenus dans la solution correspondant à la plus faible concentration jugée amère.

Les personnes ne percevant pas de saveur amère avec la solution de référence préparée à partir de 5,8 mL de solution mère sont exclues du jury.

*Préparation de l'échantillon*

Pulvérisez l'échantillon (710) (*2.9.12*) si nécessaire. A 1,0 g d'échantillon, ajoutez 100 mL d'*eau R* bouillante. Chauffez au bain-marie pendant 30 min sous agitation constante. Laissez refroidir et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*. Agitez énergiquement, puis filtrez. Jetez les 2 premiers millilitres de filtrat. Le filtrat restant est étiqueté C-1 et possède un facteur de dilution (FD) de 100.

Si la préparation à examiner est un liquide, prélevez-en 1 mL et complétez à 100 mL avec un solvant approprié. Cette solution est étiquetée C-1.

*Détermination de l'indice d'amertume*

Solutions à examiner :

| | |
|---|---|
| 10,0 mL de C-1 complétés à 100 mL avec de l'*eau R* : C-2 | (FD = 1000) |
| 10,0 mL de C-2 complétés à 100 mL avec de l'*eau R* : C-3 | (FD = 10 000) |
| 20,0 mL de C-3 complétés à 100 mL avec de l'*eau R* : C-3A | (FD = 50 000) |
| 10,0 mL de C-3 complétés à 100 mL avec de l'*eau R* : C-4 | (FD = 100 000) |

En commençant par la dilution C-4 chaque membre du jury détermine la première des dilutions qui présente une saveur amère. Cette solution est étiquetée D. Notez Y le FD de la solution D.

A partir de la solution D, préparez la série de dilutions suivante :

| Solution D (mL) | 1,2 | 1,5 | 2,0 | 3,0 | 6,0 | 8,0 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *eau R* (mL) | 8,8 | 8,5 | 8,0 | 7,0 | 4,0 | 2,0 |

Déterminez le nombre X de millilitres de solution D qui, après dilution à 10,0 mL avec de l'*eau R*, présente encore une saveur amère.

Calculez l'indice d'amertume pour chaque membre du jury à l'aide de l'expression :

$$\frac{\mathrm{Y} \times k}{\mathrm{X} \times 0,1}$$

Calculez l'indice d'amertume de l'échantillon à examiner comme la moyenne des valeurs de chaque membre du jury.

**01/2008:20816**

## 2.8.16. RÉSIDU SEC DES EXTRAITS

Dans une capsule à fond plat d'un diamètre d'environ 50 mm et d'une hauteur d'environ 30 mm, pesez rapidement 2,00 g ou introduisez 2,0 mL d'extrait. Evaporez à siccité au bain-marie et desséchez à l'étuve à 100-105 °C pendant 3 h. Laissez refroidir dans un dessiccateur sur du *pentoxyde de diphosphore R* ou sur du *gel de silice anhydre R*, puis pesez. Exprimez le résultat en pour cent *m/m* ou en grammes par litre.

**01/2008:20817**

## 2.8.17. PERTE À LA DESSICCATION DES EXTRAITS

Dans une capsule à fond plat d'un diamètre d'environ 50 mm et d'une hauteur d'environ 30 mm, pesez rapidement 0,50 g d'extrait sec finement pulvérisé. Desséchez à l'étuve à 100-105 °C pendant 3 h. Laissez refroidir dans un dessiccateur sur du *pentoxyde de diphosphore R* ou sur du *gel de silice anhydre R*, puis pesez. Exprimez le résultat en pour cent *m/m*.

**01/2008:20818**

## 2.8.18. DOSAGE DE L'AFLATOXINE $B_1$ DANS LES DROGUES VÉGÉTALES

*AVERTISSEMENT : les aflatoxines sont hautement toxiques et cancérigènes. Opérez sous hotte d'extraction chaque fois que possible, et prenez des précautions spécifiques (par exemple l'usage de boîtes à gants) pour manipuler les toxines lorsqu'elles sont à l'état sec, car leurs propriétés électrostatiques favorisent alors leur dispersion dans la zone de travail. Des procédures de décontamination des déchets de laboratoire ont été mises au point par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC).*

Les aflatoxines sont des mycotoxines naturelles principalement produites par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*, espèces communes et largement répandues dans la nature, qui contaminent le plus souvent les graines de certaines plantes lorsqu'elles sont soumises à des conditions de stress dues, par exemple, à la sécheresse. Ces moisissures peuvent être présentes dans le sol, les végétaux en décomposition, le fourrage ou des graines subissant un processus de détérioration microbienne ; elles infestent tous les types de substrats organiques dès lors que sont réunies les conditions favorables à leur croissance, c'est-à-dire notamment un degré d'humidité et une température élevés. Il existe dans la nature au moins 13 types d'aflatoxines. La plupart sont reconnus comme hautement toxiques et cancérigènes, et l'aflatoxine B1 est considérée comme la plus toxique. Les drogues végétales susceptibles d'être contaminées par des aflatoxines sont examinées par une méthode validée.

Sauf indication contraire dans la monographie, la teneur en aflatoxine $B_1$ des drogues végétales est au maximum de 2 µg/kg. L'Autorité compétente peut également exiger que la teneur totale en aflatoxines $B_1$, $B_2$, $G_1$ et $G_2$ satisfasse à une limite de 4 µg/kg.

La méthode ci-après est décrite à titre d'exemple de méthode vérifiée comme appropriée pour la racine d'harpagophyton, le gingembre et les sénés. Pour les autres drogues végétales, il est nécessaire de démontrer son applicabilité ou d'utiliser une autre méthode validée.

MODE OPÉRATOIRE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Les aflatoxines se dégradent sous l'effet de la lumière. Effectuez le dosage à l'abri de la lumière du jour en opérant sous lumière tamisée en plaçant sur les fenêtres un film anti-UV, ou sous lumière artificielle en utilisant des rideaux ou volets (l'emploi de tubes fluorescents est acceptable). Protégez les solutions contenant des aflatoxines de la lumière du jour.*

Avant emploi, lavez la verrerie avec une solution d'*acide sulfurique R* à 10 pour cent *V/V*, puis rincez soigneusement à l'*eau distillée R* jusqu'à élimination complète de l'acide.

*Solution à examiner*. Utilisez une colonne d'immunoaffinité contenant des anticorps dirigés contre l'aflatoxine $B_1$, de capacité supérieure ou égale à 100 ng d'aflatoxine $B_1$ et donnant un recouvrement supérieur ou égal à 80 pour cent pour une solution contenant 5 ng d'aflatoxine $B_1$ dans un mélange de 12,5 volumes de *méthanol R* et 87,5 volumes d'*eau R*. Laissez la colonne d'immunoaffinité atteindre la température ambiante. A 5,00 g de drogue pulvérisée (500) (*2.9.12*), ajoutez 100 mL d'un mélange de 30 volumes d'*eau R* et de 70 volumes de *méthanol R*, puis procédez à l'extraction en traitant aux ultrasons pendant 30 min. Filtrez sur un filtre papier plié. Dans une fiole conique de 150 mL, transférez à la pipette 10,0 mL du filtrat limpide, puis ajoutez 70 mL d'*eau R*. Faites passer 40 mL de cette solution dans la colonne d'immunoaffinité, à un débit de 3 mL/min (sans dépasser 5 mL/min). Lavez la colonne avec 2 fois 10 mL d'*eau R*, à un débit ne dépassant pas 5 mL/min, puis séchez en appliquant un vide modéré pendant 5-10 s ou en insufflant de l'air dans la colonne pendant 10 s au moyen d'une seringue. Déposez 0,5 mL de *méthanol R* sur la colonne et laissez le solvant passer par gravité. Recueillez l'éluat dans une fiole jaugée de 5 mL. Attendez 1 min, puis déposez une 2e fois 0,5 mL de *méthanol R*. Attendez 1 min, puis déposez une 3e fois 0,5 mL de *méthanol R*. Veillez à récupérer la plus grande partie du solvant d'élution déposé, en appliquant le vide ou en faisant passer de l'air sous pression. Complétez à 5 mL avec de l'*eau R* et agitez soigneusement. Si la solution est limpide, elle peut être analysée directement. Dans le cas contraire, filtrez-la sur un filtre jetable avant injection ; utilisez un filtre jetable (par exemple un filtre en polytétrafluoroéthylène présentant des pores de 0,45 µm) n'entraînant pas de perte d'aflatoxine par rétention.

*Solution mère primaire d'aflatoxine $B_1$*. Dissolvez de l'*aflatoxine $B_1$ R* dans un mélange de 2 volumes d'*acétonitrile R* et de 98 volumes de *toluène R* de façon à obtenir une solution à 10 µg/mL. Pour déterminer la concentration exacte d'aflatoxine $B_1$ dans cette solution, mesurez-en l'absorbance (*2.2.25*) entre 330 nm et 370 nm dans des cuves de quartz.

Calculez la concentration en masse d'aflatoxine $B_1$, en microgrammes par millilitre, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times M \times 100}{\varepsilon \times l}$$

| | | |
|---|---|---|
| $A$ | = | absorbance au maximum de la courbe d'absorption, |
| $M$ | = | masse molaire de l'aflatoxine $B_1$ (312 g/mol), |
| $\epsilon$ | = | coefficient d'absorption molaire de l'aflatoxine $B_1$ dans le mélange toluène-acétonitrile (1930 $m^2$/mol), |
| $l$ | = | longueur de parcours optique de la cellule (1 cm). |

*Solution mère secondaire d'aflatoxine $B_1$*. Préparez une solution mère secondaire ayant une concentration en aflatoxine $B_1$ de 100 ng/mL en diluant la solution mère primaire avec un mélange de 2 volumes d'*acétonitrile R* et de 98 volumes de *toluène R*. Enveloppez étroitement la fiole dans une feuille d'aluminium et conservez-la à température inférieure à 4 °C. Avant l'emploi, attendez pour ôter la feuille d'aluminium que le contenu de la fiole ait atteint la température ambiante. En cas de stockage prolongé de la solution (par exemple pendant 1 mois), pesez la fiole et notez sa masse avant et après chaque utilisation de la solution.

*Solutions de référence d'aflatoxine $B_1$*. Dans des fioles jaugées de 250 mL, introduisez séparément les volumes de solution mère secondaire indiqués dans le tableau 2.8.18.-1. Balayez avec un courant d'azote à température ambiante le temps juste

nécessaire à l'évaporation du solvant. Ajoutez dans chaque fiole 75 mL de *méthanol R*, puis, après dissolution de l'aflatoxine $B_1$, complétez à 250 mL avec de l'*eau R*.

Tableau 2.8.18.-1. – *Solutions de référence d'aflatoxine $B_1$*

| Solution de référence | Volume de solution mère secondaire (μL) | Concentration finale de la solution de référence (ng/mL) |
|---|---|---|
| 1 | 125 | 0,05 |
| 2 | 250 | 0,1 |
| 3 | 500 | 0,2 |
| 4 | 750 | 0,3 |
| 5 | 1000 | 0,4 |

*Courbe d'étalonnage*. Etablissez une courbe d'étalonnage à l'aide des solutions de référence 1 à 5 d'aflatoxine $B_1$, qui couvrent un intervalle de teneur en aflatoxine $B_1$ de 1-8 μg/kg dans la drogue végétale. Vérifiez la linéarité du tracé. Si la teneur en aflatoxine $B_1$ de l'échantillon à examiner se situe hors de l'intervalle d'étalonnage, diluez la solution à examiner jusqu'à une concentration d'aflatoxine compatible avec la courbe d'étalonnage établie.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,

– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 μm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* (dérivatisation post-colonne par réaction photochimique ou par du bromure de pyridinium) : *acétonitrile R, méthanol R, eau R* (2:3:6 *V/V/V*),

– *phase mobile B* (dérivatisation post-colonne par du brome obtenu par voie électrochimique) : ajoutez 0,12 g de *bromure de potassium R* et 350 μL d'*acide nitrique dilué R1* par litre de phase mobile A.

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : détecteur fluorimétrique, avec filtre d'excitation à 360 nm et filtre d'émission à seuil de coupure de 420 nm, ou équivalent. Pour les détecteurs réglables, les réglages recommandés sont de 365 nm (longueur d'onde d'excitation) et 435 nm (longueur d'onde d'émission).

*Injection* : 500 μL.

*Dérivatisation post-colonne par le bromhydrate de perbromure de pyridinium (PBPB)* :

– pompe exempte de pulsations,

– mélangeur en T à volume mort nul,

– tube de réaction en polytétrafluoroéthylène, $l$ = 0,45 m, Ø = 0,5 mm,

– phase mobile A,

– réactif de dérivatisation post-colonne : dissolvez 50 mg de *bromhydrate de perbromure de pyridinium R* dans 1000 mL d'*eau R* (à conserver à l'abri de la lumière et à utiliser dans les 4 jours),

– débit du réactif de dérivatisation : 0,4 mL/min.

*Dérivatisation post-colonne en réacteur photochimique (PHRED)* :

– unité d'irradiation comprenant une ampoule UV 254 nm au mercure basse pression d'au minimum 8 W,

– plaque support polie,

– bobine de réaction : tube en polytétrafluoroéthylène formant un maillage étroit autour de l'ampoule UV, $l$ = 25 m, Ø = 0,25 mm, volume mort nominal 1,25 mL,

– temps d'exposition : 2 min,

– phase mobile A.

*Dérivatisation post-colonne par du brome généré par voie électrochimique (KOBRA)* :

– cellule KOBRA : cellule électrochimique générant du brome actif capable d'assurer la dérivatisation des aflatoxines pour permettre une meilleure détection fluorimétrique ; cette cellule est disponible dans le commerce auprès de différents fournisseurs,

– générateur de courant continu en série avec la cellule KOBRA, fournissant un courant constant d'environ 100 μA,

– tube de réaction en polytétrafluoroéthylène, $l$ = 0,12 m, Ø = 0,25 mm,

– phase mobile B.

*Ordre d'élution* : aflatoxine $G_2$, aflatoxine $G_1$, aflatoxine $B_2$, aflatoxine $B_1$.

*Calcul* : calculez l'équation $y = ax + b$ de la droite d'étalonnage, $x$ étant la concentration d'aflatoxine $B_1$ (ng/mL) et $y$ le signal $S$ obtenu. La concentration $C$ d'aflatoxine $B_1$ dans une solution est égale à $\frac{S-b}{a}$.

Calculez la teneur en aflatoxine $B_1$ de la drogue végétale, en nanogrammes par gramme, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{V_1 \times V_2 \times C}{m \times V_i}$$

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes,

$V_1$ = volume de solvant utilisé pour l'extraction, en millilitres,

$V_i$ = partie aliquote soumise à la purification par immunoaffinité, en millilitres,

$V_2$ = volume final de solution obtenu après passage dans la colonne d'immunoaffinité et dilution, en millilitres,

$C$ = valeur mesurée de la concentration d'aflatoxine $B_1$ dans la solution à examiner, en nanogrammes par millilitre.

La présence d'aflatoxine $B_1$ peut être confirmée par enregistrement du chromatogramme sans dérivatisation post-colonne ; il s'ensuit une importante baisse (plus de 10 fois) de la réponse due à l'aflatoxine $B_1$.

**01/2008:20820**

## 2.8.20. ÉCHANTILLONNAGE ET PRÉPARATION D'ÉCHANTILLONS DE DROGUES VÉGÉTALES

Pour limiter l'effet de l'échantillonnage sur les résultats d'analyse qualitative et quantitative, il est nécessaire de faire en sorte que la composition de l'échantillon soit représentative de celle du lot examiné. Les procédures décrites ci-après constituent les exigences minimales applicables à cet effet, pour les drogues végétales. *NOTE : d'autres procédures peuvent être utilisées si l'on peut démontrer qu'elles permettent d'obtenir des échantillons représentatifs du lot.*

Tableau 2.8.20.-1. – *Déroulement de la procédure d'échantillonnage mise en oeuvre pour obtenir l'échantillon en vrac*

| **Masse de drogue végétale par récipient (kg)** | **0,5** | | | **1** | | | **5** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Masse totale de drogue végétale dans le lot (kg)** | **Nombre de récipients par lot** | **Nombre de récipients à échantillonner** | **Masse totale des échantillons (g)** | **Nombre de récipients par lot** | **Nombre de récipients à échantillonner** | **Masse totale des échantillons (g)** | **Nombre de récipients par lot** | **Nombre de récipients à échantillonner** | **Masse totale des échantillons (g)** |
| 0,5 | 1 | 1 | 125 | – | – | – | – | – | – |
| 1 | 2 | 2 | 125 | 1 | 1 | 125 | – | – | – |
| 5 | 10 | 5 | 125 | 5 | 4 | 125 | 1 | 1 | 125 |
| 10 | 20 | 6 | 125 | 10 | 5 | 125 | 2 | 2 | 125 |
| 25 | – | – | – | 25 | 6 | 250 | 5 | 4 | 250 |
| 100 | – | – | – | 100 | 11 | 500 | 20 | 6 | 500 |
| 250 | – | – | – | – | – | – | 50 | 9 | 625 |
| 500 | – | – | – | – | – | – | 100 | 11 | 1000 |
| **Masse de drogue végétale par récipient (kg)** | **25** | | | **125** | | | **500** | | |
| **Masse totale de drogue végétale dans le lot (kg)** | **Nombre de récipients par lot** | **Nombre de récipients à échantillonner** | **Masse totale des échantillons (g)** | **Nombre de récipients par lot** | **Nombre de récipients à échantillonner** | **Masse totale des échantillons (g)** | **Nombre de récipients par lot** | **Nombre de récipients à échantillonner** | **Masse totale des échantillons (g)** |
| 25 | 1 | 1 | 250 | – | – | – | – | – | – |
| 100 | 4 | 3 | 500 | – | – | – | – | – | – |
| 250 | 10 | 5 | 625 | 2 | 2 | 625 | – | – | – |
| 500 | 20 | 6 | 1000 | 4 | 3 | 1000 | 1 | 1 | 1000 |
| 1000 | 40 | 8 | 1800 | 8 | 4 | 1800 | 2 | 2 | 1800 |
| 2000 | 80 | 10 | 3000 | 16 | 5 | 3000 | 4 | 3 | 3000 |
| 3000 | 120 | 12 | 3000 | 24 | 6 | 3000 | 6 | 4 | 3000 |
| 5000 | 200 | 16 | 5000 | 40 | 8 | 5000 | 10 | 5 | 5000 |
| 10 000 | 400 | 21 | 8000 | 80 | 10 | 8000 | 20 | 6 | 8000 |
| 25 000 | 800 | 30 | 12 500 | 160 | 14 | 12 500 | 40 | 8 | 12 500 |

ÉCHANTILLON EN VRAC

Lorsque l'examen externe des récipients, des marques et des étiquettes d'un lot indique que celui-ci peut être considéré comme homogène, effectuez l'échantillonnage sur le nombre de récipients, pris au hasard, qui est spécifié ci-après. Lorsqu'un lot ne peut pas être considéré comme homogène, divisez-le en sous-lots aussi homogènes que possible, puis effectuez l'échantillonnage sur chaque sous-lot comme s'il s'agissait d'un lot homogène, en utilisant au minimum le nombre de récipients, pris au hasard indiqué ci-après.

| **Nombre de récipients dans le lot (*N*)** | **Nombre de récipients à échantillonner (*n*)** |
|---|---|
| 1 - 3 | tous |
| > 3 | $n^* = \sqrt{N} + 1$ |

*$n$ arrondi à l'entier immédiatement supérieur

Prélevez un échantillon dans chacun des récipients à échantillonner. Le prélèvement est effectué dans la partie supérieure, médiane ou inférieure du récipient de telle sorte que les échantillons prélevés soient représentatifs des différentes parties des récipients. Si ces récipients sont des balles ou sacs de grande taille, les échantillons sont prélevés à une profondeur d'au moins 10 cm. La masse de produit à prélever dans chaque récipient est telle que la masse totale de l'échantillon en vrac sera conforme aux valeurs suivantes.

| **Masse de drogue végétale contenue dans le lot (kg)** | **Masse minimale des prélèvements, en pourcentage de la masse du lot de drogue végétale** |
|---|---|
| < 50 | 1,00* |
| 50 - 100 | 0,50 |
| > 100 - 250 | 0,25 |
| > 250 - 500 | 0,20 |
| > 500 - 1000 | 0,18 |
| > 1000 - 2500 | 0,15 |
| > 2500 - 5000 | 0,10 |
| > 5000 - 10 000 | 0,08 |
| > 10 000 - 25 000 | 0,05 |

NOTE : si la masse du lot est supérieure à 25 000 kg, il est divisé en sous-lots et la procédure est appliquée à chaque sous-lot comme s'il s'agissait d'un lot homogène.

*avec un minimum de 125 g pour la masse totale de l'échantillon en vrac. Si cette masse minimale représente plus de 10,0 pour cent de la masse de drogue végétale contenue dans le lot, le lot entier peut être utilisé comme échantillon.

Préparez l'échantillon en vrac en réunissant et en mélangeant uniformément les prélèvements provenant de chacun des récipients pris au hasard (voir tableau 2.8.20.-1).

ÉCHANTILLON À EXAMINER

Sauf indication contraire dans la monographie, préparez l'échantillon à examiner comme suit.

Procédez à la réduction de la taille de l'échantillon en vrac par la méthode du « cône » (voir Note ci-après) ou par une autre méthode donnant un échantillon homogène, en veillant à ce que chaque fraction retenue reste représentative de l'ensemble, jusqu'à obtention d'une fraction finale de masse minimale conforme aux indications suivantes.

| Type de drogue végétale | Masse minimale de l'échantillon à examiner |
|---|---|
| Racines, rhizomes, écorces, plantes entières | 500 g ou la masse de l'échantillon entier si l'échantillon en vrac pèse moins de 500 g |
| Feuilles, fleurs, graines, fruits | 250 g ou la masse de l'échantillon entier si l'échantillon en vrac pèse moins de 250 g |
| Drogues brisées ou fragmentées (masse moyenne des fragments inférieure à 0,5 g) | 125 g |

*NOTE : la réduction par la méthode du « cône » consiste à mettre en tas l'échantillon en vrac uniformément mélangé, à donner au tas une forme carrée de niveau régulier, et à le diviser en diagonale en 4 parties égales. 2 quarts opposés sont retenus et soigneusement mélangés. Le processus est répété autant de fois que nécessaire pour obtenir un échantillon à examiner de la masse minimale requise.*

Procédez au broyage de l'échantillon en une seule opération, sur un tamis à mailles de 1 mm ou de la taille spécifiée dans la monographie. L'emploi d'un broyeur est recommandé.

Faites passer l'échantillon broyé à travers un tamis normalisé à mailles de 1 mm ou de la taille spécifiée dans la monographie. Le résidu retenu sur le tamis ne représente pas plus de 10 pour cent de la masse totale de l'échantillon broyé et, dans ce résidu, les particules de taille supérieure à 1,5 mm ou 1,5 fois la taille de particules spécifiée dans la monographie ne représentent pas plus de 2 pour cent de la masse totale de l'échantillon broyé. Si ces conditions sont satisfaites, mélangez soigneusement l'échantillon et le résidu pour constituer l'échantillon à examiner.

Lorsque ces conditions ne sont pas satisfaites, l'échantillon à examiner est constitué par les 2 parties traitées séparément. La quantité d'échantillon requise pour chaque analyse est donc obtenue par pesée de quantités proportionnelles de la poudre et du résidu.

*NOTE : pour l'examen des caractères microscopiques, une portion de l'échantillon broyé fait l'objet d'un nouveau broyage sur un tamis à mailles de 0,355 mm.*

**01/2011:20821**

## 2.8.21. ESSAI DES ACIDES ARISTOLOCHIQUES DANS LES DROGUES VÉGÉTALES

*AVERTISSEMENT : les acides aristolochiques sont hautement toxiques et cancérigènes. Opérez sous hotte d'extraction chaque fois que possible, et prenez des précautions spécifiques (par exemple l'usage de boîtes à gants) pour manipuler la substance lorsqu'elle est à l'état sec, car ses propriétés électrostatiques favorisent alors leur dispersion dans la zone de travail.*

Les procédés A et B sont destinés à faire l'objet de renvois dans les monographies relatives aux drogues végétales qui, sur la base des connaissances chimiotaxonomiques, sont supposées ne pas contenir d'acides aristolochiques, mais qui pourraient faire l'objet de falsifications ou de substitutions par des matières végétales qui en contiennent. Les procédés A et B doivent servir au dépistage des acides aristolochiques présents dans les drogues végétales au-delà des limites prescrites ; ils seront généralement complétés par des essais macroscopiques et/ou microscopiques pour exclure toute matière végétale contenant des acides aristolochiques.

Le procédé C ne sera pas utilisé dans des monographies spécifiques, mais servira de méthode permettant de confirmer la présence d'acide aristolochique I à des niveaux supérieurs ou égaux à 2 ppm. Il pourra être appliqué si des données chromatographiques suggèrent la présence d'acide aristolochique I.

Ces méthodes ne visent pas à servir de méthodes de dosage dans les monographies des drogues produisant des acides aristolochiques comme métabolites secondaires ; pour celles-ci, une méthode plus sensible doit être validée.

PROCÉDÉ A : ESSAI DE DÉPISTAGE DES ACIDES ARISTOLOCHIQUES

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Mélange de solvants* : *acide formique anhydre R, eau R, méthanol R* (1:9:40 *V/V/V*).

*Solution à examiner.* A 1,0 g de drogue végétale pulvérisée (710) (*2.9.12*), ajoutez 10,0 mL de mélange de solvants. Traitez aux ultrasons pendant 10 min et centrifugez.

*Solution témoin (a).* Dispersez une quantité d'*aristolochia ERV* correspondant à 0,10 mg d'acide aristolochique I dans 20,0 mL de mélange de solvants, traitez aux ultrasons pendant 10 min et centrifugez.

*Solution témoin (b).* Prélevez 1,0 mL de solution témoin (a) et complétez à 25,0 mL avec du *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (2-10 μm).

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, acétate d'éthyle R, toluène R* (3:3:30:60 *V/V/V/V*) ; utilisez la phase supérieure.

*Dépôt* : 20 μL en bandes de 8 mm.

*Développement* : sur un parcours de 6 cm.

*Séchage* : dans un courant d'air froid pendant 5 min.

*Détection* : pulvérisez une solution de *chlorure stanneux R* à 100 g/L dans de l'*acide chlorhydrique dilué R*, jusqu'à ce que la plaque s'humidifie légèrement. Chauffez à 100 °C pendant 1 min et examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Conformité du système* :

- le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) présente 2 bandes bleu-vert dues aux acides aristolochiques I et II entre $R_F$ = 0,35 et $R_F$ = 0,55, qui peuvent toutefois ne pas être totalement séparées,
- le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) présente au moins 1 de ces bandes (correspondant à 2 ppm d'acide aristolochique I).

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente aucune bande semblable quant à sa position et sa fluorescence aux bandes dues aux acides aristolochiques dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

Si le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande semblable quant à sa position et sa fluorescence à une bande due aux acides aristolochiques I et II dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a), appliquez le procédé B.

PROCÉDÉ B : ESSAI LIMITE DE L'ACIDE ARISTOLOCHIQUE I

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Mélange de solvants* : *acétonitrile R, eau R* (50:50 *V/V*).

*Solution à examiner.* Pesez 2,0 g de drogue végétale pulvérisée (710) (*2.9.12*) dans un flacon brun de 250 mL muni d'un bouchon à vis et ajoutez 100,0 mL de mélange de solvants. Agitez pendant 30 min à environ 300 r/min et filtrez sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 μm).

*Solution témoin (a).* Dissolvez le contenu d'un flacon d'*acide aristolochique I SCR* dans le mélange de solvants pour obtenir une concentration de 0,04 μg/mL d'acide aristolochique I.

*Solution témoin (b).* Dissolvez le contenu d'un flacon d'*acide aristolochique pour conformité du système SCR* (contenant les acides aristolochiques I et II) dans le mélange de solvants et complétez à 20,0 mL avec le mélange de solvants.

*Colonne* :

- *dimensions* : *l* = 0,15 m, Ø = 2,1 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (3,5 µm),
- *température* : 40 °C.

*Phase mobile* :

- *phase mobile A* : *acide trifluoracétique R, eau R* (0,1:99,9 *V/V*),
- *phase mobile B* : *acide trifluoracétique R, acétonitrile R* (0,1:99,9 *V/V*),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 25 | 85 → 35 | 15 → 65 |
| 25 - 30 | 35 → 0 | 65 → 100 |
| 30 - 31 | 0 → 85 | 100 → 15 |

*Débit* : 0,3 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 390 nm.

*Injection* : 25 µL.

*Conformité du système* :

- *résolution* : au minimum 3,0 entre les pics dus aux acides aristolochiques I et II dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b),
- *rapport signal/bruit* : au minimum 10 pour le pic dû à l'acide aristolochique I dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

*Limite* :

- l'échantillon satisfait à l'essai si le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de pic dont le temps de rétention est le même que celui du pic dû à l'acide aristolochique I dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (2 ppm).

PROCÉDÉ C : ESSAI DE CONFIRMATION DE L'ACIDE ARISTOLOCHIQUE I

Chromatographie liquide (*2.2.29*) couplée à une spectrométrie de masse (*2.2.43*).

*Mélange de solvants* : *acétonitrile R, eau R* (50:50 *V/V*).

*Solution à examiner.* Pesez 2,0 g de drogue végétale pulvérisée (710) (*2.9.12*) dans un flacon brun de 250 mL muni d'un bouchon à vis et ajoutez 100,0 mL de mélange de solvants. Traitez aux ultrasons pendant 30 min et filtrez sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm).

*Solution témoin (a).* Dissolvez le contenu d'un flacon d'*acide aristolochique I SCR* dans le mélange de solvants pour obtenir une concentration de 0,04 µg/mL d'acide aristolochique I.

*Solution témoin (b).* Préparez une solution selon les indications fournies avec l'*acide aristolochique I SCR* pour obtenir une concentration de 0,45 µg d'acide aristolochique I dans 10,0 mL de solution à examiner.

*Colonne* :

- *dimensions* : *l* = 0,15 m, Ø = 2,1 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (3,5 µm),
- *température* : 40 °C.

*Phase mobile* :

- *phase mobile A* : *acide formique anhydre R*, solution d'*acétate d'ammonium R* à 1 g/L dans de l'*eau R* (0,1:99,9 *V/V*),
- *phase mobile B* : *acide formique anhydre R*, solution d'*acétate d'ammonium R* à 1 g/L dans le *méthanol R* (0,1:99,9 *V/V*),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Mobile phase B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 15 | 70 → 0 | 30 → 100 |
| 15 - 16 | 0 | 100 |
| 16 - 17 | 0 → 70 | 100 → 30 |

*Débit* : 0,4 mL/min.

*Injection* : 20 µL ; injectez 2 fois la solution témoin (a), 2 fois la solution à examiner, 2 fois la solution témoin (a) puis 2 fois la solution témoin (b).

*Détection* : spectromètre de masse, comme décrit ci-après aux points A et B. Ajustez le débit, la température et les réglages du détecteur de manière à satisfaire au critère de conformité du système.

A. Spectromètre de masse de type piège à ion, muni d'une interface d'ionisation par électronébuliseur (ESI) et d'un analyseur $MS^n$.

   Réglez les paramètres du spectromètre de masse pour le mode $MS^3$ comme suit :

| Mode | Parent (*m/z*) | Fenêtre d'isolement (*m/z*) | Energie de collision relative (pour cent) |
|---|---|---|---|
| $MS^2$ | 359 $[M + NH_4]^+$ | 2,0 | 30 |
| $MS^3$ | 298 | 2,0 | 35 |

   - balayage complet des ions-produits : *m/z* 80 à *m/z* 370 ;
   - ions-produits à monitorer : *m/z* 252, *m/z* 268 et *m/z* 281.

   *Conformité du système* :

   - *rapport signal/bruit* : au minimum 100 pour les ions-produits monitorés dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) ;
   - *contrôle d'interférence de la matrice* : la moyenne des 2 rapports de la solution témoin (b) est située dans l'intervalle de ± 40 pour cent de la moyenne des 2 rapports de la solution témoin (a) ; si ce n'est pas le cas, ajustez les réglages du détecteur.

   *Résultats* : évaluez les rapports moyens (252/268 et 281/268) de l'intensité relative des 3 ions-produits de l'acide aristolochique I dans la solution à examiner ; évaluez la moyenne des 2 rapports des signaux au temps de rétention de l'acide aristolochique I dans la solution témoin (a) ; si la moyenne des 2 rapports de la solution à examiner est située dans l'intervalle de ± 40 pour cent de la moyenne des 2 rapports de la solution témoin (a), l'acide aristolochique I est présent dans la solution à examiner.

B. Spectromètre de masse à triple quadrupôle, muni d'une interface ESI et d'un analyseur $MS^n$.

   Réglez les paramètres du spectromètre de masse pour le mode $MS^2$ comme suit :

   - ion précurseur : *m/z* 359 $[M + NH_4]^+$ ;
   - ions-produits à monitorer : *m/z* 265, *m/z* 281 et *m/z* 296.

   *Conformité du système* :

   - *rapport signal/bruit* : au minimum 100 pour les ions-produits monitorés dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) ;
   - *contrôle d'interférence de la matrice* : la moyenne des 2 rapports de la solution témoin (b) est située dans l'intervalle de ± 40 pour cent de la moyenne des 2 rapports de la solution témoin (a) ; si ce n'est pas le cas, ajustez les réglages du détecteur.

*Résultats* : évaluez les rapports moyens (265/281 et 296/281) de l'intensité relative des 3 ions-produits de l'acide aristolochique I dans la solution à examiner ; évaluez la moyenne des 2 rapports des signaux au temps de rétention de l'acide aristolochique I dans la solution témoin (a) ; si la moyenne des 2 rapports de la solution à examiner est située dans l'intervalle de ± 40 pour cent de la moyenne des 2 rapports de la solution témoin (a), l'acide aristolochique I est présent dans la solution à examiner.

**01/2010:20822**

# 2.8.22. DOSAGE DE L'OCHRATOXINE A DANS LES DROGUES VÉGÉTALES

*AVERTISSEMENT : l'ochratoxine A est néphrotoxique et néphrocancérigène. Opérez sous hotte d'extraction et prenez des précautions spécifiques (par exemple l'usage de boîtes à gants) pour manipuler les toxines lorsqu'elles sont à l'état sec, car leurs propriétés électrostatiques favorisent alors leur dispersion dans la zone de travail. Des procédures de décontamination de la verrerie contenant de l'ochratoxine A sont nécessaires (voir annexe).*

Les drogues végétales sujettes à contamination par l'ochratoxine A sont contrôlées selon une méthode validée.

La méthode ci-après est décrite à titre d'exemple de méthode vérifiée comme appropriée pour l'extrait de réglisse et la racine de réglisse. Pour les autres drogues végétales, il est nécessaire de démontrer son applicabilité ou d'utiliser une autre méthode validée.

MODE OPÉRATOIRE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

Utilisez de la verrerie brune exempte de résidus de détergent. Si nécessaire, lavez la verrerie avant emploi avec une solution d'*acide sulfurique R* à 10 pour cent *V/V* puis rincez soigneusement à l'*eau distillée R* jusqu'à élimination complète de l'acide.

*Solution A*. Mélangez 80 volumes d'*eau R*, préalablement ajustée à pH 2,3 avec de l'*acide formique anhydre R*, et 20 volumes d'*acétonitrile R*.

*Solution à examiner*. Utilisez une colonne d'immunoaffinité contenant des anticorps dirigés contre l'ochratoxine A de capacité supérieure ou égale à 100 ng d'ochratoxine A et donnant un recouvrement supérieur ou égal à 70 pour cent. Laissez la colonne d'immunoaffinité atteindre la température ambiante.

A 2,00 g de drogue pulvérisée (250) (*2.9.12*), ajoutez 80 mL d'une solution de *bicarbonate de sodium R* à 30 g/L, puis procédez à l'extraction en traitant aux ultrasons pendant 30 min (changez l'eau du bain d'ultrasons après 15 min). Refroidissez à température ambiante et complétez à 100,0 mL ($V_1$) avec la même solution. Centrifugez. Mélangez soigneusement 5,0 mL ($V_i$) du surnageant limpide et 30 mL de *solution tampon pH 7,4 R* et faites passer toute la solution dans la colonne d'immunoaffinité, à un débit de 3 mL/min (sans dépasser 5 mL/min). Lavez la colonne avec 10 mL de *solution tampon pH 7,4 R* puis avec 2 fois 10 mL d'*eau R*, à un débit ne dépassant pas 5 mL/min puis séchez en appliquant un vide modéré pendant 5-10 s ou en insufflant de l'air dans la colonne pendant 10 s au moyen d'une seringue. Déposez 0,5 mL de *méthanol R* sur la colonne et laissez-le passer par gravité.

Recueillez l'éluat dans une fiole en verre de 4 mL. Attendez 30 s, puis déposez une 2$^{e}$ fois 0,5 mL de *méthanol R*, laissez-le passer par gravité et recueillez-le dans la même fiole en verre. Attendez 30 s supplémentaires, puis déposez une 3$^{e}$ fois 0,5 mL de *méthanol R*. Veillez à récupérer le solvant resté dans la colonne, en appliquant le vide ou en faisant passer de l'air sous pression. Evaporez complètement les éluats combinés à siccité en utilisant un bloc de régulation thermique sous couverture d'azote (40 °C). Dissolvez le résidu dans 0,5 mL ($V_2$) de solution A. Si la solution est limpide, elle peut être analysée directement. Dans le cas contraire, passez-la sur un filtre jetable avant injection. Utilisez un filtre jetable (par exemple un filtre en polytétrafluoroéthylène présentant des pores de 0,45 μm) n'entraînant pas de perte d'ochratoxine A par rétention.

*Solution mère primaire d'ochratoxine A*. Prélevez 1,0 mL de *solution d'ochratoxine A R* et complétez à 100,0 mL avec du *méthanol R*. Agitez soigneusement.

*Solution mère secondaire d'ochratoxine A*. Prélevez 10,0 mL de solution mère primaire d'ochratoxine A et complétez à 100,0 mL avec du *méthanol R*. Agitez soigneusement.

*Solutions de référence d'ochratoxine A*. Introduisez séparément dans des fioles les volumes de solution mère primaire d'ochratoxine A ou de solution mère secondaire d'ochratoxine A indiqués dans le tableau 2.8.22.-1 et complétez à 50,0 mL avec la solution A.

Tableau 2.8.22.-1. – *Solutions de référence d'ochratoxine A*

| Solution de référence | Volume de solution mère primaire d'ochratoxine A (μL) | Concentration finale d'ochratoxine A dans la solution de référence (ng/mL) |
|---|---|---|
| 1 | 5000 | 50 |
| 2 | 2500 | 25 |
| 3 | 1000 | 10 |
| 4 | 500 | 5 |
| 5 | 250 | 2,5 |
| **Solution de référence** | **Volume de solution mère secondaire d'ochratoxine A (μL)** | **Concentration finale d'ochratoxine A dans la solution de référence (ng/mL)** |
| 6 | 500 | 0,5 |
| 7 | 100 | 0,1 |

*Courbe d'étalonnage.* Etablissez une courbe d'étalonnage à l'aide des solutions de référence 1 à 7 d'ochratoxine A qui couvrent un intervalle de teneur en ochratoxine A de 0,5-250 μg/kg dans la drogue végétale. Vérifiez la linéarité du tracé. Si la teneur en ochratoxine A de l'échantillon à examiner se situe hors de l'intervalle d'étalonnage, diluez la solution à examiner jusqu'à une concentration d'ochratoxine A compatible avec la courbe d'étalonnage établie.

*Colonne* :

- *dimensions* : $l$ = 0,15 m, Ø = 4,6 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 μm),
- *température* : 45 °C.

*Phase mobile* :

- *phase mobile A* : *eau R* ajustée à pH 2,3 avec de l'*acide phosphorique R*,
- *phase mobile B* : *acétonitrile R*,

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 30 | 80 → 40 | 20 → 60 |
| 30 - 35 | 40 → 20 | 60 → 80 |
| 35 - 37 | 20 | 80 |
| 37 - 40 | 20 → 80 | 80 → 20 |

*Débit* : 0,8 mL/min.

*Détection* : détecteur fluorimétrique ; pour les détecteurs réglables, les réglages recommandés sont de 330 nm (longueur d'onde d'excitation) et de 460 nm (longueur d'onde d'émission).

*Injection* : 20 μL.

*Calcul* : calculez l'équation $y = ax + b$ de la droite d'étalonnage, $x$ étant la concentration d'ochratoxine A, en nanogrammes par millilitre, et $y$ le signal $S$ obtenu. La concentration $C$ d'ochratoxine A dans une solution est égale à $\frac{S-b}{a}$.

Calculez la teneur en ochratoxine A de la drogue végétale, en nanogrammes par gramme, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{V_1 \times V_2 \times C}{m \times V_i}$$

$m$ = masse de la drogue utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$V_1$ = volume de dilution, en millilitres,

$V_i$ = partie aliquote soumise à la purification par immunoaffinité, en millilitres,

$V_2$ = volume utilisé pour reprendre le résidu, en millilitres,

$C$ = valeur mesurée de la concentration d'ochratoxine A dans la solution à examiner, en nanogrammes par millilitre.

## Annexe : Procédure de décontamination de la verrerie de laboratoire

Rincez la verrerie avec du *méthanol R* puis décontaminez par immersion dans de la *solution concentrée d'hypochlorite de sodium* pendant au moins 2 h. Lavez ensuite soigneusement à l'eau.

**04/2010:20823**

# 2.8.23. EXAMEN MICROSCOPIQUE DES DROGUES VÉGÉTALES

L'examen microscopique des drogues végétales s'effectue sur la drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*) sauf indication contraire précisée dans la monographie.

La *solution d'hydrate de chloral R* est le réactif généralement préconisé. Cependant, certains éléments ne sont pas ou sont peu visibles après montage dans ce réactif. D'autres réactifs sont alors utilisés comme la solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V* qui permet la mise en évidence des grains d'amidon. Enfin, si nécessaire, des réactifs particuliers, précisés dans chaque monographie, peuvent être choisis. C'est le cas du *réactif lactique R* qui permet la mise en évidence simultanée de divers éléments, de la solution alcoolique de *phloroglucine R* à 10 pour cent *V/V* et de l'*acide chlorhydrique R* qui permettent d'identifier la présence de lignine dans des cellules ou dans des tissus, de la *solution de rouge de ruthénium R* pour la mise en évidence de mucilages dans des cellules ou encore du *glycérol R* pour la mise en évidence de l'amidon et de l'inuline.

L'examen sous lumière polarisée (entre nicols croisés) permet l'identification d'éléments, tels des grains d'amidon (phénomène de la croix noire), des cristaux d'oxalate de calcium (réfringence) ou des structures lignifiées.

MONTAGE DANS LA SOLUTION D'HYDRATE DE CHLORAL

Déposez 2-3 gouttes de *solution d'hydrate de chloral R* sur la lame porte-objet. Dispersez dans le liquide une très petite quantité de drogue pulvérisée et recouvrez la préparation avec une lamelle. Chauffez très doucement la préparation sur une plaque chauffante ou sur la flamme d'un microbrûleur à gaz jusqu'à ébullition. Maintenez une ébullition douce pendant quelques instants. Assurez-vous que la quantité de liquide de montage est suffisante. Réintroduisez-en à l'aide d'une pipette de verre effilée, si nécessaire. Laissez refroidir la préparation puis examinez au microscope. Répétez le chauffage jusqu'à disparition des grains d'amidon et du contenu hydrosoluble des cellules. Examinez au microscope.

L'hydrate de chloral tend à cristalliser en longues aiguilles. Afin d'éviter ce phénomène, procédez de la façon suivante : après chauffage, retirez la lamelle, ajoutez à la préparation 1 goutte d'un mélange de *solution d'hydrate de chloral R* à 10 pour cent *V/V* dans le *glycérol R*, placez une lamelle propre sur la préparation et examinez au microscope.

MONTAGE DANS LA SOLUTION DE GLYCÉROL À 50 POUR CENT *V/V*

Déposez 2 gouttes de solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V* sur la lame porte-objet. Dispersez dans le liquide une très petite quantité de drogue pulvérisée et recouvrez la préparation avec une lamelle. Examinez au microscope.

MONTAGE DANS LA SOLUTION ALCOOLIQUE DE PHLOROGLUCINE À 10 POUR CENT *V/V* ET DANS L'ACIDE CHLORHYDRIQUE

Déposez une très petite quantité de drogue pulvérisée sur la lame porte objet. Ajoutez 1-2 gouttes de solution alcoolique de *phloroglucine R* à 10 pour cent *V/V*. Mélangez et laissez le solvant s'évaporer presque complètement. Ajoutez 1-2 gouttes d'*acide chlorhydrique R* et recouvrez avec la lamelle. Examinez immédiatement au microscope. Une couleur rouge indique la présence de lignine.

MONTAGE DANS LE RÉACTIF LACTIQUE

Déposez 2-3 gouttes de *réactif lactique R* sur la lame porte-objet. Dispersez dans le liquide une très petite quantité de drogue pulvérisée et recouvrez la préparation avec une lamelle. Chauffez très doucement la préparation jusqu'à ébullition. Maintenez une ébullition douce pendant quelques instants. Assurez-vous que la quantité de liquide de montage est suffisante. Réintroduisez-en à l'aide d'une pipette de verre effilée, si nécessaire. Laissez refroidir la préparation puis examinez au microscope. Les éléments lignifiés sont jaune vif ; les éléments cellulosiques restent incolores ; les grains d'amidon sont plus ou moins violets ; certaines sécrétions (huile essentielle, résine, oléorésine...) sont oranges et le suber est rouge.

MONTAGE DANS LA SOLUTION DE ROUGE DE RUTHÉNIUM

Déposez 2 gouttes de *solution de rouge de ruthénium R* sur la lame porte-objet. Dispersez dans le liquide une très petite quantité de drogue pulvérisée et recouvrez la préparation avec une lamelle. Après environ 1 minute, laissez une goutte d'*eau distillée R* courir entre la lame porte objet et la lamelle. Examinez au microscope. Les mucilages sont rouge-violet.

# 2.9. MÉTHODES DE PHARMACOTECHNIE

# 2.9. MÉTHODES DE PHARMACOTECHNIE

**01/2009:20901**

## 2.9.1. DÉSAGRÉGATION DES COMPRIMÉS ET DES CAPSULES

Cet essai est destiné à déterminer l'aptitude des comprimés ou capsules à se désagréger dans un temps prescrit, en milieu liquide et dans les conditions expérimentales décrites ci-après.

Dans le cadre de cet essai, la désagrégation n'implique pas une dissolution complète de l'unité soumise à l'essai ni même de son composant actif. Par définition la désagrégation est complète, lorsque tout résidu, à l'exception de fragments insolubles d'enrobage ou d'enveloppe de capsule, pouvant subsister sur la grille de l'appareil ou adhérer à la face inférieure du disque, si l'on en a utilisé un, est constitué d'une masse molle ne comportant pas de noyau palpable.

Utilisez l'appareillage A pour les comprimés et les capsules dont la dimension n'excède pas 18 mm. Dans le cas de comprimés ou de capsules plus grands, utilisez l'appareillage B.

ESSAI A – COMPRIMÉS ET CAPSULES DE DIMENSIONS NORMALES

**Appareillage**. L'appareillage se compose d'un panier porte-tubes, d'un vase cylindrique bas de 1 L destiné à contenir le liquide d'immersion, d'une hauteur de 149 ± 11 mm et d'un diamètre intérieur de 106 ± 9 mm, d'un système thermostatique permettant de maintenir le liquide à une température comprise entre 35-39 °C, et d'un dispositif servant à imprimer au porte-tubes, dans le liquide d'immersion, un mouvement vertical alternatif de fréquence constante comprise entre 29-32 cycles par minute de montée-descente et d'amplitude de 55 ± 2 mm. Le volume de liquide introduit dans le vase est ajusté pour que le treillis métallique soit, en haut de course, à au moins 15 mm de la surface du liquide et, en bas de course, à au moins 25 mm du fond du vase. A aucun moment le haut du panier ne doit être submergé. Les temps de montée et de descente sont égaux, et le changement de sens s'effectue selon une transition progressive plutôt qu'une inversion brutale. Le porte-tubes suit un mouvement vertical suivant son axe, sans mouvement horizontal appréciable ni déviation significative par rapport à la verticale.

*Ensemble mobile*. Le râtelier porte 6 tubes transparents ouverts aux 2 extrémités. Chacun possède une longueur de 77,5 ± 2,5 mm, un diamètre intérieur de 21,85 ± 1,15 mm, et une paroi de 1,9 ± 0,9 mm d'épaisseur. Les tubes sont maintenus en position verticale par 2 plaques, de 90 ± 2 mm de diamètre et 6,75 ± 1,75 mm d'épaisseur, percées chacune de 6 trous de 24 ± 2 mm de diamètre, régulièrement espacés et équidistants du centre de la plaque. Sous la plaque inférieure est fixé un treillis métallique en fils d'acier inoxydable de 0,615 ± 0,045 mm de diamètre, à tissage simple et mailles carrées de 2,0 ± 0,2 mm d'ouverture. Les différentes parties de l'ensemble sont assemblées et maintenues de façon rigide par 3 boulons traversant les 2 plaques. Un dispositif adéquat permet de suspendre l'ensemble au mécanisme moteur par un point situé sur l'axe du porte-tubes.

La configuration de l'appareil peut présenter des variations de détail, sous réserve que les spécifications dimensionnelles des tubes et du treillis métallique soient respectées. Les dimensions sont conformes aux spécifications présentées figure 2.9.1.-1.

*Disques*. L'utilisation de disques n'est admise que lorsqu'elle est explicitement spécifiée ou autorisée. Chaque tube est alors pourvu d'un disque cylindrique de 9,5 ± 0,15 mm d'épaisseur et 20,7 ± 0,15 mm de diamètre, constitué d'une matière plastique transparente appropriée possédant une densité de 1,18-1,20. Chaque disque est percé sur toute son épaisseur de 5 trous tubulaires parallèles de 2 ± 0,1 mm de diamètre, dont l'un est centré sur l'axe du cylindre et les autres, situés à 6 ± 0,2 mm de l'axe, sur des droites imaginaires perpendiculaires à l'axe et parallèles entre elles. La surface latérale des disques comporte 4 encoches trapézoïdales identiques, sensiblement perpendiculaires aux 2 bases du cylindre ; ces encoches ont la forme d'un trapèze symétrique dont les 2 côtés parallèles coïncident avec les bases du cylindre et sont parallèles à une droite imaginaire reliant les centres de 2 trous adjacents situés à 6 mm de l'axe. Le côté du trapèze qui est visible sur la face inférieure du cylindre a une longueur de 1,6 ± 0,1 mm et l'arête inférieure est en retrait de 1,5 mm à 1,8 mm de la circonférence du cylindre. Le côté du trapèze qui est visible sur la face supérieure du cylindre a une longueur de 9,4 ± 0,2 mm, et son centre est en retrait de 2,6 ± 0,1 mm de la circonférence du cylindre. Toutes les surfaces du disque sont lisses.

Si l'emploi de disques est prescrit, placez un disque dans chaque tube puis faites fonctionner l'appareil comme indiqué sous Mode opératoire. Les disques sont conformes aux spécifications dimensionnelles présentées figure 2.9.1.-1.

L'usage de disques modifiés en vue d'une détection automatique est permis dans les cas où l'usage de disques est spécifié ou autorisé. Ces disques doivent satisfaire aux exigences de densité et de dimensions indiquées dans ce chapitre.

**Mode opératoire**. Placez 1 unité de la préparation à examiner dans chacun des 6 tubes du râtelier, puis ajoutez un disque si l'emploi de disques est prescrit. Faites fonctionner l'appareil en utilisant, comme liquide d'immersion, le milieu spécifié maintenu à 37 ± 2 °C. Au temps indiqué, remontez le porte-tubes hors du liquide et examinez l'état des unités soumises à l'essai. Toutes les unités sont complètement désagrégées. Si 1 ou 2 d'entre elles ne sont pas désagrégées, répétez l'essai sur 12 unités supplémentaires. Les exigences de l'essai sont satisfaites si au moins 16 des 18 unités soumises à l'essai sont désagrégées.

ESSAI B – COMPRIMÉS ET CAPSULES DE GRANDES DIMENSIONS

**Appareillage**. La partie principale de l'appareillage (figure 2.9.1.-2) est constituée par un assemblage rigide supportant 3 tubes cylindriques transparents. Chaque tube a une longueur de 77,5 ± 2,5 mm et un diamètre intérieur de 33,0 ± 0,5 mm ; la paroi a une épaisseur de 2,5 ± 0,5 mm. Chacun de ces tubes est pourvu d'un disque cylindrique (diamètre 31,4 ± 0,13 mm et épaisseur 15,3 ± 0,15 mm) en matière plastique transparente d'une densité de 1,18-1,20. Chaque disque est percé de part en part de 7 trous de 3,15 ± 0,1 mm de diamètre : 1 trou central et 6 autres également espacés et disposés sur un cercle de 4,2 mm de rayon à partir du centre du disque. Les tubes sont maintenus verticaux par 2 plaques, séparées et superposées, en matière plastique rigide, de 97 mm de diamètre et de 9 mm d'épaisseur, percées chacune de 3 trous. Les trous sont équidistants du centre de la plaque et également espacés entre eux. Sous la plaque inférieure est fixée une toile métallique en fils d'acier inoxydable de 0,63 ± 0,03 mm de diamètre et à mailles de 2,0 ± 0,2 mm. Les plaques sont maintenues en place à une distance de 77,5 mm par des tiges métalliques verticales situées à la périphérie ; la plaque supérieure porte également, fixée en son centre, une tige métallique qui permet de relier cet assemblage à un dispositif mécanique destiné à assurer un mouvement vertical, alternatif et régulier, dont l'amplitude est de 55 ± 2 mm ; le nombre de déplacements complets, montée-descente, est de 29-32 par minute.

L'appareil est placé de préférence dans un vase cylindrique de 1 L ou dans tout autre récipient convenable. Le volume de liquide à verser dans le récipient est tel que, lorsque l'assemblage est dans la position la plus élevée, le tamis métallique est au moins à 15 mm en dessous de la surface du liquide et, lorsque l'assemblage est dans sa position la plus basse, le tamis est au moins à 25 mm du fond, les extrémités supérieures des tubes ouverts demeurant au-dessus de la surface du liquide. Un

dispositif adéquat maintient la température de l'ensemble à 35-39 °C.

Les éléments mécaniques décrits peuvent subir des modifications de détail mais les cotes des tubes et de la toile métallique doivent être conformes aux prescriptions décrites ci-dessus.

**Mode opératoire**. Examinez 6 comprimés ou capsules, soit en utilisant 2 appareils en parallèle, soit en répétant l'essai. Dans chacun des 3 tubes, introduisez un comprimé ou une capsule, puis un disque s'il est prescrit ; placez l'assemblage dans le vase cylindrique contenant le milieu liquide indiqué. Faites fonctionner l'appareil pendant le temps prescrit. Ce temps écoulé, retirez l'assemblage et examinez l'état des comprimés ou des capsules. L'essai est satisfaisant si les 6 échantillons sont désagrégés.

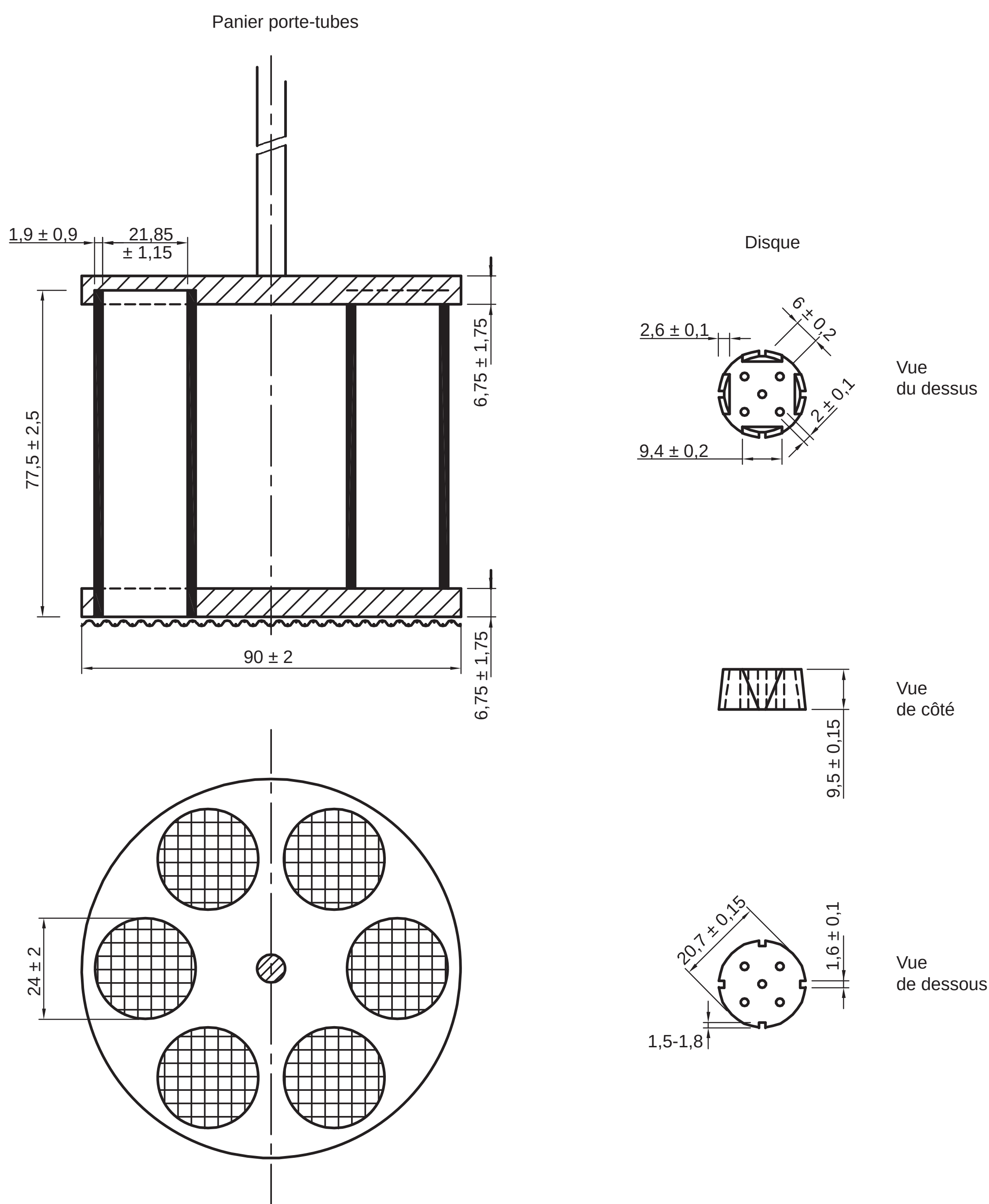



Figure 2.9.1.-1 – *Appareil de désagrégation A*

*Dimensions en millimètres*

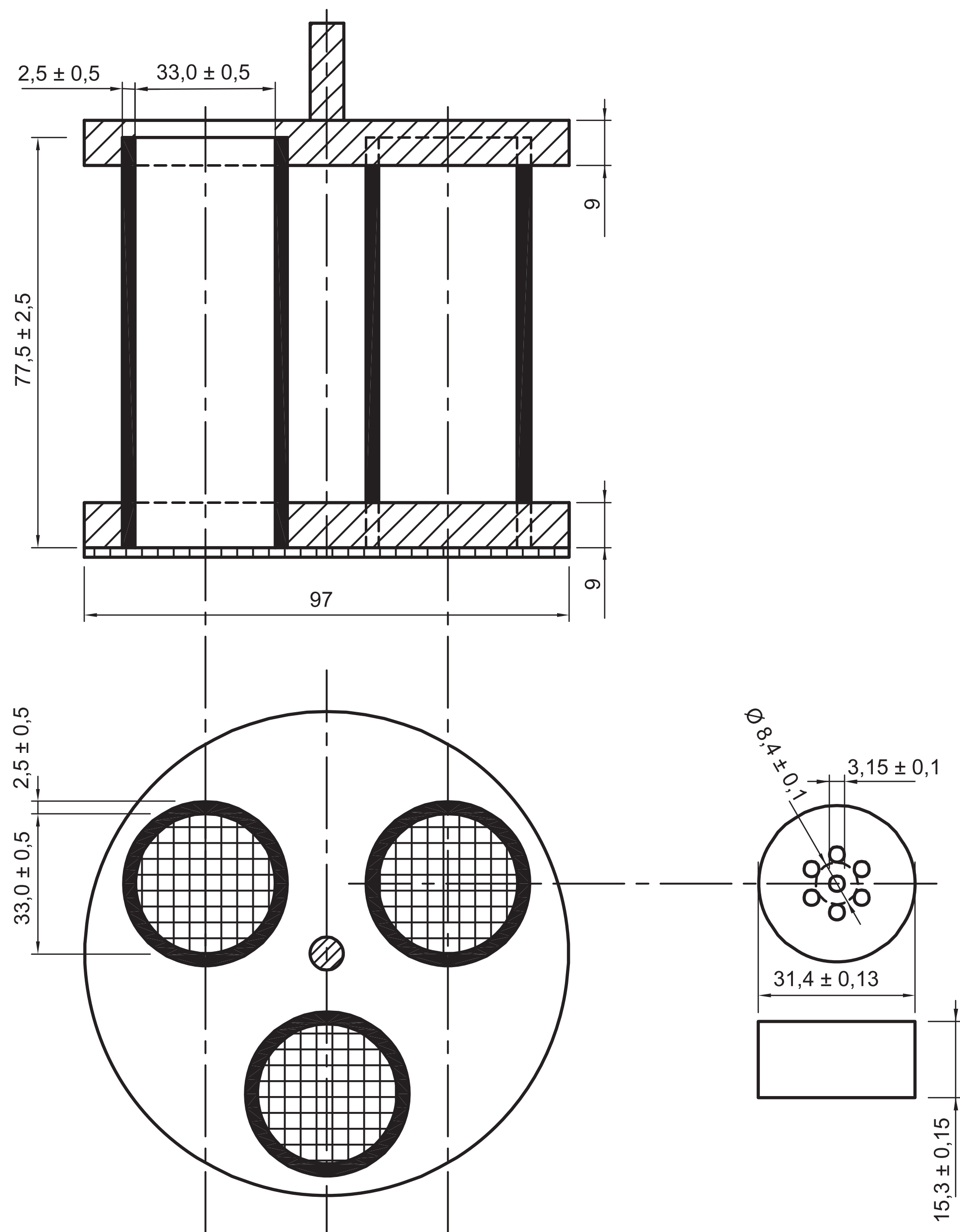



Figure 2.9.1.-2. – *Appareillage de désagrégation B*
*Dimensions en millimètres*

**01/2008:20902**

## 2.9.2. DÉSAGRÉGATION DES SUPPOSITOIRES ET DES OVULES

Cet essai est destiné à déterminer la plus ou moins grande aptitude des suppositoires ou des ovules à se ramollir ou se désagréger, en milieu liquide, dans le temps prescrit. En utilisant l'appareil dans les conditions expérimentales décrites ci-après, la désagrégation est considérée comme atteinte lorsque :

a) la dissolution est complète,

b) les composants des suppositoires ou ovules sont séparés : composés lipidiques fondus rassemblés à la surface de l'eau, poudres insolubles déposées au fond et composés solubles passés en solution. Suivant le type de préparation, les composants peuvent être répartis sous une ou plusieurs de ces formes,

c) un ramollissement se produit, accompagné éventuellement d'une modification de la forme primitive du suppositoire ou de l'ovule, sans séparation complète des constituants. Le ramollissement est tel que le suppositoire ou l'ovule ne contient plus de noyau résistant à la pression d'une baguette de verre,

d) l'enveloppe de gélatine des capsules rectales et vaginales présente une déchirure et commence à libérer son contenu,

e) il ne reste plus de résidu sur la plaque perforée ou, s'il subsiste un résidu, il est constitué par une masse molle (qui peut être effervescente) ne comportant pas de noyau résistant à la pression d'une baguette de verre (comprimés vaginaux).

*Appareil.* L'appareil (voir figure 2.9.2.-1) est constitué par un manchon à paroi transparente de verre ou matière plastique, d'une épaisseur appropriée, à l'intérieur duquel est fixé, au moyen de 3 crochets, un support métallique. Ce dernier comporte 2 plaques en métal inoxydable, de forme circulaire, percées chacune de 39 trous de 4 mm de diamètre et distantes l'une de l'autre de 30 mm environ ; leur diamètre est sensiblement égal au diamètre intérieur du manchon. L'essai est réalisé à l'aide de 3 de ces appareils destinés à contenir chacun un seul échantillon. Ils sont placés chacun dans une cuve de 4 L au moins remplie d'eau dont la température est maintenue à 36-37 °C sauf indication contraire. Les appareils peuvent également être placés tous les 3 dans une même cuve de 12 L au moins. La cuve est munie d'un mélangeur à vitesse réduite et d'un dispositif permettant de maintenir l'appareil

verticalement à 90 mm au moins au-dessous de la surface de l'eau et de le tourner de 180° autour d'un axe horizontal sans le faire sortir du liquide.

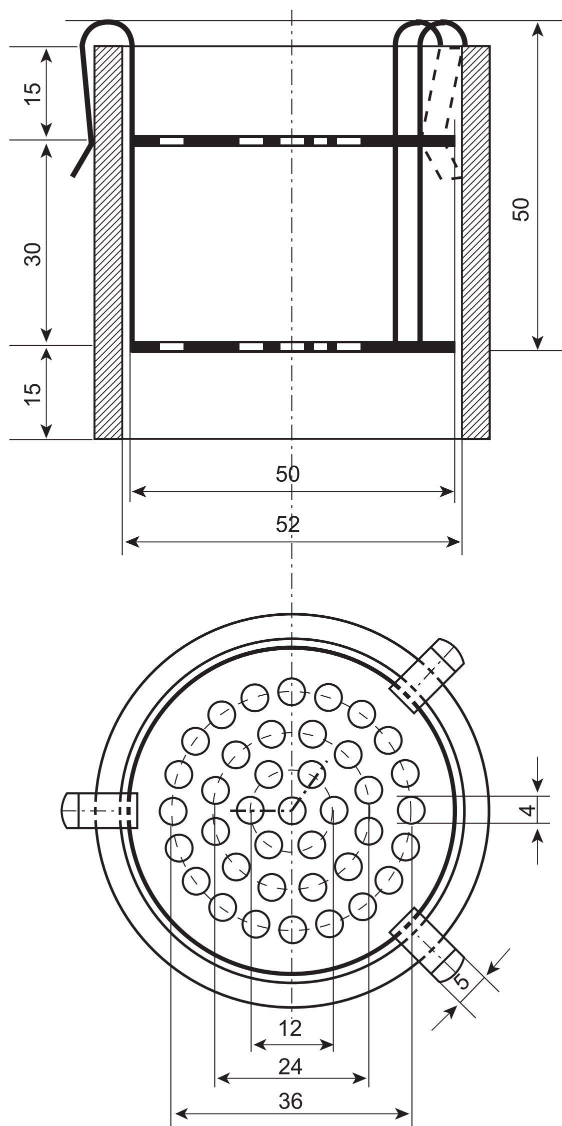


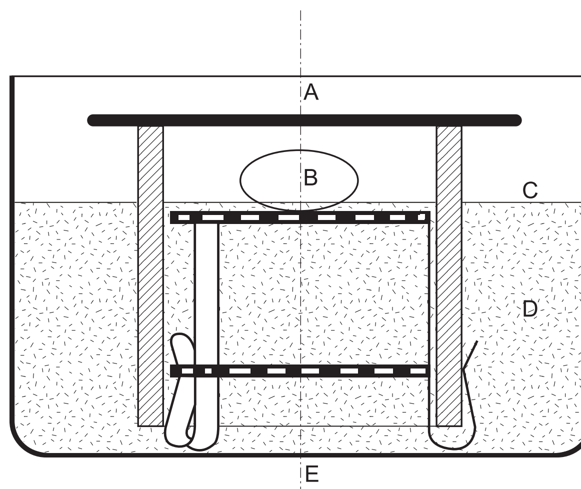

Figure 2.9.2.-1. – *Appareil pour la désagrégation des suppositoires et des ovules*

*Dimensions en millimètres*

*Mode opératoire.* Opérez sur 3 suppositoires ou ovules. Déposez chacun d'eux sur la plaque inférieure d'un support. Introduisez et fixez chaque support dans le manchon d'un appareil. Tournez les appareils de 180° toutes les 10 min. Examinez l'état des échantillons après le délai indiqué dans la monographie. L'essai est satisfaisant si tous les échantillons sont désagrégés.

UTILISATION DE L'APPAREIL DANS LE CAS DES COMPRIMÉS VAGINAUX

Utilisez l'appareil décrit ci-dessus mais en le disposant de façon qu'il repose sur ses crochets (voir figure 2.9.2.-2). Placez-le dans un cristallisoir d'un diamètre approprié contenant de l'eau dont la température est maintenue à 36-37 °C et dont le niveau est situé légèrement au-dessous de la plaque perforée supérieure. A l'aide d'une pipette, ajustez ensuite le niveau avec de l'eau à 36-37 °C de façon qu'un film uniforme recouvre juste les perforations de la plaque. Opérez sur 3 comprimés vaginaux ; déposez chacun d'eux sur la plaque supérieure d'un appareil et recouvrez ce dernier avec une plaque de verre afin de maintenir les conditions d'humidité appropriées. Examinez l'état des échantillons après le délai indiqué dans la monographie. L'essai est satisfaisant si tous les échantillons sont désagrégés.




A. plaque de verre

B. comprimé vaginal

C. surface de l'eau

D. eau

E. cuve, cristallisoir

Figure 2.9.2.-2

**01/2010:20903**
**corrigé 6.8**

## 2.9.3. ESSAI DE DISSOLUTION DES FORMES SOLIDES

Cet essai vise à déterminer la conformité des formes pharmaceutiques solides orales aux exigences de dissolution. Dans ce chapitre, une unité de la préparation à examiner est définie comme un comprimé/capsule ou le nombre spécifié de comprimés/capsules.

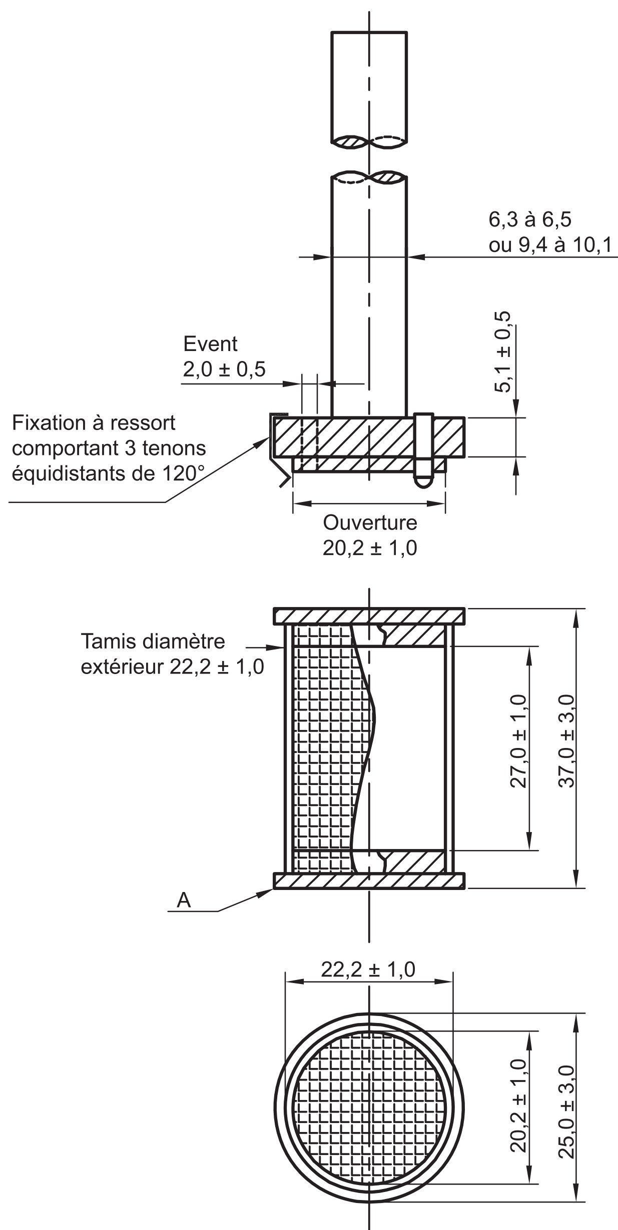
APPAREILLAGE

**Appareil 1 (appareil à panier)**. L'appareil est composé des éléments suivants : un récipient qui peut être couvert, en verre ou autre matériau transparent inerte(1) ; un moteur ; un agitateur constitué d'une tige servant d'axe moteur et d'un panier cylindrique. Le récipient est partiellement immergé dans un bain d'eau thermostaté de taille appropriée ou chauffé par un dispositif approprié tel un chauffe-ballon. Le bain d'eau ou le dispositif chauffant permet de maintenir à l'intérieur du récipient une température de 37 ± 0,5 °C et d'assurer un mouvement fluide et constant du milieu de dissolution. Aucune des parties de l'appareillage, ni l'environnement dans lequel il est placé, ne génèrent de mouvement, agitation ou vibration significatifs autres que ceux dus à la rotation régulière de l'agitateur. Il est préférable d'utiliser un appareil permettant d'observer la préparation et l'agitateur au cours de l'essai. Le récipient est de forme cylindrique, à fond hémisphérique d'une contenance de 1 L. Il présente une hauteur de 160-210 mm et un diamètre intérieur de 98-106 mm. Le bord du récipient forme une collerette sur laquelle peut venir s'ajuster un couvercle adapté destiné à retarder l'évaporation(2). La tige est positionnée de telle sorte que son axe ne s'écarte en aucun point de plus de 2 mm de l'axe vertical du récipient et que sa rotation soit uniforme et sans oscillation significative susceptible d'affecter

(1) Le matériau utilisé ne doit présenter aucun risque de sorption, réaction ou interférence avec la préparation à examiner.
(2) Si un couvercle est utilisé, il comporte des ouvertures suffisantes pour permettre d'introduire le thermomètre et de prélever les échantillons sans difficulté.

les résultats. L'appareil est équipé d'un dispositif permettant de régler la vitesse de rotation de la tige et de la maintenir à une valeur spécifiée, à ± 4 pour cent près.

La tige et le panier qui constituent l'agitateur sont en acier inoxydable type 316 ou équivalent, et conformes aux spécifications de la figure 2.9.3.-1.




1) Tamis à soudure en continu : diamètre de fil de 0,25-0,31 mm ; ouverture de maille de 0,36-0,44 mm. La réalisation de la soudure peut entraîner une légère modification du tamis.

2) Ecart maximum admissible en « A » de 1,0 mm lorsque l'élément est en rotation autour de l'axe central avec le panier en place.

Figure 2.9.3.-1. – *Appareil 1, à panier*

*Dimensions en millimètres*

On peut utiliser un panier à placage d'or d'environ 2,5 µm (0,0001 pouce) d'épaisseur. La préparation à examiner est placée dans le panier sec en début d'essai. Une distance de 25 ± 2 mm est maintenue pendant l'essai entre le fond du panier et le fond du récipient.

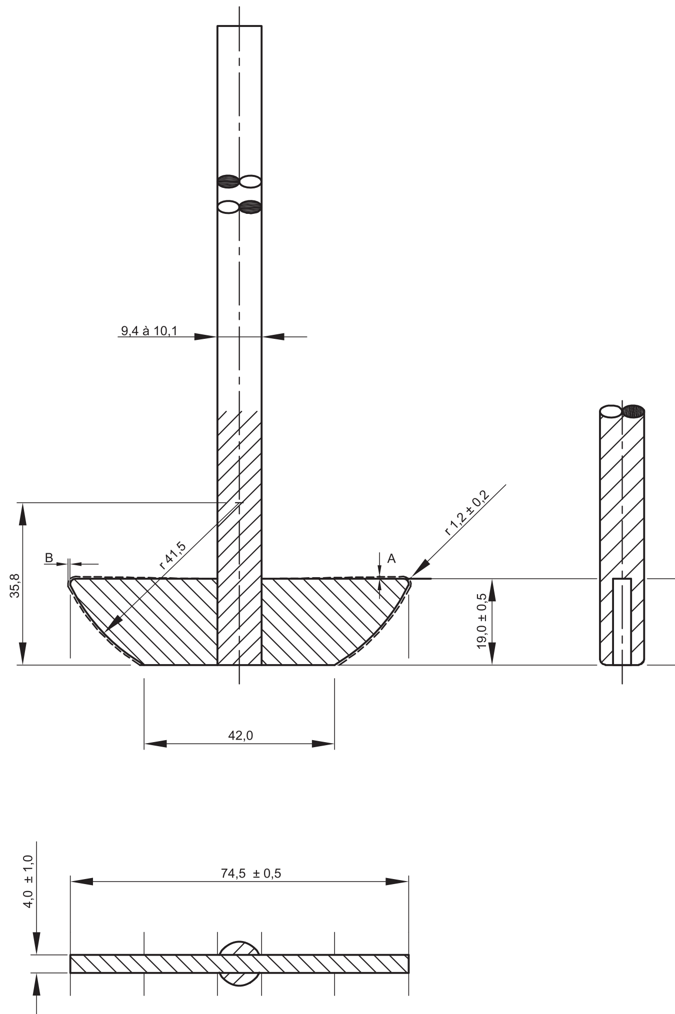
**Appareil 2 (appareil à palette)**. L'appareil présente la même configuration que l'appareil 1, sauf que l'élément agitateur est ici une palette constituée d'une pale et d'une tige. La tige est positionnée de telle sorte que son axe ne s'écarte en aucun point de plus de 2 mm de l'axe vertical du récipient et que sa rotation soit uniforme et sans oscillation significative susceptible d'affecter les résultats. La pale est insérée sur la tige de façon que leurs axes coïncident et que la surface inférieure de la pale soit exactement de niveau avec l'extrémité de la tige. La palette est conforme aux spécifications de la figure 2.9.3.-2. Une distance de 25 ± 2 mm est maintenue pendant l'essai entre le bord inférieur de la pale et le fond du récipient. La pale et la tige sont en métal ou autre matériau rigide et inerte approprié, et forment un tout. Un système approprié en 2 parties détachables peut toutefois être utilisé à condition que les 2 pièces restent solidement assemblées pendant l'essai. La pale et la tige peuvent être recouvertes d'un placage approprié permettant de les rendre inertes. On laisse la préparation tomber au fond du récipient avant de mettre la palette en rotation. Certaines préparations ayant tendance à surnager peuvent être lestées avec un matériau non réactif, par exemple quelques tours d'hélice d'un fil métallique. Le maintien en immersion peut également être réalisé au moyen du dispositif représenté en figure 2.9.3.-3. D'autres dispositifs peuvent également être utilisés sous réserve de validation.

**Appareil 3 (appareil à pistons)**. L'appareillage est composé des éléments suivants : un jeu de vases cylindriques en verre à fond plat ; un jeu de pistons tubulaires en verre ; des raccords inertes (acier inoxydable type 316 ou autre matériau approprié) et des tamis, constitués d'un matériau non réactif et non sorbant, qui s'adaptent aux 2 extrémités des pistons ; un moteur et un système d'entraînement permettant d'imprimer aux pistons un mouvement vertical alternatif à l'intérieur des vases et, si nécessaire, de les transférer par translation horizontale dans une autre rangée de vases. Les vases sont partiellement immergés dans un bain d'eau thermostaté de taille appropriée permettant de maintenir la température à 37 ± 0,5 °C. Aucune des parties de l'appareillage, ni l'environnement dans lequel il est placé, ne génèrent de mouvement, agitation ou vibration significatifs autres que ceux dus au mouvement vertical régulier des pistons. Un dispositif de régulation permet de sélectionner la fréquence du mouvement alternatif et de la maintenir à la valeur spécifiée, à ± 5 pour cent près. Il est préférable d'utiliser un appareil permettant d'observer les unités soumises à l'essai et les pistons. Les vases sont équipés d'un capuchon régulant l'évaporation, qui reste en place durant l'essai. Sauf indication contraire, les éléments de l'appareil sont conformes aux spécifications dimensionnelles de la figure 2.9.3.-4.

**Appareil 4 (cellule à flux continu)**. L'appareil est composé des éléments suivants : un réservoir et une pompe assurant la circulation du milieu de dissolution ; une cellule à flux continu ; un bain d'eau thermostaté permettant de maintenir la température du milieu de dissolution à 37 ± 0,5 °C. Utilisez une cellule de la taille spécifiée.

La pompe refoule le milieu de dissolution vers le haut, à travers la cellule à flux continu. Elle possède un refoulement de 240-960 mL/h, à des débits normalisés de 4 mL/min, 8 mL/min et 16 mL/min. Elle doit assurer un débit constant (± 5 pour cent du débit nominal) ; le régime d'écoulement est sinusoïdal avec une fréquence de 120 ± 10 pulsations/min. Des pompes non pulsatiles peuvent également être utilisées. Les procédures d'essai de dissolution utilisant la cellule à flux continu doivent être caractérisées en terme de débit et, le cas échéant, de pulsation.

La cellule à flux continu (figures 2.9.3.-5 et 2.9.3.-6) est constituée d'un matériau inerte et transparent. Elle est montée verticalement et surmontée d'un filtre assurant la rétention dans la cellule des particules non dissoutes ; les diamètres normalisés de cellule sont de 12 mm et 22,6 mm ; la partie inférieure conique de la cellule est généralement remplie de petites billes de verre d'un diamètre d'environ 1 mm et une bille plus grosse d'environ 5 mm est placée à la pointe pour protéger le tube d'admission ; un support spécial (figures 2.9.3.-5 et 2.9.3.-6) peut être utilisé pour certaines formes pharmaceutiques particulières. La cellule est immergée dans un bain d'eau thermostaté permettant de maintenir la température à 37 ± 0,5 °C.




Les dimensions A et B ne varient pas de plus de 0,5 mm lorsque la palette tourne sur son axe central.
Sauf indication contraire, les tolérances sont de ± 1,0 mm.

Figure 2.9.3.-2. – *Appareil 2, à palette*
*Dimensions en millimètres*

Le montage de la cellule s'effectue au moyen d'un dispositif de serrage et de 2 joints toriques. La pompe est séparée de l'unité de dissolution afin que celle-ci soit isolée des vibrations engendrées par la pompe. Elle ne doit pas être installée à un niveau supérieur à celui des réservoirs. Les tubes de connexion sont aussi courts que possible. Il convient d'utiliser des tubes en matériau inerte tel que le polytétrafluoroéthylène, d'un diamètre intérieur de 1,6 mm et des connexions à raccord à bride chimiquement inertes.

*Conformité de l'appareil.* La détermination de la conformité de l'appareil pour essai de dissolution comporte la conformité aux dimensions et tolérances de l'appareil décrit plus haut. En outre, des paramètres critiques doivent être contrôlés périodiquement pendant l'utilisation tels que le volume, la température du milieu de dissolution, la vitesse de rotation (Appareils 1 et 2), la fréquence du mouvement alternatif (Appareil 3) et le débit du milieu de dissolution (Appareil 4).

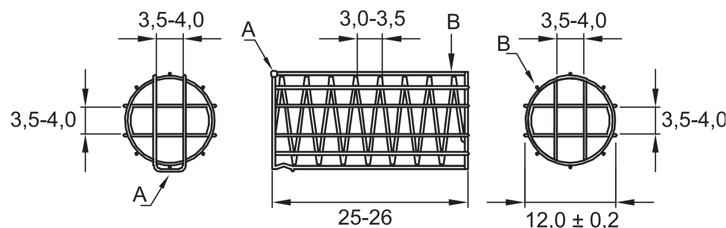
Vérifiez périodiquement que la performance de l'appareil de dissolution est acceptable.

MODE OPÉRATOIRE

*APPAREILS 1 ET 2*

**Formes à libération conventionnelle**

*Mode opératoire.* Introduisez le volume indiqué du milieu de dissolution (± 1 pour cent) dans le récipient de l'appareil spécifié, puis assemblez l'appareil, équilibrez le milieu de dissolution à 37 ± 0,5 °C et retirez le thermomètre. L'essai peut également être effectué avec le thermomètre en place, à




A : fermoir résistant à l'acide

B : support résistant à l'acide

Figure 2.9.3.-3. – *Dispositif de maintien en immersion*
*Dimensions en millimètres*

condition de démontrer que les résultats obtenus en présence et en l'absence du thermomètre sont équivalents.

Placez 1 unité de la préparation à examiner dans l'appareil, en prenant soin d'éviter la formation de bulles d'air sur la surface de l'échantillon et mettez l'appareil en marche à la vitesse spécifiée. Dans l'intervalle de temps spécifié ou à chacun des temps indiqués, prélevez un échantillon du milieu de dissolution dans une zone située à mi-distance de la surface du milieu et du haut du panier ou de la pale en rotation, et à au moins 1 cm de la paroi du récipient. Remplacez les échantillons de milieu prélevés par des volumes égaux de milieu de dissolution frais à 37 °C ou, s'il peut être démontré que le remplacement du milieu n'est pas nécessaire, tenez compte du changement de volume dans le calcul. Gardez le récipient couvert pendant toute la durée de l'essai et vérifiez la température du milieu à intervalles de temps appropriés. Procédez à l'analyse de l'échantillon par une méthode de dosage appropriée[(3)]. Répétez l'essai sur d'autres unités de la préparation.

Si l'on utilise un système d'échantillonnage automatisé ou un appareil modifié à d'autres fins, il est nécessaire de vérifier que l'appareil modifié produira des résultats équivalents à ceux obtenus avec l'appareil décrit dans ce chapitre.

*Milieu de dissolution*. Un milieu de dissolution approprié est utilisé. Le volume spécifié est mesuré à 20-25 °C. S'il s'agit d'une solution tamponnée, ajustez le pH de la solution à la valeur spécifiée, à 0,05 unité près. La présence de gaz dissous peut entraîner la formation de bulles susceptibles de fausser les résultats de l'essai ; il convient dans ce cas d'éliminer les gaz dissous avant de procéder à l'essai[(4)].

*Temps*. Lorsqu'une seule spécification de temps est donnée, l'essai peut être arrêté plus tôt si le taux minimum de dissolution exigé est atteint. Les prélèvements doivent être strictement effectués aux temps indiqués, avec une tolérance de ± 2 pour cent.

**Formes à libération prolongée**

*Mode opératoire*. Procédez comme décrit pour les formes à libération conventionnelle.

*Milieu de dissolution*. Procédez comme décrit pour les formes à libération conventionnelle.

*Temps*. Les temps auxquels sont effectués les prélèvements (généralement au nombre de 3) sont exprimés en heures.

**Formes à libération retardée**

*Mode opératoire*. Utilisez la méthode A ou la méthode B.

Méthode A

– *Etape acide*. Introduisez 750 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* dans le récipient puis assemblez l'appareil. Laissez équilibrer le milieu à 37 ± 0,5 °C. Placez 1 unité de la préparation à examiner dans l'appareil, couvrez le récipient et mettez l'appareil en marche à la vitesse spécifiée. Après 2 h d'agitation dans l'*acide chlorhydrique 0,1 M*, prélevez un échantillon du milieu et poursuivez immédiatement comme indiqué sous Etape tampon. Effectuez une analyse de l'échantillon prélevé, par une méthode de dosage appropriée.
– *Etape tampon*. Les opérations d'addition du tampon et d'ajustement du pH doivent être effectuées en moins de 5 min. L'appareil étant en marche à la vitesse spécifiée, ajoutez au milieu contenu dans le récipient, 250 mL d'une solution de *phosphate trisodique dodécahydraté R* à 0,20 M préalablement équilibrée à 37 ± 0,5 °C. Ajustez, si nécessaire, à pH 6,8 ± 0,05 avec de l'*acide chlorhydrique 2 M R* ou de l'*hydroxyde de sodium 2 M R*. Poursuivez l'agitation pendant 45 min ou pendant le temps spécifié, puis prélevez un échantillon du milieu et procédez à l'analyse par une méthode de dosage appropriée.

Méthode B

– *Etape acide*. Introduisez 1000 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* dans le récipient puis assemblez l'appareil. Laissez équilibrer le milieu à 37 ± 0,5 °C. Placez 1 unité de la préparation à examiner dans l'appareil, couvrez le récipient et mettez l'appareil en marche à la vitesse spécifiée. Après 2 h d'agitation dans l'*acide chlorhydrique 0,1 M*, prélevez un échantillon du milieu et poursuivez immédiatement comme indiqué sous Etape tampon. Effectuez une analyse de l'échantillon prélevé, par une méthode de dosage appropriée.
– *Etape tampon*. Pour cette étape de la procédure, utilisez du tampon préalablement équilibré à 37 ± 0,5 °C. Videz l'acide contenu dans le récipient puis introduisez dans celui-ci 1000 mL d'une solution tampon pH 6,8 préparée comme suit : mélangez 3 volumes d'*acide chlorhydrique 0,1 M* et 1 volume d'une solution de *phosphate trisodique dodécahydraté R* à 0,20 M, puis ajustez si nécessaire à pH 6,8 ± 0,05 avec de l'*acide chlorhydrique 2 M R* ou de l'*hydroxyde de sodium 2 M R*. On peut également procéder en sortant de l'appareil le récipient qui contient l'acide et en le remplaçant par un autre récipient contenant le tampon, puis en transférant dans ce dernier la préparation à examiner. Poursuivez l'agitation pendant 45 min ou pendant le temps spécifié, puis prélevez un échantillon du milieu et procédez à l'analyse par une méthode de dosage appropriée.

*Temps*. Sauf indication contraire, tous les temps de prélèvement indiqués doivent être strictement observés, avec une tolérance de ± 2 pour cent.

*APPAREIL 3*

**Formes à libération conventionnelle**

*Mode opératoire*. Introduisez le volume indiqué du milieu de dissolution (± 1 pour cent) dans chacun des vases, puis assemblez l'appareil, équilibrez le milieu de dissolution à 37 ± 0,5 °C et retirez le thermomètre. Placez dans chacun des pistons 1 unité de la préparation à examiner, en prenant soin d'éviter la formation de bulles d'air sur la surface des échantillons et mettez immédiatement l'appareil en marche comme spécifié. Au cours de chaque cycle de montée-descente, le piston parcourt une distance totale de 9,9-10,1 cm. Dans l'intervalle de temps spécifié ou à chacun des temps indiqués, remontez les pistons et prélevez un échantillon du milieu de dissolution dans une zone située à mi-distance de la surface du milieu et du fond de chaque vase. Procédez à l'analyse comme indiqué. Si nécessaire, répétez l'essai sur d'autres unités de la préparation.

Remplacez les échantillons de milieu prélevés par des volumes égaux de milieu de dissolution frais à 37 °C ou, s'il peut être démontré que le remplacement du milieu n'est pas nécessaire, tenez compte du changement de volume dans le calcul. Gardez les vases couverts par le capuchon pendant toute la durée de l'essai, et vérifiez la température du milieu à intervalles de temps appropriés.

*Milieu de dissolution*. Procédez comme décrit pour les formes à libération conventionnelle sous Appareils 1 et 2.

*Temps*. Procédez comme décrit pour les formes à libération conventionnelle sous Appareils 1 et 2.

(3) Les échantillons sont filtrés immédiatement après prélèvement, sauf s'il est démontré que la filtration n'est pas nécessaire. Utilisez un filtre inerte qui n'adsorbe pas la substance active ni ne contienne de substances extractibles susceptibles d'interférer dans l'analyse.
(4) Une méthode de désaération possible est la suivante : chauffez le milieu à environ 41 °C en agitant doucement, puis filtrez immédiatement sous vide sur filtre de porosité inférieure ou égale à 0,45 µm en agitant énergiquement et poursuivez l'agitation sous vide pendant environ 5 min. D'autres techniques de désaération validées peuvent également être utilisées pour éliminer les gaz dissous.

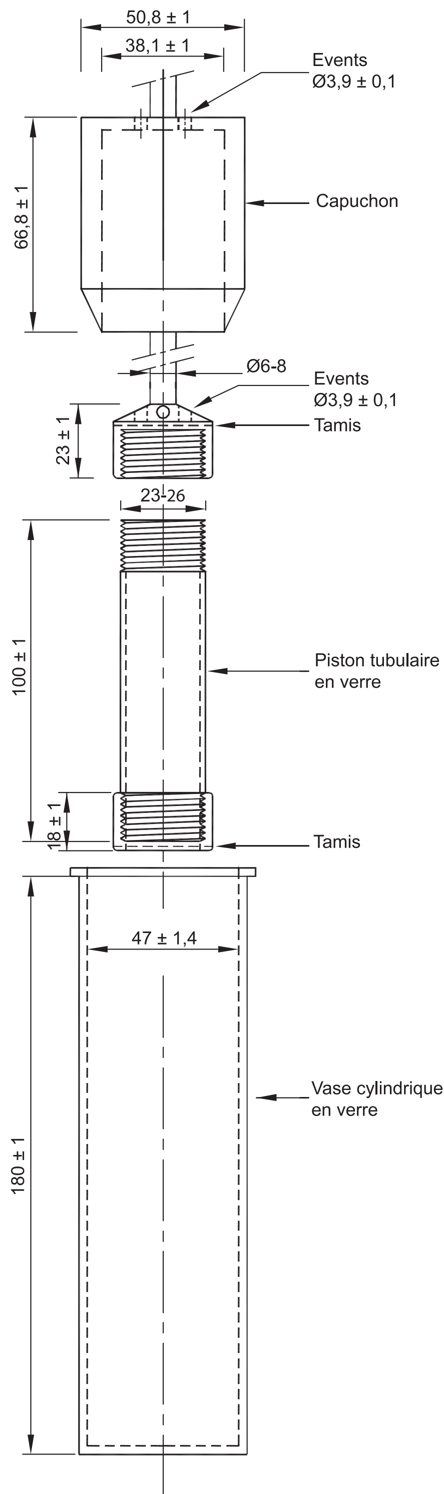



Figure 2.9.3.-4. – *Appareil 3, à vases et à pistons*
*Dimensions en millimètres sauf indication contraire*

**Formes à libération prolongée**

*Mode opératoire.* Procédez comme décrit pour les formes à libération conventionnelle sous Appareil 3.

*Milieu de dissolution.* Procédez comme décrit pour les formes à libération prolongée sous Appareils 1 et 2.

*Temps.* Procédez comme décrit pour les formes à libération prolongée sous Appareils 1 et 2.

**Formes à libération retardée**

*Mode opératoire.* Procédez comme décrit pour les formes à libération retardée, Procédé B, sous Appareils 1 et 2, en utilisant une série de vases pour l'étape acide et l'autre série pour l'étape tampon, et en utilisant le volume de milieu spécifié (généralement 300 mL).

*Temps.* Procédez comme indiqué pour les formes à libération retardée sous Appareils 1 et 2.

*APPAREIL 4*

**Formes à libération conventionnelle**

*Mode opératoire.* Placez les billes de verre dans la cellule spécifiée. Placez 1 unité de la préparation à examiner sur le lit de billes ou, dans les cas spécifiés, sur un support spécial. Montez la tête de filtration et assemblez entre elles les différentes parties de l'appareil au moyen du dispositif de serrage. A l'aide de la pompe, introduisez le milieu de dissolution chauffé à 37 ± 0,5 °C dans la cellule, par la partie inférieure, de façon à obtenir le débit spécifié mesuré avec une exactitude de 5 pour cent. Recueillez l'éluat par fractions aux temps spécifiés. Procédez à l'analyse comme indiqué. Répétez l'essai sur d'autres unités de la préparation.

*Milieu de dissolution.* Procédez comme décrit pour les formes à libération conventionnelle sous Appareils 1 et 2.

*Temps.* Procédez comme décrit pour les formes à libération conventionnelle sous Appareils 1 et 2.

**Formes à libération prolongée**

*Mode opératoire.* Procédez comme décrit pour les formes à libération conventionnelle sous Appareil 4.

*Milieu de dissolution.* Procédez comme décrit pour les formes à libération conventionnelle sous Appareil 4.

*Temps.* Procédez comme décrit pour les formes à libération conventionnelle sous Appareil 4.

**Formes à libération retardée**

*Mode opératoire.* Procédez comme décrit pour les formes à libération retardée sous Appareils 1 et 2, en utilisant les milieux spécifiés.

*Temps.* Procédez comme décrit pour les formes à libération retardée sous Appareils 1 et 2.

INTERPRÉTATION

**Formes à libération conventionnelle**

Sauf indication contraire, les exigences de l'essai sont satisfaites si les quantités de substance active passée en solution sont conformes aux critères d'acceptation du tableau 2.9.3.-1. Poursuivez l'essai jusqu'au 3e niveau sauf si des résultats conformes sont obtenus aux niveaux $S_1$ ou $S_2$. La grandeur $Q$ est la quantité spécifiée de substance active passée en solution, exprimée en pourcentage de la teneur indiquée sur l'étiquette ; les pourcentages (5 pour cent, 15 pour cent et 25 pour cent) figurant dans le tableau se rapportent également à la teneur indiquée sur l'étiquette, de sorte qu'ils sont exprimés dans les mêmes termes que $Q$.

Tableau 2.9.3.-1

| Niveau | Nombre d'unités examinées | Critères d'acceptation |
|---|---|---|
| $S_1$ | 6 | Aucune unité n'est inférieure à $Q$ + 5 pour cent. |
| $S_2$ | 6 | La moyenne des 12 unités ($S_1 + S_2$) est égale ou supérieure à $Q$ et aucune unité n'est inférieure à $Q$ – 15 pour cent. |
| $S_3$ | 12 | La moyenne des 24 unités ($S_1 + S_2 + S_3$) est égale ou supérieure à $Q$, au maximum 2 unités peuvent être inférieures à $Q$ – 15 pour cent et aucune unité n'est inférieure à $Q$ – 25 pour cent. |

**Formes à libération prolongée**

Sauf indication contraire, les exigences de l'essai sont satisfaites si les quantités de substance active passée en solution sont conformes aux critères d'acceptation du tableau 2.9.3.-2.

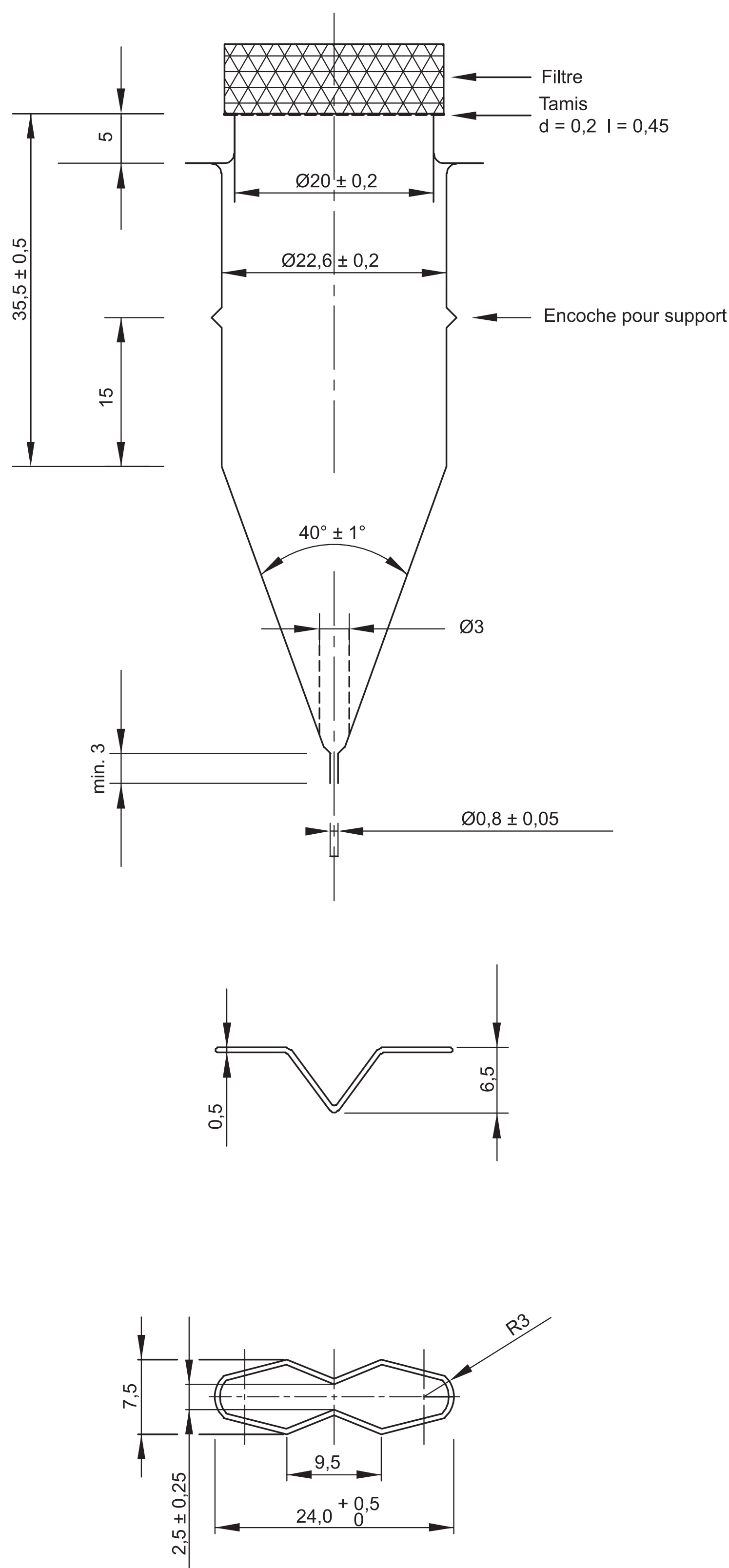



Figure 2.9.3.-5. – *Appareil 4, cellule de grande taille pour comprimés et capsules (en haut) et support spécial correspondant (en bas)*

*Dimensions en millimètres sauf indication contraire*

Poursuivez l'essai jusqu'au 3e niveau sauf si des résultats conformes sont obtenus aux niveaux $L_1$ ou $L_2$. Les limites sur les quantités de substance active passée en solution sont exprimées en pourcentage de la teneur indiquée sur l'étiquette. Elles délimitent un intervalle encadrant chaque valeur $Q_i$, c'est à dire la quantité de substance passée en solution à chacun des temps d'analyse spécifiés. Lorsque plusieurs intervalles sont spécifiés, les critères d'acceptation s'appliquent individuellement à chacun d'eux.

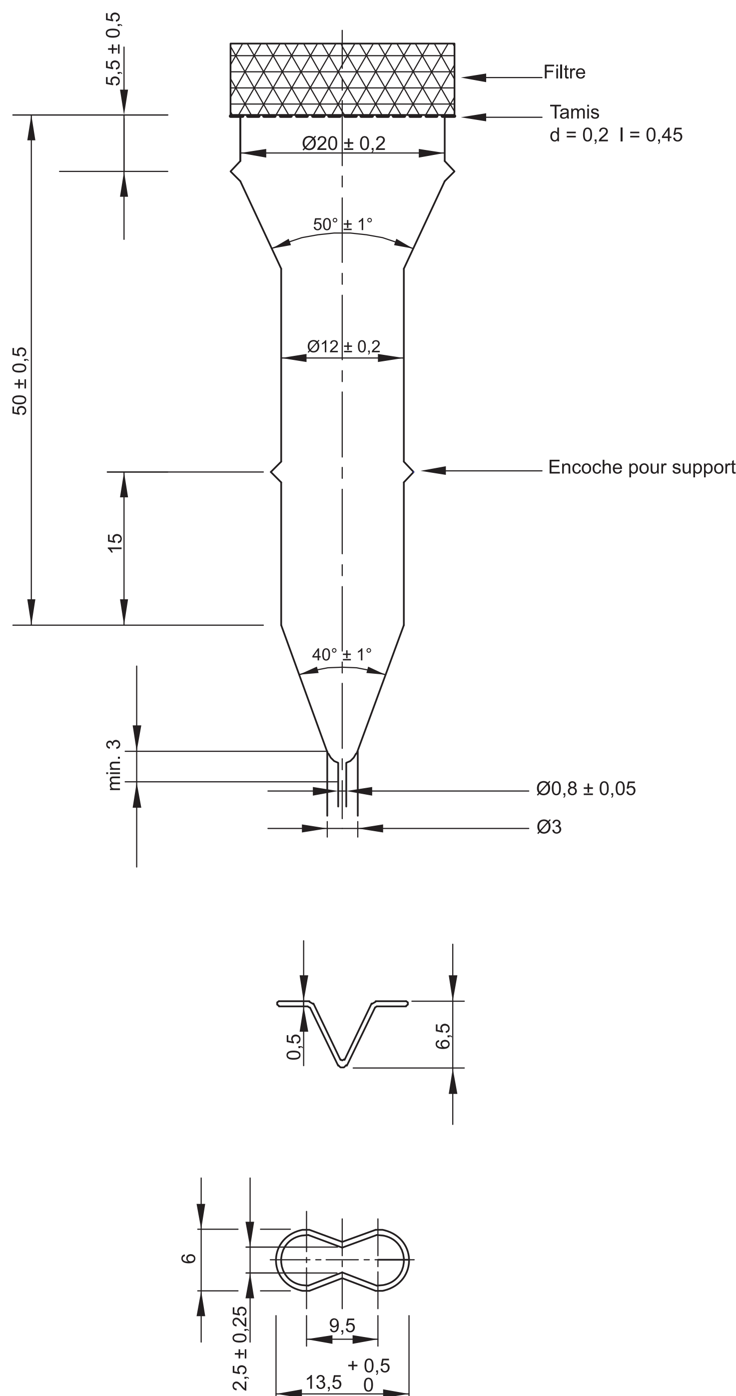



Figure 2.9.3.-6. – *Appareil 4, cellule de petite taille pour comprimés et capsules (en haut) et support spécial correspondant (en bas)*

*Dimensions en millimètres sauf indication contraire*

**Formes à libération retardée**

*Etape acide.* Sauf indication contraire, les exigences de cette partie de l'essai sont satisfaites si les quantités de substance active passée en solution, exprimées en pourcentage de la teneur indiquée sur l'étiquette, sont conformes aux critères d'acceptation du tableau 2.9.3.-3. Poursuivez l'essai jusqu'au 3e niveau sauf si des résultats conformes sont obtenus à un niveau précédent pour les 2 étapes (acide et tampon).

*Etape tampon.* Sauf indication contraire, les exigences de l'essai sont satisfaites si les quantités de substance active passée en solution sont conformes aux critères d'acceptation du tableau 2.9.3.-4. Poursuivez l'essai jusqu'au 3e niveau sauf si des résultats conformes sont obtenus à un niveau précédent pour les 2 étapes. Dans le tableau 2.9.3.-4, la valeur de *Q* est de 75 pour cent, sauf indication contraire. La grandeur *Q* est la quantité totale spécifiée de substance active passée en solution au cours des 2 étapes (acide et tampon), exprimée en pourcentage de la teneur indiquée sur l'étiquette ; les pourcentages (5 pour cent, 15 pour cent et 25 pour cent) figurant dans le tableau se rapportent également à la teneur indiquée sur l'étiquette, de sorte qu'ils sont exprimés dans les mêmes termes que *Q*.

Tableau 2.9.3.-2

| Niveau | Nombre d'unités examinées | Critères d'acceptation |
|---|---|---|
| $L_1$ | 6 | Aucune valeur individuelle ne se situe en-dehors des différents intervalles spécifiés ni n'est inférieure à la quantité spécifiée au temps final de l'essai. |
| $L_2$ | 6 | La moyenne des 12 unités ($L_1 + L_2$) est comprise dans chaque intervalle spécifié et n'est pas inférieure à la quantité spécifiée au temps final de l'essai ; aucune valeur ne présente, par rapport aux différents intervalles spécifiés, un écart supérieur à 10 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette ni n'est inférieure de plus de 10 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette à la quantité spécifiée au temps final de l'essai. |
| $L_3$ | 12 | La moyenne des 24 unités ($L_1 + L_2 + L_3$) est comprise dans chaque intervalle spécifié et n'est pas inférieure à la quantité spécifiée au temps final de l'essai ; au maximum 2 des 24 valeurs peuvent présenter, par rapport aux différents intervalles spécifiés, un écart supérieur à 10 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette ; au maximum 2 des 24 valeurs peuvent être inférieures de plus de 10 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette à la quantité spécifiée au temps final de l'essai ; aucune valeur ne présente, par rapport aux différents intervalles spécifiés, un écart supérieur à 20 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette ni n'est inférieure de plus de 20 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette à la quantité spécifiée au temps final de l'essai. |

Tableau 2.9.3.-3

| Niveau | Nombre d'unités examinées | Critères d'acceptation |
|---|---|---|
| $A_1$ | 6 | Aucune valeur individuelle ne dépasse un taux de dissolution de 10 pour cent. |
| $A_2$ | 6 | La moyenne des 12 unités ($A_1 + A_2$) ne dépasse pas un taux de dissolution de 10 pour cent et aucune unité individuelle ne dépasse un taux de dissolution de 25 pour cent. |
| $A_3$ | 12 | La moyenne des 24 unités ($A_1 + A_2 + A_3$) ne dépasse pas un taux de dissolution de 10 pour cent et aucune unité individuelle ne dépasse un taux de dissolution de 25 pour cent. |

Tableau 2.9.3.-4

| Niveau | Nombre d'unités examinées | Critères d'acceptation |
|---|---|---|
| $B_1$ | 6 | Aucune unité n'est inférieure à $Q$ + 5 pour cent. |
| $B_2$ | 6 | La moyenne des 12 unités ($B_1 + B_2$) est égale ou supérieure à $Q$ et aucune unité n'est inférieure à $Q$ – 15 pour cent. |
| $B_3$ | 12 | La moyenne des 24 unités ($B_1 + B_2 + B_3$) est égale ou supérieure à $Q$, au maximum 2 unités peuvent être inférieures à $Q$ – 15 pour cent et aucune unité n'est inférieure à $Q$ – 25 pour cent. |

*Des recommandations relatives à l'essai de dissolution sont données dans le chapitre général 5.17.1.*

**01/2008:20904**

# 2.9.4. ESSAI DE DISSOLUTION DES DISPOSITIFS TRANSDERMIQUES

Cet essai est destiné à déterminer la vitesse de dissolution des substances actives des dispositifs transdermiques.

## 1. MÉTHODE DE L'APPAREIL À DISQUE

**Appareillage**. Utilisez la palette et le récipient de l'appareil à palette décrit dans l'essai de dissolution des formes solides (*2.9.3*), avec en complément un disque formé d'un treillis d'acier inoxydable à mailles de 125 µm (voir figure 2.9.4.-1) destiné à maintenir le dispositif transdermique et conçu de façon à réduire au minimum le volume mort au fond du récipient. Le disque maintient le dispositif transdermique à plat, surface de libération vers le haut, et parallèle au bord inférieur de la palette. Pendant l'essai, la distance entre le bord inférieur de la palette et la surface du disque reste égale à 25 ± 2 mm (voir figure 2.9.4.-2). La température est maintenue à 32 ± 0,5 °C. Le récipient peut être couvert pour réduire l'évaporation.

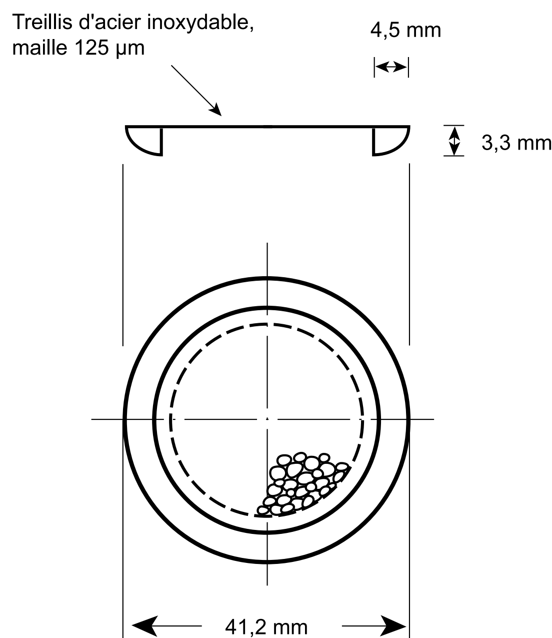



Figure 2.9.4.-1. – *Disque*

**Mode opératoire**. Introduisez dans le récipient le volume indiqué du milieu de dissolution prescrit, et équilibrez à la température spécifiée. Appliquez le dispositif transdermique sur le disque, de façon que la surface de libération soit aussi plane que possible. Le dispositif peut être fixé sur le disque au moyen d'un adhésif approprié ou d'un ruban adhésif double face. Quel que soit le système de fixation utilisé, vérifiez au préalable qu'il n'interfère pas dans le dosage ou n'adsorbe pas la (les) substance(s) active(s). Pressez le dispositif transdermique, surface de libération vers le haut, sur la face rendue adhésive du disque. Une fois le dispositif transdermique en place, sa surface ne doit pas dépasser celle du disque. Il est admis à cet effet, à condition que la préparation soit homogène et uniformément répartie sur le support externe, de mesurer la vitesse de dissolution sur un morceau du dispositif transdermique, découpé aux dimensions appropriées et précisément mesuré. Ceci peut également être nécessaire pour obtenir des conditions d'immersion adéquates, mais n'est pas autorisé dans le cas des dispositifs transdermiques du type « réservoir ». Placez le dispositif transdermique collé sur le disque à plat au fond du récipient, surface de libération vers le haut. Mettez immédiatement l'appareil en marche, à 100 tr/min, par exemple. A intervalles déterminés, effectuez un prélèvement dans une zone située à mi-distance entre la surface du milieu de dissolution et le bord supérieur de la palette, et à 1 cm au moins de la paroi du récipient.

Procédez au dosage sur chacun des échantillons prélevés, en compensant si nécessaire le volume prélevé. Répétez l'essai pour chaque dispositif.

## 2. MÉTHODE DE LA CELLULE

**Appareillage**. Utilisez la palette et le récipient de l'appareil décrits dans l'essai de dissolution des formes solides (*2.9.3*), avec en complément la cellule d'extraction (*cellule*).

La *cellule* est constituée d'un matériau chimiquement inerte et se compose d'un *support*, d'un *couvercle* et, si nécessaire, d'une *membrane* placée sur le dispositif à examiner pour l'isoler du milieu si celui-ci est susceptible de modifier ou d'altérer ses propriétés physicochimiques (voir figure 2.9.4.-3).

*Support.* Le support comporte dans sa partie centrale une cavité destinée à recevoir le dispositif transdermique. Cette cavité a une profondeur de 2,6 mm et un diamètre adapté aux dimensions du dispositif à examiner. Les diamètres suivants

peuvent être utilisés : 27 mm, 38 mm, 45 mm et 52 mm ; ils correspondent respectivement à un volume de 1,48 mL, 2,94 mL, 4,13 mL et 5,52 mL.

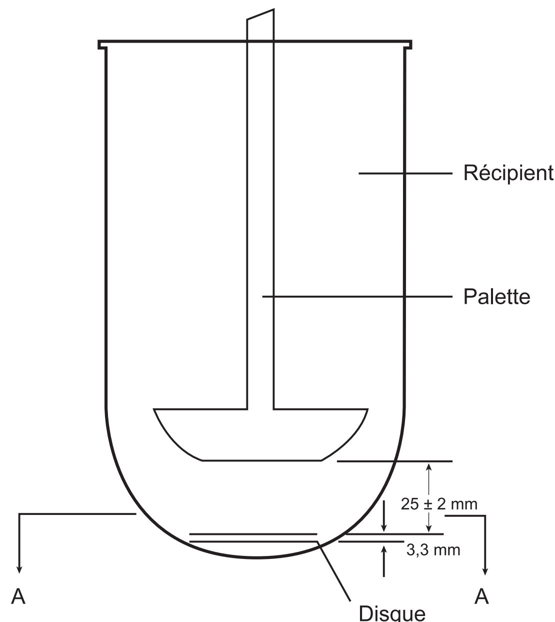



Figure 2.9.4.-2. – *Palette et disque*

*Couvercle*. Le couvercle comporte une ouverture centrale dont le diamètre est fonction des dimensions du dispositif à examiner, ce qui permet de centrer exactement le dispositif et de limiter la surface de diffusion. Les diamètres suivants peuvent être utilisés : 20 mm, 32 mm, 40 mm et 50 mm ; ils correspondent respectivement à une surface de 3,14 cm², 8,03 cm², 12,56 cm² et 19,63 cm². Le couvercle est maintenu en place par des écrous vissés sur des tiges fixées sur l'embase du support. L'étanchéité est assurée par un joint de caoutchouc installé sur l'embase du support.

*Cellule d'extraction*. La *cellule* maintient le dispositif à examiner à plat, surface de libération vers le haut, et parallèle au bord inférieur de la palette. Pendant l'essai, la distance entre le bord inférieur de la palette et la surface du disque reste égale à 25 ± 2 mm (voir figure 2.9.4.-4). La température est maintenue à 32 ± 0,5 °C . Le récipient peut être couvert pour réduire l'évaporation.

**Mode opératoire**. Introduisez dans le récipient le volume indiqué du milieu de dissolution prescrit, et équilibrez à la température spécifiée. Centrez exactement le dispositif dans la *cellule*, surface de libération vers le haut. Fermez la *cellule*, en appliquant éventuellement sur les bords plats une substance hydrophobe (vaseline par exemple) pour assurer l'étanchéité, et veillez à ce que le dispositif reste bien en place. Introduisez la *cellule* horizontalement dans le récipient, couvercle vers le haut. Mettez immédiatement l'appareil en marche, à 100 tr/min, par exemple. A intervalles déterminés, effectuez un prélèvement dans une zone située à mi-distance entre la surface du milieu de dissolution et le bord supérieur de la palette, et à 1 cm au moins de la paroi du récipient.

Procédez au dosage sur chacun des échantillons prélevés, en compensant si nécessaire le volume prélevé. Répétez l'essai pour chaque dispositif.

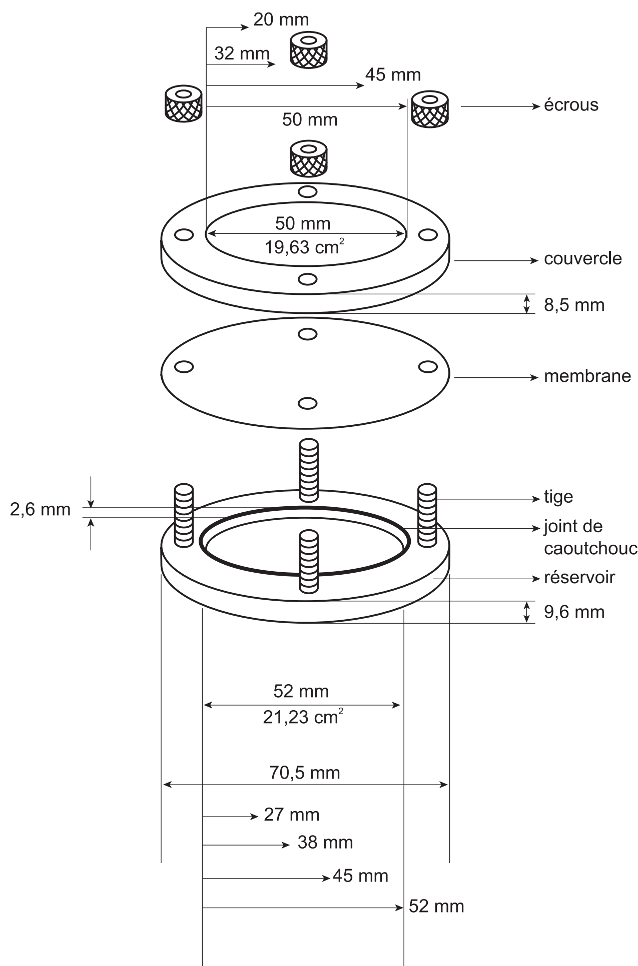



Figure 2.9.4.-3. – *Cellule d'extraction*

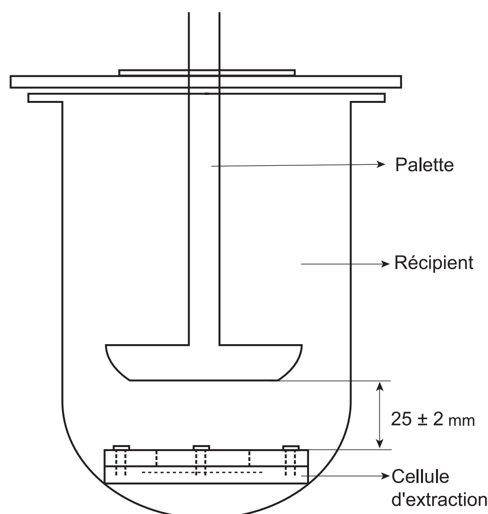



Figure 2.9.4.-4. – *Appareil à palette et cellule d'extraction*

3. MÉTHODE DU CYLINDRE ROTATIF

**Appareillage**. Utilisez l'appareil à palette décrit dans l'essai de dissolution des formes solides (*2.9.3*), en remplaçant la palette et la tige par un agitateur cylindrique d'acier inoxydable (*cylindre*) (voir figure 2.9.4.-5). Chaque dispositif est placé sur le *cylindre* en début de détermination. Pendant l'essai, la distance entre le fond du récipient et le *cylindre* reste égale à 25 ± 2 mm. La température est maintenue à 32 ± 0,5 °C. Le récipient est couvert pour réduire l'évaporation.

**Mode opératoire**. Introduisez dans le récipient le volume indiqué du milieu de dissolution prescrit et équilibrez à la température spécifiée. Retirez le film protecteur du dispositif

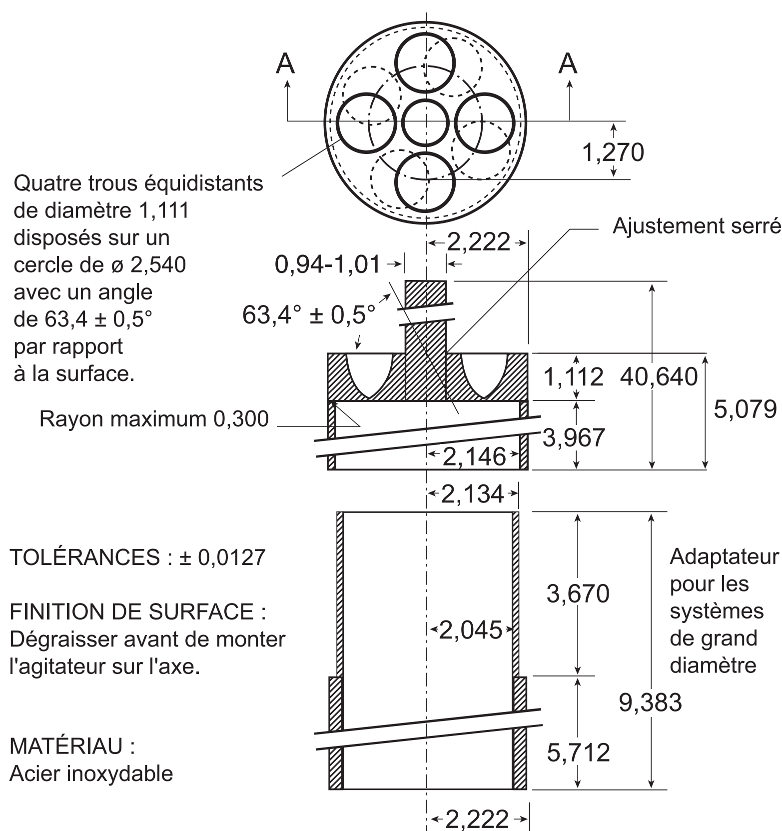



Figure 2.9.4.-5. – *Agitateur cylindrique*

*Dimensions en centimètres*

et appliquez la face adhésive sur une membrane poreuse inerte appropriée, de dimensions supérieures de 1 cm au moins à celles du dispositif. Placez l'ensemble sur une surface propre, la membrane se trouvant au contact de cette surface. Deux systèmes de fixation sur le *cylindre* peuvent être utilisés :

- appliquez un adhésif approprié sur les bords de la membrane et, si besoin est, au dos du dispositif,
- appliquez un ruban adhésif double face sur la paroi extérieure du *cylindre*.

Appliquez avec précaution la face externe du dispositif (face naturellement non adhésive) sur le *cylindre*, en pressant doucement, de sorte que la surface de libération soit au contact du milieu de dissolution et que l'axe longitudinal du dispositif fasse le tour du *cylindre*.

Quel que soit le système de fixation utilisé, vérifiez au préalable qu'il n'interfère pas dans le dosage et n'adsorbe pas la (les) substance(s) active(s).

Installez le *cylindre* dans l'appareil et mettez immédiatement l'appareil en marche à 100 tr/min, par exemple. A intervalles déterminés, effectuez un prélèvement dans une zone située à mi-distance entre la surface du milieu de dissolution et le bord supérieur du *cylindre*, et à 1 cm au moins de la paroi du récipient.

Procédez au dosage sur chacun des échantillons prélevés, comme indiqué dans la monographie particulière, en compensant si nécessaire le volume prélevé. Répétez l'essai pour chaque dispositif.

**Interprétation**. Le dispositif transdermique satisfait à l'essai si la quantité de substance(s) active(s) passée en solution, exprimée par la quantité par surface et par unité de temps, est comprise dans les limites prescrites aux temps de prélèvement définis.

**01/2008:20905**

## 2.9.5. UNIFORMITÉ DE MASSE DES PRÉPARATIONS UNIDOSES

Pesez individuellement 20 unités ou, pour les préparations unidoses présentées en récipients individuels, le contenu de 20 unités prélevées au hasard et déterminez la masse moyenne. La masse individuelle de 2 au plus des 20 unités peut s'écarter de la masse moyenne d'un pourcentage plus élevé que celui qui est indiqué dans le tableau 2.9.5.-1, mais la masse d'aucune unité ne peut s'écarter de plus du double de ce pourcentage.

Dans le cas des capsules et des poudres pour administration parentérale, opérez comme suit.

### CAPSULES

Pesez une capsule pleine. Sans perdre de fragments de l'enveloppe, ouvrez la capsule et videz-la aussi complètement que possible. Dans le cas des capsules à enveloppe molle, lavez l'enveloppe avec un solvant approprié et laissez reposer jusqu'à disparition de l'odeur du solvant. Pesez l'enveloppe et calculez la masse du contenu par différence. Répétez l'opération sur 19 autres capsules.

### POUDRES POUR ADMINISTRATION PARENTÉRALE

S'il y a lieu, privez le récipient de son étiquette, lavez-le, séchez-le et ouvrez-le. Pesez immédiatement le récipient et son contenu. Videz le récipient aussi complètement que possible en le tapotant doucement et, si nécessaire, rincez le flacon à l'*eau R*, puis à l'*alcool R*. Séchez à 100-105 °C pendant 1 h ou, si le matériau utilisé ne supporte pas cette température, séchez à une température inférieure jusqu'à masse constante. Refroidissez dans un dessiccateur, puis pesez. Calculez la masse du contenu par différence. Répétez l'opération sur 19 autres récipients.

Tableau 2.9.5.-1

| Forme pharmaceutique | Masse moyenne | Ecarts limites en pourcentage de la masse moyenne |
|---|---|---|
| Comprimés non enrobés et comprimés pelliculés | 80 mg ou moins | 10 |
| | plus de 80 mg et moins de 250 mg | 7,5 |
| | 250 mg ou plus | 5 |
| Capsules, granulés non enrobés et poudres (en unidoses) | moins de 300 mg | 10 |
| | 300 mg ou plus | 7,5 |
| Poudres pour administration parentérale (en unidoses)* | plus de 40 mg | 10 |
| Suppositoires et ovules | sans distinction de masse | 5 |
| Poudres pour collyres et poudres pour solutions pour lavage ophtalmique (en unidoses) | moins de 300 mg | 10 |
| | 300 mg ou plus | 7,5 |

* Lorsque la masse moyenne est égale ou inférieure à 40 mg, la préparation n'est pas soumise à l'essai d'uniformité de masse, mais à l'essai d'uniformité de teneur des préparations unidoses (*2.9.6*).

**01/2008:20906**

## 2.9.6. UNIFORMITÉ DE TENEUR DES PRÉPARATIONS UNIDOSES

L'essai d'uniformité de teneur des préparations unidoses est basé sur la détermination de la teneur individuelle en substance(s) active(s) des unités composant l'échantillon, permettant de vérifier que les teneurs individuelles en substance active se trouvent dans les limites établies par rapport à la teneur moyenne de l'échantillon.

L'essai n'est pas exigé pour les préparations de polyvitamines et d'oligo-éléments et dans d'autres cas justifiés et autorisés.

*Mode opératoire.* Prélevez au hasard 10 unités de la préparation à examiner et dosez individuellement la (ou les) substance(s) active(s) dans chacune d'elles au moyen d'une méthode analytique appropriée.

Utilisez les critères d'évaluation de l'essai A, de l'essai B ou de l'essai C selon les spécifications de la monographie de la forme pharmaceutique considérée.

ESSAI A

*Dans le cas des comprimés, des poudres pour administration parentérale, des inserts ophtalmiques et des suspensions injectables,* la préparation satisfait à l'essai si la teneur individuelle de chaque unité est comprise entre 85 pour cent et 115 pour cent de la teneur moyenne. Elle ne satisfait pas à l'essai si la teneur individuelle de plus d'une unité n'est pas comprise entre ces limites ou si la teneur individuelle d'une unité se situe en dehors des limites de 75 pour cent à 125 pour cent de la teneur moyenne.

Si la teneur individuelle d'une seule unité n'est pas comprise entre 85 pour cent et 115 pour cent mais qu'elle est comprise entre 75 pour cent et 125 pour cent de la teneur moyenne, prélevez au hasard 20 autres unités et dosez individuellement la (ou les) substance(s) active(s) dans chacune d'elles. La préparation satisfait à l'essai si la teneur individuelle d'une unité au plus dans les 30 unités se situe en dehors des limites de 85 pour cent à 115 pour cent de la teneur moyenne et si aucune d'entre elles ne se situe en dehors des limites de 75 pour cent à 125 pour cent de la teneur moyenne.

ESSAI B

*Dans le cas des capsules, des poudres, autres que celles pour administration parentérale, des granulés, des suppositoires et des ovules,* la préparation satisfait à l'essai si la teneur individuelle d'une unité au plus se situe en dehors des limites de 85 pour cent à 115 pour cent de la teneur moyenne et si elle ne se situe pas en dehors des limites de 75 pour cent à 125 pour cent de la teneur moyenne. La préparation ne satisfait pas à l'essai si la teneur individuelle de plus de 3 unités se situe en dehors des limites de 85 pour cent à 115 pour cent de la teneur moyenne, ou si la teneur individuelle d'une ou de plusieurs unité(s) se situe en dehors des limites de 75 pour cent à 125 pour cent de la teneur moyenne.

Si la teneur individuelle de 2 ou de 3 unités au plus s'écarte des limites de 85 pour cent à 115 pour cent de la teneur moyenne et si aucune teneur individuelle ne se situe en dehors des limites de 75 pour cent à 125 pour cent de la teneur moyenne, prélevez au hasard 20 autres unités et dosez individuellement la (ou les) substance(s) active(s) dans chacune d'elles. La préparation satisfait à l'essai si les teneurs individuelles de 3 unités au plus dans les 30 unités se situent en dehors des limites de 85 pour cent à 115 pour cent de la teneur moyenne et si aucune d'entre elles ne se situe en dehors des limites de 75 pour cent à 125 pour cent de la teneur moyenne.

ESSAI C

*Dans le cas des dispositifs transdermiques,* la préparation satisfait à l'essai si la teneur moyenne de 10 unités de la préparation est comprise entre 90 pour cent et 110 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette et si la teneur individuelle de chaque unité est comprise entre 75 pour cent et 125 pour cent de la teneur moyenne.

**01/2010:20907**

## 2.9.7. FRIABILITÉ DES COMPRIMÉS NON ENROBÉS(5)

Ce chapitre fournit des indications sur la détermination de la friabilité des comprimés non enrobés obtenus par compression. La procédure d'essai décrite dans ce chapitre est généralement applicable à la plupart des comprimés obtenus par compression. La mesure de la friabilité complète d'autres mesures de résistance mécanique, par exemple celle de la résistance à la rupture.

Utilisez un tambour d'un diamètre intérieur de 283-291 mm et d'une profondeur de 36-40 mm, en polymère synthétique transparent à surfaces intérieures polies, et produisant le moins possible d'électricité statique (voir figure 2.9.7.-1). L'une des faces du tambour est amovible. A chaque rotation, les comprimés sont projetés du centre du tambour vers la paroi extérieure, par une pale curviligne de rayon intérieur de 75,5-85,5 mm. Le diamètre extérieur de l'anneau central est de 24,5-25,5 mm. Le tambour est monté sur l'axe horizontal d'un dispositif d'entraînement dont la vitesse de rotation est de 25 ± 1 tr/min. Par conséquent, à chaque rotation, les comprimés roulent ou glissent et tombent sur la paroi ou les uns sur les autres.

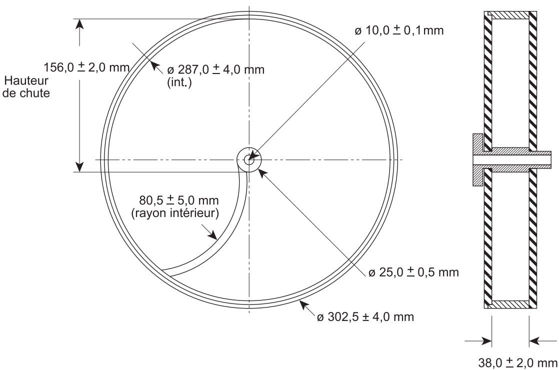



Figure 2.9.7.-1. – *Appareil de détermination de la friabilité des comprimés*

(5) Ce chapitre a fait l'objet du processus d'harmonisation des pharmacopées. Voir chapitre *5.8. Harmonisation des pharmacopées.*

Dans le cas de comprimés de masse unitaire inférieure ou égale à 650 mg, prélevez un nombre de comprimés entiers correspondant d'aussi près que possible à une masse de 6,5 g. Dans le cas de comprimés de masse unitaire supérieure à 650 mg, prélevez un échantillon de 10 comprimés entiers. Les comprimés doivent être soigneusement dépoussiérés avant l'essai. Pesez exactement l'échantillon et placez les comprimés dans le tambour. Procédez à 100 rotations, puis sortez les comprimés du tambour, éliminez les poussières libres comme précédemment et pesez à nouveau exactement.

En règle générale, l'essai est effectué sans répétition. Si, au terme du cycle de rotations, l'échantillon comporte des comprimés visiblement fêlés, fissurés ou cassés, il ne satisfait pas à l'essai. Si les résultats sont difficiles à interpréter ou si la perte de masse est supérieure à la valeur cible, répétez l'essai à 2 reprises et calculez la moyenne des 3 résultats. Pour la plupart des produits, la perte de masse maximale (résultant d'un seul essai ou de la moyenne de 3 essais) considérée comme acceptable est de 1,0 pour cent.

En cas d'irrégularité du mouvement due à la taille ou à la forme des comprimés, ajustez la position du tambour en l'inclinant de telle sorte que la base forme avec l'horizontale un angle d'environ 10°, pour éviter l'agglutination des comprimés en position de repos, qui les empêche de tomber librement.

Les comprimés effervescents et les comprimés à croquer peuvent faire l'objet de spécifications particulières en matière de friabilité. Pour les comprimés hygroscopiques, l'essai doit être réalisé sous atmosphère contrôlée en humidité.

L'emploi d'appareils à double pales, ou d'appareils comprenant plusieurs tambours, pour l'évaluation simultanée de plusieurs échantillons, est également autorisée.

**01/2008:20908**

## 2.9.8. RÉSISTANCE À LA RUPTURE DES COMPRIMÉS

Cet essai est destiné à déterminer, dans des conditions définies, la résistance à la rupture des comprimés, mesurée par la force nécessaire pour provoquer leur rupture par écrasement.

APPAREILLAGE

L'appareil est constitué de 2 mâchoires se faisant face, l'une se déplaçant vers l'autre. La surface plane des mâchoires est perpendiculaire au sens du déplacement. La surface d'écrasement des mâchoires est plane et plus grande que la zone de contact avec le comprimé. L'appareil est étalonné à l'aide d'un système précis à 1 newton près.

MODE OPÉRATOIRE

Placez le comprimé entre les mâchoires en tenant compte, le cas échéant, de sa forme, de la barre de cassure et de la gravure ; pour chaque détermination, orientez le comprimé de la même façon par rapport à la direction d'application de la force. Effectuez la mesure sur 10 comprimés, en prenant soin d'éliminer tout débris de comprimés avant chaque détermination.

*Ce procédé ne s'applique pas lorsqu'un appareil entièrement automatisé est utilisé.*

EXPRESSION DES RÉSULTATS

Exprimez les résultats en donnant la valeur moyenne, les valeurs minimales et maximales des forces mesurées, toutes exprimées en newtons.

Indiquez le type d'appareil et, le cas échéant, l'orientation des comprimés.

**07/2008:20909**

## 2.9.9. MESURE DE LA CONSISTANCE PAR PÉNÉTROMÉTRIE

Cet essai est destiné à mesurer, dans des conditions déterminées et validées, la pénétration d'un mobile dans le produit à examiner contenu dans un récipient de dimensions et forme définies.

APPAREILLAGE

L'appareillage se compose d'un pénétromètre, comprenant un support et un mobile. La figure 2.9.9.-1 représente un exemple d'appareil approprié.

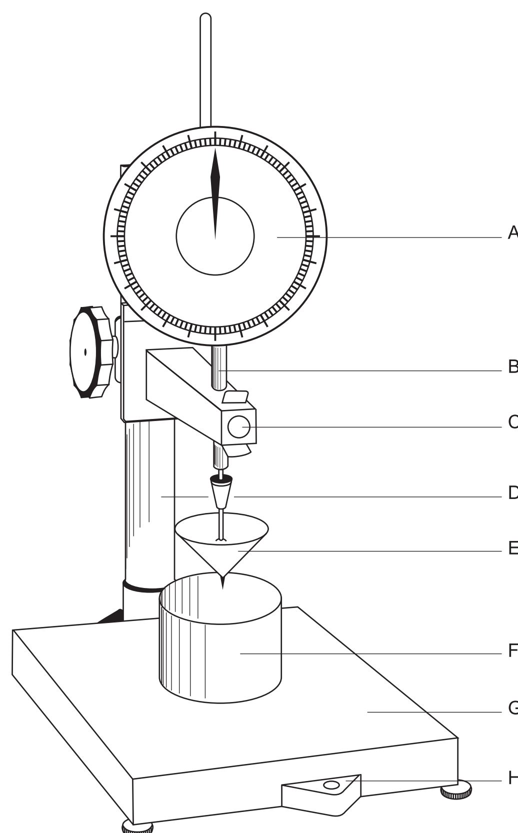



Figure 2.9.9.-1. – *Pénétromètre*

A. Echelle, graduée en dixième de millimètres, indiquant la profondeur de pénétration.
B. Axe vertical servant à maintenir et à guider le mobile.
C. Dispositif de blocage et de libération du mobile, à déclenchement automatique et de durée programmée.
D. Dispositif permettant d'assurer la verticalité du mobile et l'horizontalité de la tablette-support.
E. Mobile (voir figures 2.9.9.-2 et 2.9.9.-3).
F. Récipient.
G. Tablette-support.
H. Réglage de l'horizontalité de la tablette.

Le support comprend :

– une tige verticale pour le maintien et le guidage du mobile,
– une tablette-support horizontale,
– un dispositif permettant d'assurer la verticalité du mobile,
– un dispositif permettant de vérifier que la tablette-support est horizontale,
– un dispositif de blocage et de libération du mobile,
– une échelle, graduée en dixièmes de millimètres, indiquant la profondeur de pénétration.

Le mobile, constitué d'un matériau approprié, a une surface lisse et est caractérisé par sa forme, ses dimensions et sa masse ($m$).

2. Méthodes analytiques

Les figures 2.9.9.-2 et 2.9.9.-3 représentent des exemples de mobiles appropriés.

MODE OPÉRATOIRE

Préparez les échantillons à examiner selon l'une des méthodes suivantes.

A. Remplissez complètement 3 récipients, avec précaution, en veillant à éviter la formation de bulles d'air. Arasez, si nécessaire, pour obtenir une surface plane. Conservez à 25 ± 0,5 °C pendant 24 h, sauf indication contraire.

B. Conservez 3 échantillons à examiner à 25 ± 0,5 °C pendant 24 h, sauf indication contraire. Soumettez les échantillons à une force de cisaillement appropriée pendant 5 min. Remplissez complètement 3 récipients, avec précaution, en veillant à éviter la formation de bulles d'air. Arasez, si nécessaire, pour obtenir une surface plane.

C. Faites fondre 3 échantillons à examiner puis remplissez complètement 3 récipients, avec précaution, en veillant à éviter la formation de bulles d'air. Conservez à 25 ± 0,5 °C pendant 24 h, sauf indication contraire.

**Détermination de la profondeur de pénétration**. Placez l'échantillon à examiner sur la tablette-support du pénétromètre. Vérifiez que sa surface est perpendiculaire à l'axe vertical du mobile. Amenez la température du mobile à 25 ± 0,5 °C. Ajustez la hauteur du mobile de façon que sa pointe effleure la surface de l'échantillon. Libérez le mobile pendant 5 s, fixez-le à nouveau et mesurez la profondeur de pénétration. Répétez l'essai avec les 2 récipients restants.

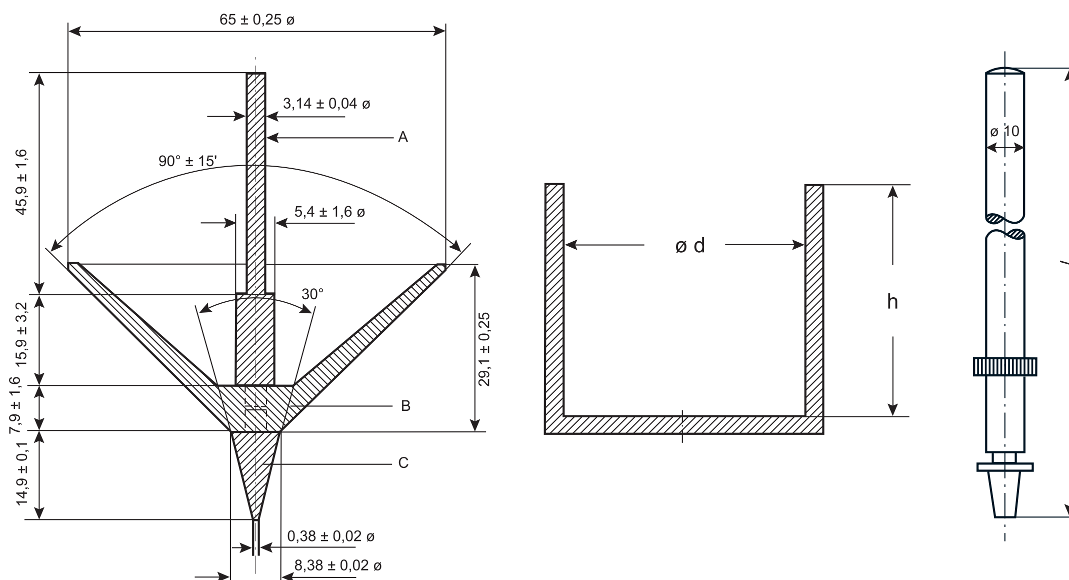



Figure 2.9.9.-2. – *Mobile conique (m = 102,5 ± 0,05 g), avec récipient (d = 102 mm ou 75 mm, h ≥ 62 mm) et tige (l = 162 mm ; m = 47,5 ± 0,05 g) appropriés*

*Dimensions en millimètres*

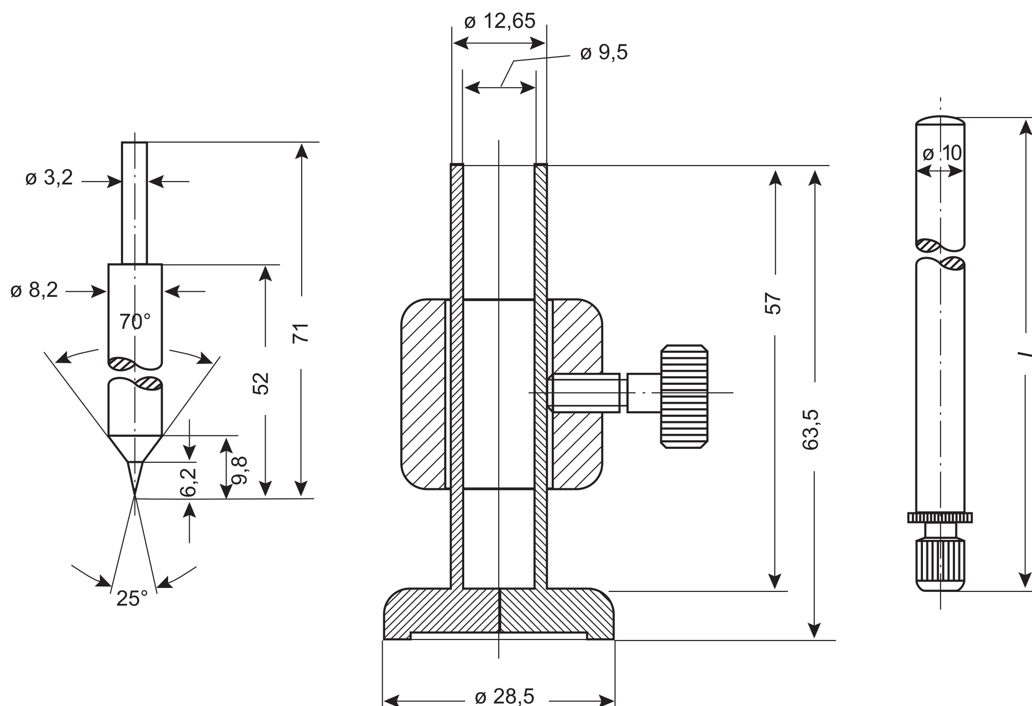



Figure 2.9.9.-3. – *Micro-mobile conique (m = 7,0 g), avec récipient et tige appropriés (l = 116 mm ; m = 16,8 g)*

*Dimensions en millimètres*

EXPRESSION DES RÉSULTATS

La profondeur de pénétration est exprimée en dixièmes de millimètres par la moyenne arithmétique des 3 résultats de mesure. Si certains des résultats s'écartent de la moyenne de plus de 3 pour cent, répétez l'essai et exprimez les résultats en indiquant la moyenne des 6 déterminations et l'écart type relatif.

**01/2008:20910**

## 2.9.10. TENEUR EN ÉTHANOL ET TABLEAUX ALCOOMÉTRIQUES

Les préparations liquides pharmaceutiques contenant de l'éthanol et auxquelles s'applique seulement la présente méthode, contiennent aussi des substances dissoutes qu'il est nécessaire de séparer par distillation de l'éthanol à doser. Quand cette distillation entraîne des substances volatiles, autres que l'éthanol et l'eau, les précautions éventuelles à prendre sont indiquées dans la monographie.

La teneur en éthanol d'un liquide est exprimée par le nombre de volumes d'éthanol mesurés à 20 ± 0,1 °C, contenus dans 100 volumes de ce liquide. Ce nombre donne le « titre alcoométrique volumique » exprimé en pourcentage : « pour cent *V/V* ». Cette teneur peut également être exprimée en grammes d'éthanol pour 100 g de liquide. Ce nombre donne le « titre alcoométrique massique : pour cent *m/m* ».

La relation entre la masse volumique à 20 ± 0,1 °C, la densité (ramenée au vide) et le titre alcoométrique d'un mélange d'eau et d'éthanol est donnée dans les Tables alcoométriques de l'Organisation Internationale de Métrologie Légale, 1972, Recommandation internationale nº 22.

**Appareil**. L'appareil (voir figure 2.9.10.-1) est constitué par un ballon (*A*) à fond rond surmonté d'une allonge (*B*) à piège reliée à un réfrigérant (*C*) maintenu verticalement. Celui-ci est muni à sa partie inférieure d'un tube (*D*) amenant le distillat dans la partie renflée d'un ballon jaugé de 100 mL ou de 250 mL. Ce ballon plonge dans un mélange d'eau et de glace (*E*) pendant la distillation. Un disque percé d'une ouverture circulaire d'un diamètre de 6 cm placé sous le ballon (*A*), permet d'éviter sur les parois de celui-ci une éventuelle pyrogénation de matières dissoutes.

**Mode opératoire**

*Par pycnométrie*. Dans le ballon à distiller, introduisez 25,0 mL de la préparation à examiner mesurés à 20 ± 0,1 °C ; ajoutez 100 mL à 150 mL d'*eau distillée R* et une petite quantité de pierre ponce. Adaptez l'allonge et le réfrigérant, distillez et recueillez au moins 90 mL du distillat dans un ballon jaugé de 100 mL. Amenez la température du distillat à 20 ± 0,1 °C et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau distillée R* à 20 ± 0,1 °C. Déterminez à 20 ± 0,1 °C la densité à l'aide d'un pycnomètre.

Les valeurs indiquées dans le tableau 2.9.10.-1, à la colonne 3, sont multipliées par 4 pour obtenir le pourcentage *V/V* d'éthanol contenu dans la préparation. Après calcul de la teneur en éthanol à l'aide du tableau 2.9.10.-1, arrondissez le résultat à une décimale.

*Par aréométrie*. Dans le ballon à distiller, introduisez 50,0 mL de la préparation à examiner mesurés à 20 ± 0,1 °C et ajoutez 200 mL à 300 mL d'*eau distillée R*. Procédez à la distillation comme précédemment et recueillez au moins 180 mL de distillat dans un ballon jaugé. Amenez la température à 20 ± 0,1 °C et complétez à 250,0 mL avec de l'*eau distillée R* à 20 ± 0,1 °C.

Transvasez le distillat dans une éprouvette dont le diamètre est 6 mm au moins plus large que le bulbe de l'aréomètre.

Si le volume est insuffisant pour la détermination, doublez la prise d'essai et diluez le distillat à 500 mL avec de l'*eau distillée R* à 20 ± 0,1 °C.

Multipliez par 5 la teneur pour tenir compte de la dilution au cours de l'opération. Après calcul de la teneur en éthanol à l'aide du tableau 2.9.10.-1, arrondissez le résultat à une décimale.

Tableau 2.9.10.-1. – *Relation entre la masse volumique, la densité et la teneur en éthanol*

| $\rho_{20}$ ($kg \cdot m^{-3}$) | Densité du distillat mesurée à l'air $d_{20}^{20}$ | Teneur en éthanol pour cent *V/V* à 20 °C |
|---|---|---|
| 968,0 | 0,9697 | 25,09 |
| 968,5 | 0,9702 | 24,64 |
| 969,0 | 0,9707 | 24,19 |
| 969,5 | 0,9712 | 23,74 |
| 970,0 | 0,9717 | 23,29 |
| 970,5 | 0,9722 | 22,83 |
| 971,0 | 0,9727 | 22,37 |
| 971,5 | 0,9733 | 21,91 |
| 972,0 | 0,9738 | 21,45 |
| 972,5 | 0,9743 | 20,98 |
| 973,0 | 0,9748 | 20,52 |
| 973,5 | 0,9753 | 20,05 |
| 974,0 | 0,9758 | 19,59 |
| 974,5 | 0,9763 | 19,12 |
| 975,0 | 0,9768 | 18,66 |
| 975,5 | 0,9773 | 18,19 |
| 976,0 | 0,9778 | 17,73 |
| 976,5 | 0,9783 | 17,25 |
| 977,0 | 0,9788 | 16,80 |
| 977,5 | 0,9793 | 16,34 |
| 978,0 | 0,9798 | 15,88 |
| 978,5 | 0,9803 | 15,43 |
| 979,0 | 0,9808 | 14,97 |
| 979,5 | 0,9813 | 14,52 |
| 980,0 | 0,9818 | 14,07 |
| 980,5 | 0,9823 | 13,63 |
| 981,0 | 0,9828 | 13,18 |
| 981,5 | 0,9833 | 12,74 |
| 982,0 | 0,9838 | 12,31 |
| 982,5 | 0,9843 | 11,87 |
| 983,0 | 0,9848 | 11,44 |
| 983,5 | 0,9853 | 11,02 |
| 984,0 | 0,9858 | 10,60 |
| 984,5 | 0,9863 | 10,18 |
| 985,0 | 0,9868 | 9,76 |
| 985,5 | 0,9873 | 9,35 |
| 986,0 | 0,9878 | 8,94 |
| 986,5 | 0,9883 | 8,53 |
| 987,0 | 0,9888 | 8,13 |
| 987,5 | 0,9893 | 7,73 |
| 988,0 | 0,9898 | 7,34 |
| 988,5 | 0,9903 | 6,95 |
| 989,0 | 0,9908 | 6,56 |
| 989,5 | 0,9913 | 6,17 |

| $\rho_{20}$ ($kg \cdot m^{-3}$) | Densité du distillat mesurée à l'air $d_{20}^{20}$ | Teneur en éthanol pour cent *V/V* à 20 °C |
|---|---|---|
| 990,0 | 0,9918 | 5,79 |
| 990,5 | 0,9923 | 5,42 |
| 991,0 | 0,9928 | 5,04 |
| 991,5 | 0,9933 | 4,67 |
| 992,0 | 0,9938 | 4,30 |
| 992,5 | 0,9943 | 3,94 |
| 993,0 | 0,9948 | 3,58 |
| 993,5 | 0,9953 | 3,22 |
| 994,0 | 0,9958 | 2,86 |
| 994,5 | 0,9963 | 2,51 |
| 995,0 | 0,9968 | 2,16 |
| 995,5 | 0,9973 | 1,82 |
| 996,0 | 0,9978 | 1,47 |
| 996,5 | 0,9983 | 1,13 |
| 997,0 | 0,9988 | 0,80 |
| 997,5 | 0,9993 | 0,46 |
| 998,0 | 0,9998 | 0,13 |

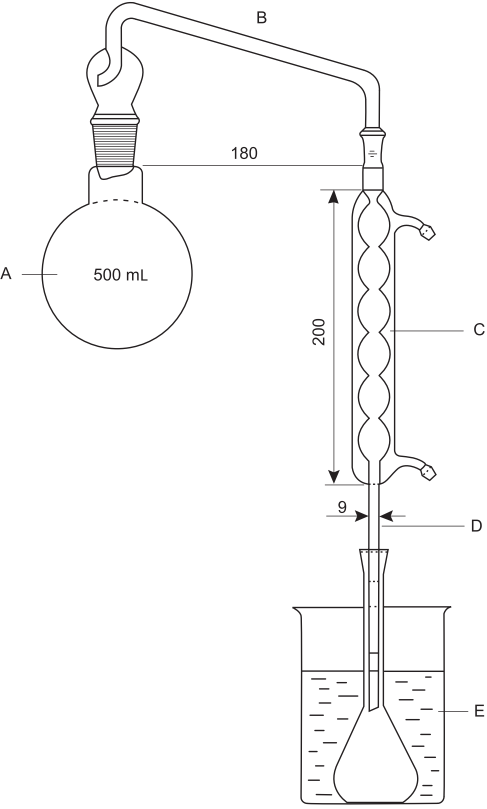



Figure 2.9.10.-1. – *Appareil pour déterminer la teneur en éthanol*
*Dimensions en millimètres*

**01/2008:20911**

## 2.9.11. RECHERCHE DU MÉTHANOL ET DU 2-PROPANOL

Opérez par chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*).

*Solution d'étalon interne.* Préparez une solution contenant 2,5 pour cent *V/V* de *propanol R* dans l'*éthanol R1*.

*Solution à examiner (a).* A un certain volume du distillat, ajoutez 2,0 mL de solution d'étalon interne. Ajustez la teneur en éthanol (*2.9.10*) à 10,0 pour cent *V/V* en complétant à 50 mL avec de l'*eau R* ou en ajoutant de l'*éthanol R1* .

*Solution à examiner (b).* Ajustez la teneur en éthanol (*2.9.10*) d'un certain volume du distillat à 10,0 pour cent *V/V* en complétant à 50 mL avec de l'*eau R* ou en ajoutant de l'*éthanol R1*.

*Solution témoin (a).* Préparez 50 mL d'une solution contenant 2,0 mL de solution d'étalon interne, 3,0 mL d'*éthanol R1*, 0,05 pour cent *V/V* de *2-propanol R* et du *méthanol anhydre R* en quantité suffisante pour obtenir au total 0,05 pour cent *V/V* de méthanol compte tenu de la teneur en méthanol de l'*éthanol R1*.

*Solution témoin (b).* Préparez une solution d'*éthanol R1* à 10,0 pour cent *V/V* contenant 0,0025 pour cent *V/V* de *méthanol R* et 0,0025 pour cent *V/V* de *2-propanol R*.

*Colonne* :
- *matériau* : silice fondue,
- *dimensions* : $l$ = 30 m, Ø = 0,53 mm,
- *phase stationnaire* : *poly[(cyanopropyl)(phényl)][diméthyl]siloxane R* (épaisseur du film 3 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 2 mL/min.

*Rapport de division* : 1:10.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 5 | 35 |
| | 5 - 15 | 35 - 85 |
| Chambre à injection | | 250 |
| Détecteur | | 250 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1,0 µL.

*Conformité du système* :
- *propanol* : aucun pic ne correspond au propanol dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b),
- *rapport pic/vallée* : au minimum 15, avec $H_p$ = hauteur au-dessus de la ligne de base du pic dû au 2-propanol et $H_v$ = hauteur au-dessus de la ligne de base du point le plus bas du tracé entre ce pic et celui dû à l'éthanol dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),
- *rapport signal/bruit* : au minimum 10 pour les pics dus au méthanol et au 2-propanol dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b).

Les teneurs en méthanol et en 2-propanol sont calculées par rapport à l'échantillon initial.

**01/2008:20912**

## 2.9.12. CLASSIFICATION GRANULOMÉTRIQUE DES POUDRES PAR TAMISAGE

Le degré de finesse d'une poudre peut être exprimé par rapport aux tamis qui sont conformes aux spécifications des tamis non analytiques (*2.1.4*).

Lorsque le degré de finesse des poudres est déterminé par tamisage, il est défini en fonction du ou des nombres du ou des tamis utilisé(s) soit en utilisant la classification suivante ou, lorsque cette classification ne peut être appliquée, en exprimant la finesse de la poudre en pourcentage *m/m* qui passe à travers le(s) tamis utilisé(s).

Les terminologies suivantes sont utilisées pour définir les poudres :

**Poudre grossière**. Poudre dont au minimum 95 pour cent en masse des particules passent à travers un tamis numéro 1400 et dont au maximum 40 pour cent en masse passent à travers un tamis numéro 355.

**Poudre modérément fine**. Poudre dont au minimum 95 pour cent en masse des particules passent à travers un tamis numéro 355 et dont au maximum 40 pour cent en masse passent à travers un tamis numéro 180.

**Poudre fine**. Poudre dont au minimum 95 pour cent en masse des particules passent à travers un tamis numéro 180 et dont au maximum 40 pour cent en masse passent à travers un tamis numéro 125.

**Poudre très fine**. Poudre dont au minimum 95 pour cent en masse des particules passent à travers un tamis numéro 125 et au maximum de 40 pour cent en masse passent à travers un tamis numéro 90.

Lorsque la poudre est caractérisée par un numéro de tamis, le tamis avec ce numéro laisse passer au minimum 97 pour cent de la poudre, sauf indication contraire.

Assemblez les tamis et opérez d'une manière appropriée jusqu'à ce que le tamisage soit pratiquement achevé. Pesez les fractions séparées de poudres.

**01/2008:20914**

# 2.9.14. SURFACE SPÉCIFIQUE PAR PERMÉABILITÉ À L'AIR

Cet essai est destiné à déterminer la surface spécifique, exprimée en $m^2/g$, de poudres sèches dont la finesse est inférieure à la plus petite ouverture des mailles du tamis. L'effet produit par le flux des molécules (glissement), qui peut être important dans l'analyse de poudres d'une granulométrie inférieure à quelques micromètres, n'est pas pris en compte dans l'équation permettant de calculer la surface spécifique.

## APPAREIL

L'appareil se compose des éléments suivants.

(a) Une *cellule de perméabilité* (figure 2.9.14.-1) constituée d'un tube cylindrique (*A*), de verre ou de métal inaltérable, d'un diamètre intérieur de 12,6 ± 0,1 mm. Ce tube comporte, à son extrémité inférieure, un raccord (adaptateur par exemple) assurant une connexion étanche avec un manomètre (figure 2.9.14.-2) et, à 50 ± 15 mm de son extrémité supérieure, une butée d'une largeur de 0,5 à 1 mm. Cette butée fait partie intégrante du tube, ou est fixée de façon solide pour être étanche ; elle supporte un disque perforé (*B*) de métal inaltérable, d'une épaisseur de 0,9 ± 0,1 mm, percé de 30 à 40 trous d'un diamètre de 1 mm uniformément répartis.

Le piston (*C*), constitué de métal inaltérable, se meut à l'intérieur du tube avec un jeu latéral ne dépassant pas 0,1 mm. Sa base forme un plan à bords vifs perpendiculaire à l'axe principal. Sur l'un de ses côtés, une gorge d'une longueur de 3 mm et d'une profondeur de 0,3 mm permet le passage de l'air. Son extrémité supérieure forme un collier de telle sorte que, une fois le piston en place et le collier au contact du bord supérieur du tube, la distance entre la base du piston et la surface du disque perforé (*B*) soit de 15 ± 1 mm.

Le disque de papier filtre (*D*), à bord lisse, a un diamètre égal au diamètre intérieur du tube.

(b) Un *manomètre* en U (*E*) (figure 2.9.14.-2) d'un diamètre extérieur nominal de 9 mm et d'un diamètre intérieur de 7 mm, constitué d'un tube de verre à parois standards. L'une des branches comporte à son extrémité supérieure un raccord (*F*) assurant une connexion étanche avec la cellule de perméabilité ; elle porte, au-dessous d'une tubulure latérale, un repère circulaire gravé (*G*), à 125-145 mm du bord supérieur de la tubulure latérale et les 3 autres repères à 15 mm, 70 mm et 110 mm respectivement, au-dessus du premier. La tubulure latérale, située à 250-305 mm de la base du manomètre, sert à évacuer l'air de la branche raccordée à la cellule de perméabilité ; elle comporte un robinet à une distance de 50 mm au maximum de la branche du manomètre.

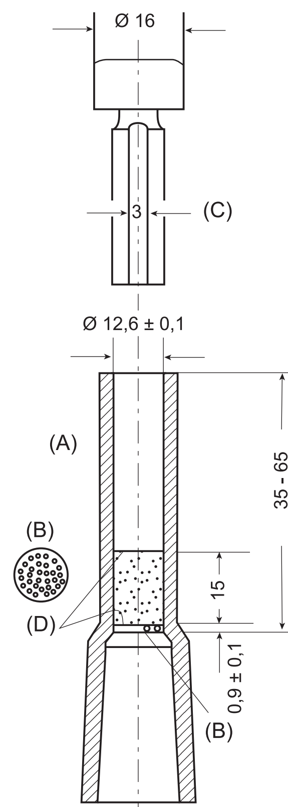



Figure 2.9.14.-1. – *Cellule de perméabilité*

*Dimensions en millimètres*

Le manomètre est fixé solidement de façon à assurer la verticalité des branches. Il est rempli jusqu'au repère inférieur de *phtalate de dibutyle R* additionné d'un colorant lipophile.

## MODE OPÉRATOIRE

Si les opérations suivantes sont prescrites, desséchez la poudre à examiner et faites-la passer à travers un tamis approprié (125 par exemple) pour disperser les particules agglomérées. Calculez la masse (*M*) de poudre à utiliser à l'aide de l'expression :

$$M = V \times \rho \times (1 - \varepsilon) \quad (1)$$

$V$ = volume apparent du lit de poudre compressé,

$\rho$ = masse volumique de la substance à examiner, en grammes par millilitre,

$\epsilon$ = porosité du lit de poudre compressé.

Appliquez l'équation (1) en supposant, dans un premier temps, la porosité égale à 0,5.

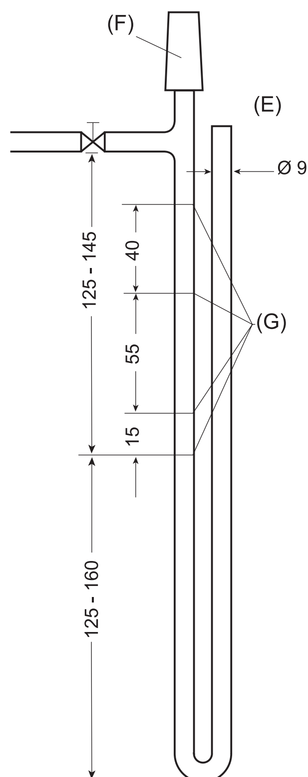



Figure 2.9.14.-2. – *Manomètre*
*Dimensions en millimètres*

Placez un disque de papier filtre sur le disque de métal perforé (*B*). Pesez à 1 mg près une prise d'essai de la masse *M* calculée. Transférez soigneusement la poudre dans la cellule de perméabilité, préalablement nettoyée et tarée, et tapotez légèrement le tube de façon à aplanir la surface du lit de poudre, puis couvrez avec un second disque de papier filtre. Comprimez lentement la poudre au moyen du piston, sans exercer de mouvement rotatoire. Maintenez la pression jusqu'à ce que le piston soit au maximum de sa course. Si ce résultat est impossible à obtenir, réduisez la quantité de poudre utilisée ; si, au contraire, la pression à exercer est trop faible, augmentez la quantité de poudre utilisée. Recalculez dans ce cas la valeur de la porosité. Après 10 s au moins, remontez le piston.

Raccordez la cellule de perméabilité au manomètre de façon à assurer une connexion étanche. A l'aide d'une poire en caoutchouc, évacuez l'air contenu dans le manomètre jusqu'à ce que le niveau du liquide coloré atteigne le repère supérieur. Fermez le robinet et vérifiez l'étanchéité de l'appareil en obturant hermétiquement l'ouverture supérieure de la cellule de perméabilité, par exemple avec un bouchon de caoutchouc. Supprimez l'obturation, puis à l'aide d'un chronomètre, mesurez le temps mis par le liquide pour descendre du deuxième au troisième repère.

A partir du temps d'écoulement ainsi mesuré, calculez la surface spécifique *S*, en mètres carrés par gramme, à l'aide de l'expression suivante :

$$S = \frac{K \times \sqrt{\varepsilon^3} \times \sqrt{t}}{\rho \times (1 - \varepsilon) \times \sqrt{\eta}} \qquad (2)$$

$t$ = temps d'écoulement, exprimé en secondes,

$\eta$ = viscosité dynamique de l'air, en millipascal secondes (voir tableau 2.9.14.-1),

$K$ = constante de l'appareil, déterminée à l'aide de l'équation (4).

$\rho$ = masse volumique de la substance à examiner, en grammes par millilitre,

$\epsilon$ = porosité du lit de poudre compressé.

ETALONNAGE DE L'APPAREIL

**Volume apparent du lit de poudre compressé**. Opérez comme suit, par la méthode dite de déplacement du mercure.

Placez 2 disques de papier filtre dans la cellule, en aplatissant bien les bords sur le disque métallique perforé au moyen d'une baguette de diamètre légèrement inférieur à celui du tube. Remplissez complètement la cellule de mercure, en veillant à ne pas laisser de bulles d'air sur la paroi, et arasez la surface supérieure de la colonne de mercure de façon à obtenir une surface plane. S'il existe un risque d'amalgame avec le matériau constituant la cellule, lubrifiez préalablement les parois du tube et le disque métallique avec une fine pellicule de paraffine liquide. Versez le mercure dans un vase à précipiter taré et mesurez sa masse ($M_A$) et sa température.

Avec la poudre de référence, préparez un lit de poudre compressé et remplissez à nouveau la cellule de mercure, en arasant la surface supérieure. Versez le mercure dans un vase à précipiter taré et mesurez à nouveau sa masse ($M_B$). Calculez le volume apparent (*V*) du lit de poudre compressé à l'aide de l'expression :

$$V = \frac{M_A - M_B}{\rho_{Hg}} \qquad (3)$$

$M_A - M_B$ = différence entre les masses de mercure mesurées, en grammes,

$\rho_{Hg}$ = masse volumique du mercure à la température mesurée, en grammes par millilitre.

Répétez 2 fois cette opération en changeant chaque fois la poudre utilisée. L'écart entre les valeurs obtenues pour le volume *V* ne doit pas dépasser 0,01 mL. Utilisez la moyenne des 3 valeurs pour le calcul.

**Constante de l'appareil (*K*)**. Opérez comme suit, en utilisant la poudre de référence, de surface spécifique et de masse volumique connues.

Calculez la masse de poudre de référence à utiliser à l'aide de l'équation (1), en utilisant pour la masse volumique la valeur déclarée et, pour le volume du lit de poudre compressé, la valeur calculée par l'équation (3).

Homogénéisez et aérez la poudre en l'agitant pendant 2 min dans un flacon de 100 mL. Préparez un lit de poudre compressé et mesurez le temps d'écoulement de l'air comme indiqué plus haut. Calculez la constante de l'appareil (*K*) à l'aide de l'expression :

$$K = \frac{S_{sp} \times \rho \times (1 - \varepsilon) \times \sqrt{\eta}}{\sqrt{\varepsilon^3} \times \sqrt{t}} \qquad (4)$$

$S_{sp}$ = valeur déclarée de la surface spécifique de la poudre de référence,

$\rho$ = masse volumique de la substance à examiner, en grammes par millilitre,

$\epsilon$ = porosité du lit de poudre compressé,

$t$ = temps d'écoulement, exprimé en secondes,

$\eta$ = viscosité dynamique de l'air, en millipascal secondes (voir tableau 2.9.14.-1).

Les valeurs de la masse volumique du mercure et de la viscosité de l'air en fonction de la température sont données dans le tableau 2.9.14.-1.

Tableau 2.9.14.-1

| Température (°C) | Masse volumique du mercure (g/mL) | Viscosité de l'air ($\eta$) (mPa·s) | $\sqrt{\eta}$ |
|---|---|---|---|
| 16 | 13,56 | 0,01800 | 0,1342 |
| 17 | 13,56 | 0,01805 | 0,1344 |
| 18 | 13,55 | 0,01810 | 0,1345 |
| 19 | 13,55 | 0,01815 | 0,1347 |
| 20 | 13,55 | 0,01819 | 0,1349 |
| 21 | 13,54 | 0,01824 | 0,1351 |
| 22 | 13,54 | 0,01829 | 0,1353 |
| 23 | 13,54 | 0,01834 | 0,1354 |
| 24 | 13,54 | 0,01839 | 0,1356 |

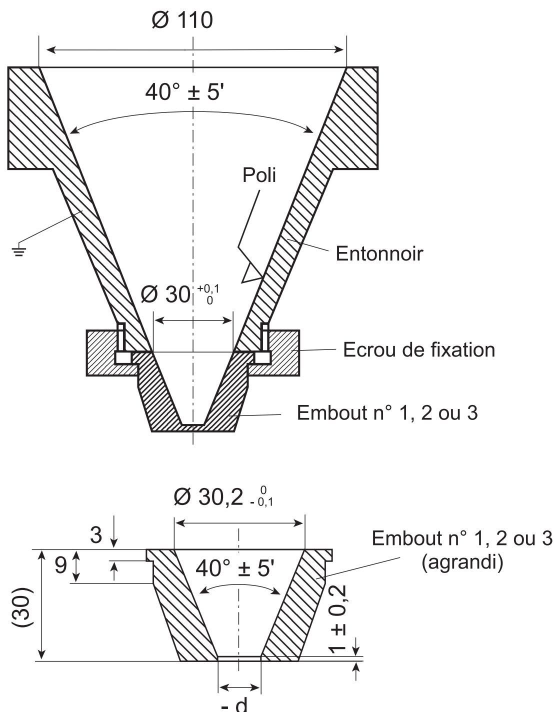
**01/2008:20916**

## 2.9.16. ÉCOULEMENT

L'essai d'écoulement est destiné à déterminer, dans des conditions définies, l'aptitude des solides divisés (poudres, granulés...) à s'écouler verticalement.

APPAREILLAGE

Selon les propriétés d'écoulement du produit à examiner, des entonnoirs avec et sans tige, d'angles et de diamètres d'orifice différents sont utilisés (voir figures 2.9.16.-1 et 2.9.16.-2). L'entonnoir est maintenu verticalement par un dispositif approprié. L'ensemble doit être protégé des vibrations.




| Embout n° | Diamètre (*d*) de l'orifice d'écoulement (millimètres) |
|---|---|
| 1 | 10 ± 0,01 |
| 2 | 15 ± 0,01 |
| 3 | 25 ± 0,01 |

Figure 2.9.16.-1. – *Modèle d'un entonnoir à écoulement et de son embout. L'embout est fait d'acier inoxydable, résistant à l'acide (V4A, CrNi)*
*Dimensions en millimètres*

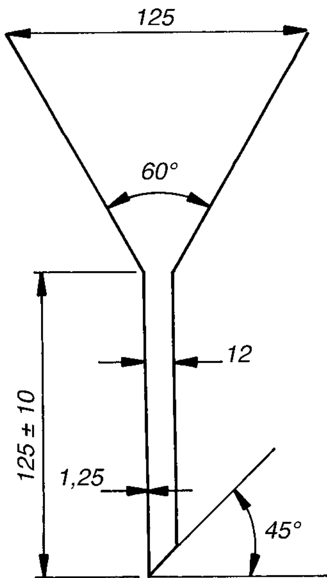



Figure 2.9.16.-2
*Dimensions en millimètres*

MODE OPÉRATOIRE

Dans l'entonnoir sec, dont l'orifice d'écoulement a été préalablement obturé à l'aide d'un moyen approprié, introduisez sans tasser une prise d'essai pesée avec une précision de 0,5 pour cent. La quantité de l'échantillon dépend de son volume apparent et de l'appareil utilisé. Libérez l'orifice de l'entonnoir et mesurez le temps d'écoulement de la totalité de l'échantillon. Effectuez trois déterminations.

EXPRESSION DES RÉSULTATS

L'aptitude à l'écoulement est exprimée en secondes et en dixièmes de secondes, par rapport à 100 g d'échantillon.

Les résultats dépendent des conditions de conservation du produit à examiner.

Le résultat peut être exprimé par :

a) la moyenne de ces déterminations, à condition qu'aucune des valeurs individuelles ne s'écarte de plus de 10 pour cent de la valeur moyenne,

b) les deux valeurs extrêmes, si les valeurs individuelles s'écartent de plus de 10 pour cent de la valeur moyenne,

c) sous forme de graphique (masse en fonction du temps d'écoulement),

d) un temps infini si la totalité de l'échantillon ne s'écoule pas.

**04/2010:20917**

## 2.9.17. ESSAI DU VOLUME EXTRACTIBLE POUR LES PRÉPARATIONS PARENTÉRALES[6]

Les suspensions et les émulsions doivent être agitées avant prélèvement du contenu et détermination de la masse volumique. Les préparations huileuses ou visqueuses peuvent être chauffées, si nécessaire, selon les instructions fournies sur l'étiquette et vigoureusement agitées immédiatement avant le prélèvement du contenu ; celui-ci est ensuite refroidi à 20-25 °C avant la détermination du volume.

RÉCIPIENTS UNIDOSES

Sélectionnez 1 seul récipient si le volume nominal est égal ou supérieur à 10 mL, 3 récipients si le volume nominal est supérieur à 3 mL et inférieur à 10 mL, ou 5 récipients si le volume nominal est égal ou inférieur à 3 mL. Prélevez dans sa totalité le contenu de chaque récipient sélectionné, à l'aide d'une

(6) Ce chapitre a fait l'objet du processus d'harmonisation des pharmacopées. Voir chapitre *5.8. Harmonisation des pharmacopées.*

seringue sèche d'une capacité n'excédant pas 3 fois le volume à mesurer et munie d'une aiguille de 21 gauges d'une longueur d'au minimum 2,5 cm. Chassez les éventuelles bulles d'air de la seringue et de l'aiguille, puis évacuez le contenu de la seringue, sans vider l'aiguille, dans une éprouvette sèche (dont les graduations indiquent le volume contenu plutôt que le volume écoulé) et d'une taille telle que le volume à mesurer occupe au moins 40 pour cent du volume gradué. Il est également possible de calculer le volume du contenu en millilitres en divisant la masse en grammes par la masse volumique.

Dans le cas de récipients de volume nominal inférieur ou égal à 2 mL, le contenu d'un nombre suffisant de récipients peut être mélangé afin d'obtenir le volume requis pour la mesure, à condition d'utiliser une seringue montée sèche différente pour chaque récipient. Le volume du contenu des récipients de contenance égale ou supérieure à 10 mL peut être déterminé en ouvrant le récipient et en le vidant directement dans l'éprouvette graduée ou dans un récipient taré.

Dans le cas de récipients examinés individuellement, le volume n'est pas inférieur au volume nominal. Dans le cas de récipients de volume nominal égal ou inférieur à 2 mL, le volume n'est pas inférieur à la somme des volumes nominaux des récipients examinés collectivement.

RÉCIPIENTS MULTIDOSES

Pour l'examen des préparations injectables présentées en récipients multidoses dont l'étiquette spécifie qu'ils renferment un nombre spécifique de doses d'un volume indiqué, sélectionnez un récipient et procédez selon les indications données pour les récipients unidoses, en utilisant autant de seringues montées que de doses spécifiées.

Le volume libéré par chaque seringue n'est pas inférieur à la dose indiquée.

CARTOUCHES ET SERINGUES PRÉREMPLIES

Sélectionnez 1 seul récipient si le volume nominal est supérieur ou égal à 10 mL, 3 récipients si le volume nominal est supérieur à 3 mL et inférieur à 10 mL, ou 5 récipients si le volume nominal est inférieur ou égal à 3 mL. Si nécessaire, munissez les récipients des accessoires nécessaires à leur utilisation (aiguille, piston, seringue) et transvasez la totalité du contenu de chaque récipient, sans vider l'aiguille, dans un récipient taré sec, en poussant lentement et régulièrement sur le piston. Calculez le volume en millilitres en divisant la masse en grammes par la masse volumique.

Le volume mesuré de chacun des récipients n'est pas inférieur au volume nominal.

PRÉPARATIONS POUR PERFUSION

Sélectionnez un récipient. Transvasez le contenu dans une éprouvette graduée sèche d'une taille telle que le volume à mesurer occupe au moins 40 pour cent du volume nominal de l'éprouvette. Mesurez le volume transvasé.

Le volume mesuré n'est pas inférieur au volume nominal.

**01/2008:20918**

## 2.9.18. PRÉPARATIONS POUR INHALATION : ÉVALUATION AÉRODYNAMIQUE DES PARTICULES FINES

Cet essai est utilisé pour déterminer les caractéristiques granulométriques des nuages d'aérosols générés par les préparations pour inhalation.

Sauf exception justifiée et autorisée, l'essai est réalisé avec l'un des appareils et selon l'un des modes opératoires suivants.

Les *caractéristiques dimensionnelles des étages* font l'objet de vérifications périodiques, de même que sont confirmées les autres dimensions jouant un rôle crucial dans le bon fonctionnement de l'impacteur.

*Réentraînement (pour les appareils D et E).* Pour assurer une capture efficace des particules, recouvrez chaque plaque de glycérol, d'huile de silicone ou d'un autre liquide de haute viscosité similaire, généralement déposé par le biais d'un solvant volatil. Ce traitement des plaques est à intégrer dans la validation de la méthode et peut être omis dans certains cas justifiés et autorisés.

*Masse totale.* La masse totale de substance active recueillie n'est pas inférieure à 75 pour cent ni supérieure à 125 pour cent de la valeur moyenne obtenue dans l'essai d'uniformité de la dose délivrée. Cette exigence ne concerne pas les performances de l'inhalateur, mais permet de s'assurer de la validité des résultats.

APPAREIL A - IMPACTEUR À CASCADE EN VERRE

L'appareillage est représenté figure 2.9.18.-1 (voir aussi tableau 2.9.18.-1).

**Mode opératoire applicable aux nébuliseurs**

Introduisez respectivement 7 mL et 30 mL d'un solvant approprié dans les chambres de dépôt supérieure et inférieure.

Assemblez les différents éléments de l'appareil. Vérifiez que l'ensemble est vertical et bien fixé et que la cheville du gicleur de la chambre de dépôt inférieure effleure juste le fond de la chambre. Branchez une pompe appropriée munie d'un filtre de porosité adéquate à la sortie de l'appareil. Réglez le débit d'air traversant l'appareil, mesuré à l'entrée de la gorge, à 60 ± 5 L/min.

Introduisez la préparation liquide pour inhalation dans le réservoir du nébuliseur. Montez l'embout du nébuliseur et connectez-le à l'appareil au moyen d'un adaptateur.

Mettez la pompe en marche puis, au bout de 10 s, le nébuliseur.

Au bout de 60 s, sauf indication contraire, arrêtez le nébuliseur puis attendez environ 5 s et arrêtez la pompe. Démontez l'appareil. Lavez l'intérieur de la chambre de dépôt supérieure en recueillant les produits de lavage dans une fiole jaugée. Lavez l'intérieur de la chambre de dépôt inférieure en recueillant les produits de lavage dans une seconde fiole jaugée. Lavez enfin le filtre situé à l'entrée de la pompe et les éléments servant à le connecter à la chambre de dépôt inférieure et ajoutez les produits de lavage à ceux obtenus pour la chambre de dépôt inférieure. Déterminez la quantité de substance active contenue dans chacune des 2 fioles. Exprimez le résultat obtenu pour chacune des 2 parties de l'appareil en pourcentage de la quantité totale de substance active.

**Mode opératoire applicable aux inhalateurs pressurisés**

Installez un adaptateur à l'extrémité de la gorge de l'appareil de telle sorte que l'embout du diffuseur, une fois inséré à une profondeur d'environ 10 mm dans l'adaptateur, soit aligné sur l'axe horizontal de la gorge et que l'extrémité ouverte du diffuseur, qui reçoit le réservoir pressurisé, soit dirigée vers le haut dans le même plan vertical que le reste de l'appareil.

Introduisez respectivement 7 mL et 30 mL d'un solvant approprié dans les chambres de dépôt supérieure et inférieure.

Assemblez les différents éléments de l'appareil. Vérifiez que l'ensemble est vertical et bien fixé et que la cheville du gicleur de la chambre de dépôt inférieure effleure juste le fond de la chambre. Branchez une pompe appropriée à la sortie de l'appareil. Réglez le débit d'air traversant l'appareil, mesuré à l'entrée de la gorge, à 60 ± 5 L/min.

Amorcez la valve doseuse en agitant pendant 5 s et en actionnant une fois à perte. Attendez au moins 5 s puis agitez et actionnez à nouveau à perte. Répétez à nouveau cette opération à 3 reprises.

Agitez pendant environ 5 s, puis mettez la pompe en marche et placez l'embout du diffuseur dans l'adaptateur. Actionnez immédiatement une fois. Séparez l'ensemble de l'inhalateur de

l'adaptateur, agitez pendant environ 5 s, replacez l'embout du diffuseur dans l'adaptateur et actionnez à nouveau. Répétez la procédure de décharge. Le nombre de décharges ainsi recueillies ne doit pas être trop élevé (en règle générale pas plus de 10). Après la dernière décharge, attendez environ 5 s puis arrêtez la pompe. Démontez l'appareil.

Tableau 2.9.18.-1. – *Spécifications des éléments de l'appareil A représenté figure 2.9.18.-1*

| Code | Elément | Description | Dimensions* |
|---|---|---|---|
| A | Adaptateur d'embout | Adaptateur en caoutchouc moulé pour jonction avec l'embout de l'inhalateur. | |
| B | Gorge | Ballon à fond rond modifié : | 50 mL |
| | | – *entrée : joint conique rodé femelle* | 29/32 |
| | | – *sortie : joint conique rodé mâle* | 24/29 |
| C | Col | Adaptateur en verre modifié : | |
| | | – *entrée : joint conique rodé femelle* | 24/29 |
| | | – *sortie : joint conique rodé mâle* | 24/29 |
| | | Partie inférieure : tube en verre calibré : | |
| | | – *diamètre intérieur* | 14 |
| | | Tube en verre à paroi mince : | |
| | | – *diamètre intérieur* | 17 |
| D | Chambre de dépôt supérieure | Ballon à fond rond modifié | 100 mL |
| | | – *entrée : joint conique rodé femelle* | 24/29 |
| | | – *sortie : joint conique rodé mâle* | 24/29 |
| E | Tube de connexion | Tube en verre à paroi moyenne : | |
| | | – *joint conique rodé mâle* | 14/23 |
| | | Coude et partie droite supérieure : | |
| | | – *diamètre extérieur* | 13 |
| | | Partie droite inférieure | |
| | | – *diamètre extérieur* | 8 |
| F | Adaptateur à tubulure latérale et capuchon vissé | Capuchon vissé en plastique | 28/13 |
| | | Joint silicone | 28/11 |
| | | Rondelle PTFE | 28/11 |
| | | Filetage en verre : | |
| | | – *pas de vis* | 28 |
| | | Branche latérale (sortie vers la pompe à vide) : | |
| | | – *diamètre intérieur minimal* | 5 |
| G | Gicleur | Portre-filtre modifié en polypropylène, assemblé à la partie inférieure du tube de connexion par un tube en PTFE. | Voir figure 2.9.18.-1 |
| | | Disque circulaire en acétal avec 4 gicleurs disposés sur un cercle de 5,3 mm de diamètre et une cheville d'écartement central : | 10 |
| | | – *diamètre de la cheville* | 2 |
| | | – *hauteur de la saillie de la cheville* | 2 |
| H | Chambre de dépôt inférieure | Fiole conique | 250 mL |
| | | – *joint conique rodé femelle* | 24/29 |

* Dimensions en millimètres, sauf indication contraire.

Avec un solvant approprié, lavez le tube d'admission à la chambre de dépôt inférieure (surface intérieure et surface extérieure sur la hauteur pénétrant dans la chambre), en recueillant les produits de lavage dans la chambre de dépôt inférieure. Déterminez la teneur en substance active de la solution recueillie. Calculez la quantité de substance active retenue dans la chambre de dépôt inférieure à chaque décharge et exprimez les résultats en pourcentage de la dose indiquée sur l'étiquette.

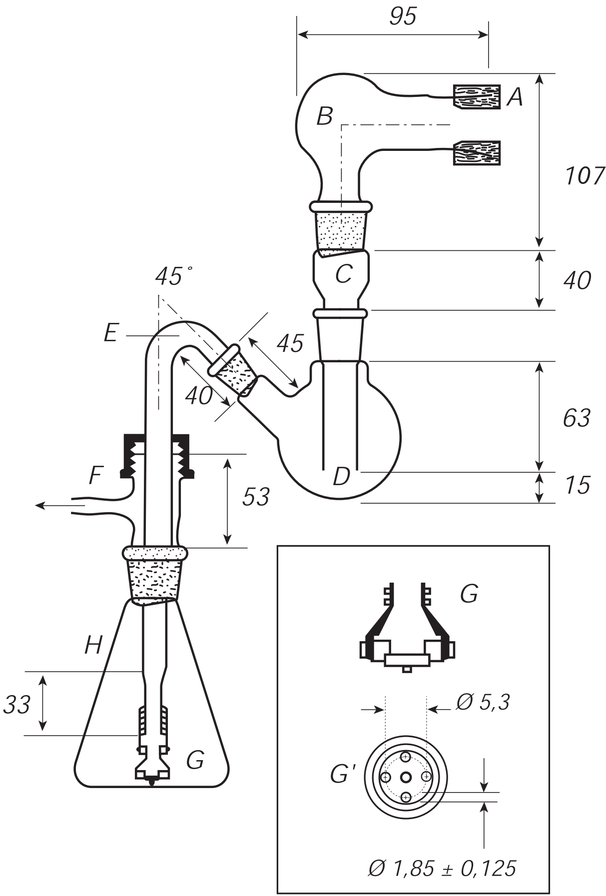



Figure 2.9.18.-1. – *Appareil A : impacteur à cascade en verre*

*Dimensions en millimètres (tolérances ± 1 mm, sauf indication contraire)*

**Mode opératoire applicable aux inhalateurs à poudre**

Introduisez respectivement 7 mL et 30 mL d'un solvant approprié dans les chambres de dépôt supérieure et inférieure.

Assemblez les différents éléments de l'appareil. Vérifiez que l'ensemble est vertical et bien fixé et que la cheville du gicleur de la chambre de dépôt inférieure effleure juste le fond de la chambre. Avant d'installer l'inhalateur, branchez une pompe appropriée à la sortie de l'appareil. Réglez le débit d'air traversant l'appareil, mesuré à l'entrée de la gorge, à 60 ± 5 L/min.

Préparez l'inhalateur pour l'emploi et connectez son embout à l'appareil au moyen d'un adaptateur approprié. Mettez la pompe en marche pendant 5 s, puis arrêtez-la et séparez l'inhalateur de l'appareil. Répétez la procédure de décharge. Le nombre de décharges ainsi recueillies ne doit pas être trop élevé (en règle générale pas plus de 10). Démontez l'appareil.

Avec un solvant approprié, lavez le tube d'admission à la chambre de dépôt inférieure (surface intérieure et surface extérieure sur la hauteur pénétrant dans la chambre), en recueillant les produits de lavage dans la chambre de dépôt inférieure. Déterminez la teneur en substance active de cette solution. Calculez la quantité de substance active recueillie dans la chambre de dépôt inférieure à chaque décharge et exprimez les résultats en pourcentage de la dose indiquée sur l'étiquette.

## Dose des particules fines et distribution granulométrique des particules

### APPAREIL C - IMPACTEUR À CASCADE MULTI-ÉTAGES

L'impacteur à cascade multi-étages (voir figures 2.9.18.-4/6) se compose de 4 étages de dépôt, numérotés de 1 (pré-séparation) à 4, et d'un étage de filtration intégré (étage 5). Chaque étage de dépôt comprend : un plafond métallique (B) traversé par un gicleur métallique (A) associé à une plaque de dépôt (D) ; une paroi verticale constituée par une cuve cylindrique en verre (E) comportant un orifice d'accès (F) ; un plancher métallique (G) traversé par le gicleur (H) qui assure la connexion avec l'étage inférieur. Le gicleur de l'étage 4 (U) comporte un dispositif multi-jets. Chaque plaque de dépôt (D) est installée dans un cadre métallique (J) fixé par 2 fils métalliques (K) à un manchon (L) vissé au gicleur. La plaque de dépôt est centrée et perpendiculaire à l'axe du gicleur. Sa surface supérieure est légèrement surélevée par rapport au bord du cadre métallique. Une rainure périphérique ménagée dans le plancher permet la mise en place de la cuve de verre. Un joint (M) assure l'étanchéité entre la paroi de verre et le plancher, et l'ensemble est maintenu par 6 boulons (N). Les orifices d'accès sont hermétiquement fermés par des bouchons. La face inférieure du plancher de l'étage 4 comporte une saillie circulaire sur laquelle est installé un joint torique en caoutchouc (P) assurant une jonction étanche avec un porte-filtre, le long des bords du filtre. Le porte-filtre (R) a la forme d'une cuve comportant une rainure circulaire dans laquelle est encastré un support de filtre perforé (S). Le porte-filtre est dimensionné pour des filtres d'un diamètre de 76 mm. L'ensemble constitué par les étages de dépôt est fixé au porte-filtre par 2 sauterelles (T). Une tuyère d'admission (voir figure 2.9.18.-7) est connectée au gicleur de l'étage 1. L'étanchéité de la jonction avec le gicleur est assurée par un joint torique en caoutchouc installé sur le gicleur, celle de la jonction avec l'embout de l'inhalateur par un adaptateur approprié, qui permet d'aligner dans un même plan la face avant de l'embout et celle de la tuyère.

#### Mode opératoire applicable aux inhalateurs pressurisés

Introduisez, dans chacun des étages 1 à 4 de l'appareil, 20 mL d'un solvant capable de dissoudre la substance active, puis replacez les bouchons. Inclinez l'appareil pour humecter les bouchons et ainsi neutraliser les charges électrostatiques. Placez, dans l'étage 5, un filtre permettant de retenir quantitativement la substance active et assemblez l'appareil. Installez un adaptateur approprié à l'extrémité de la tuyère d'admission de telle sorte que l'embout du diffuseur, une fois inséré dans l'adaptateur, soit aligné sur l'axe horizontal de la tuyère et que le corps de l'inhalateur soit orienté comme indiqué pour l'emploi normal. Branchez une pompe à vide appropriée à la sortie de l'appareil et réglez le débit (mesuré à l'entrée de la tuyère d'admission) à 30 L/min (± 5 pour cent). Arrêtez la pompe.

Sauf indication contraire dans la notice d'utilisation, agitez l'inhalateur pendant 5 s et actionnez une fois à perte. Mettez la pompe en marche, placez l'embout du diffuseur dans l'adaptateur et déchargez l'inhalateur dans l'appareil, en appuyant sur la valve le temps voulu pour obtenir une décharge complète. Attendez 5 s avant de séparer l'ensemble de l'inhalateur de l'adaptateur. Répétez la procédure de décharge. Le nombre de décharges ainsi recueillies ne doit pas être trop élevé (en règle générale pas plus de 10), tout en étant suffisant pour permettre une détermination exacte et fidèle de la dose des particules fines. Après la dernière décharge, attendez 5 s puis arrêtez la pompe.

Démontez l'étage de filtration de l'appareil. Sortez le filtre avec précaution et procédez à l'extraction de la substance active au moyen d'un volume approprié de solvant. Démontez la tuyère d'admission et l'adaptateur d'embout et procédez de même. Si nécessaire, rincez l'intérieur du gicleur de l'étage 1 avec du solvant, en recueillant les produits de rinçage dans la cuve de l'étage 1. Récupérez dans la cuve de chacun des 4 étages supérieurs les résidus de substance active déposés sur les parois et la plaque de dépôt correspondant à cet étage, en inclinant et faisant tourner l'appareil avec précaution de façon à éviter tout transfert de liquide entre les étages.

Déterminez, par une méthode d'analyse appropriée, la quantité de substance active contenue dans chacun des volumes de solvant.

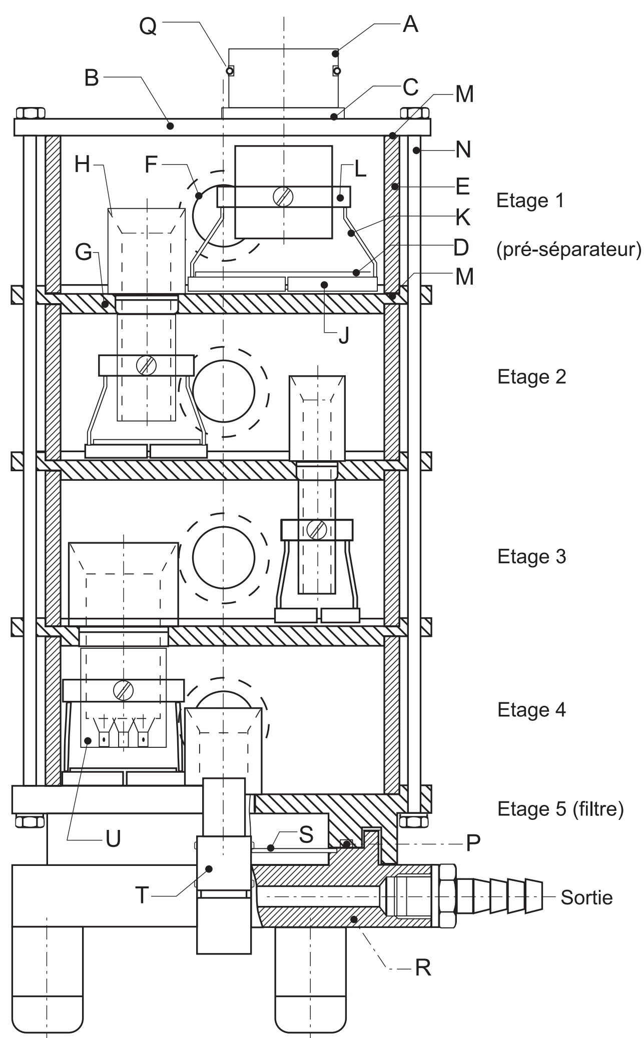



Figure 2.9.18.-4. – *Appareil C : impacteur à cascade multi-étages*

Calculez la dose des particules fines (voir Calcul).

#### Mode opératoire applicable aux inhalateurs à poudre

Placez, dans l'étage 5, un filtre à faible résistance approprié, permettant de retenir quantitativement la substance active, et assemblez l'appareil. Connectez-le à un circuit hydraulique conforme au schéma de la figure 2.9.18.-8 et aux indications du tableau 2.9.18.-4. Sauf indication contraire, effectuez l'essai au débit $Q_{out}$ utilisé dans l'essai d'uniformité de la dose délivrée, en aspirant 4 L d'air à travers l'appareil, depuis l'embout de l'inhalateur.

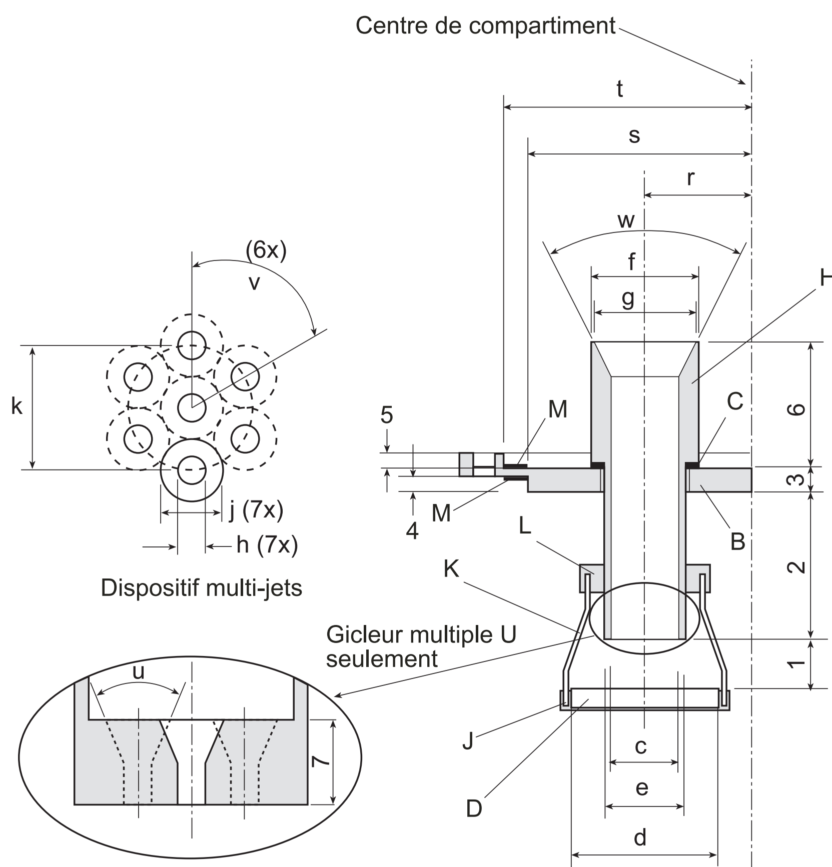



Figure 2.9.18.-5. – *Appareil C : configuration du gicleur et de la plaque de dépôt. Les vues de détail représentent l'extrémité du gicleur multiple U de l'étage 4. (Les lettres minuscules et les chiffres renvoient au tableau 2.9.18.-3, les lettres majuscules à la figure 2.9.18.-4).*

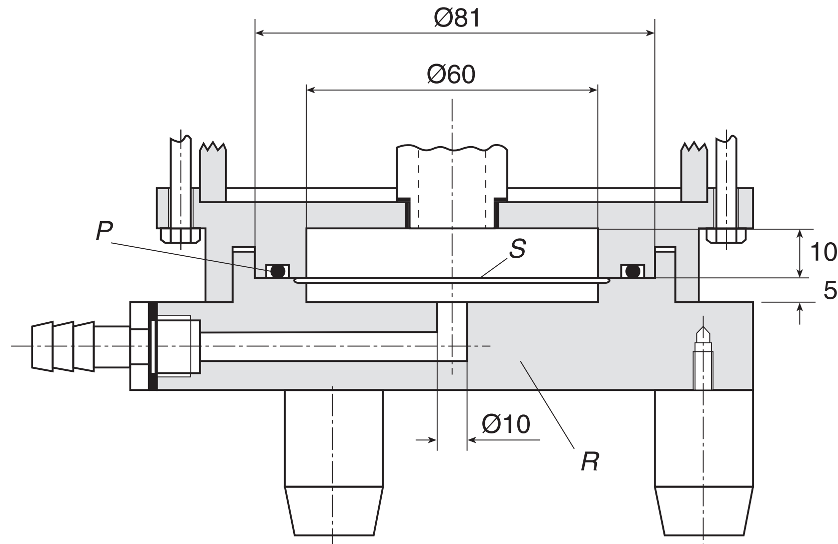



Figure 2.9.18.-6. – *Appareil C : étage de filtration (étage 5). Les chiffres se rapportent aux dimensions (Ø = diamètre), les lettres majuscules renvoient au tableau 2.9.18.-2.*

*Dimensions en millimètres, sauf indication contraire*

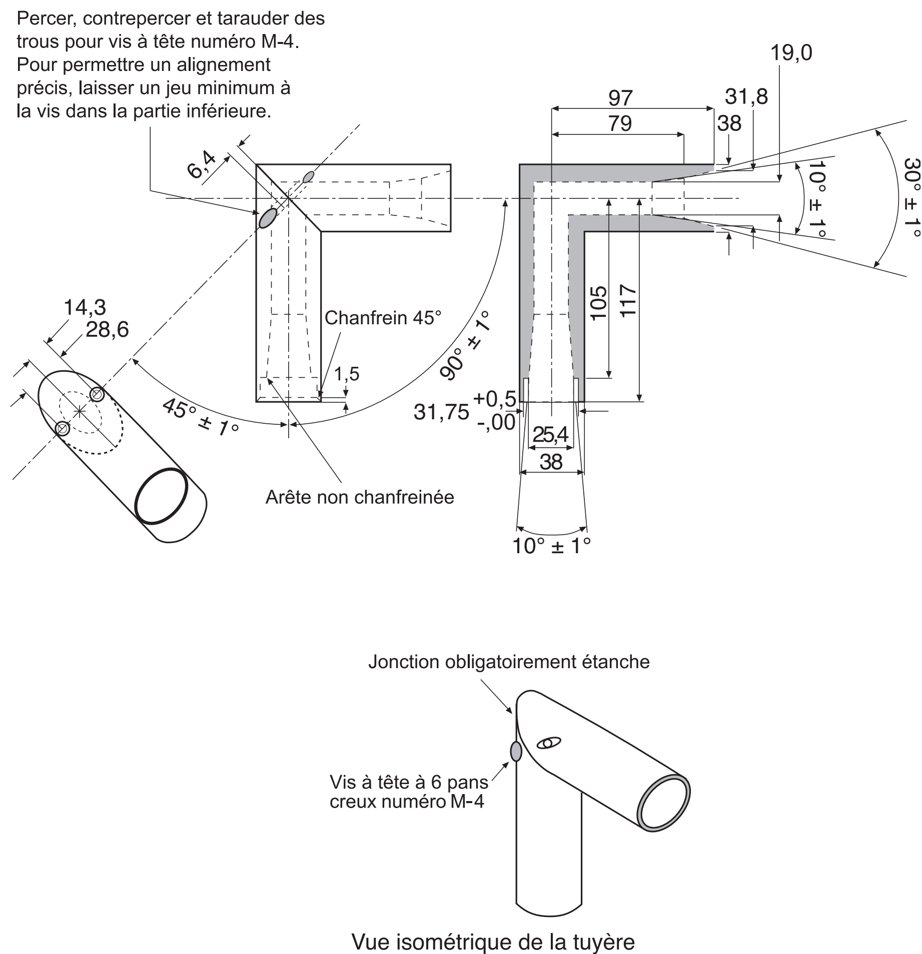
Branchez sur la tuyère d'admission un débitmètre volumétrique. Utilisez un débitmètre étalonné pour le courant gazeux sortant ou calculez le débit gazeux en sortie du débitmètre ($Q_{out}$) d'après la loi des gaz parfaits. Dans le cas d'un débitmètre étalonné pour le courant gazeux entrant ($Q_{in}$), utilisez l'expression suivante :

$$Q_{out} = \frac{Q_{in} \times P_0}{P_0 - \Delta P}$$

$P_0$ = pression atmosphérique,

$\Delta P$ = perte de charge dans le débitmètre.

Ajustez le débit au moyen du régulateur de débit de façon à instaurer dans l'appareillage un régime stationnaire au débit $Q_{out}$ (± 5 pour cent), puis arrêtez la pompe.




Note

| | |
|---|---|
| (1) | Utilisez comme matériau de l'aluminium, de l'acier inoxydable ou tout autre matériau approprié. |
| (2) | Procédez par usinage d'une barre cylindrique de 38 mm. |
| (3) | Alésez la barre sur toute sa longueur pour obtenir un tube de d.i.19 mm. |
| (4) | Sectionnez le tube à 45° exactement, comme indiqué. |
| (5) | La surface des alésages cylindriques et coniques doit être lisse − rugosité Ra = environ 0,4 μm. |
| (6) | Meulez les surfaces de jonction des 2 sections du tube pour assurer l'étanchéité aux liquides. |
| (7) | Utilisez un support adéquat pour aligner les alésages de 19 mm et pour percer et tarauder des trous pour vis numéro M4 × 0,7. L'alignement des alésages des 2 sections du tube au niveau de la jonction doit être quasiment parfait. |

Figure 2.9.18.-7. − *Tuyère d'admission*

*Dimensions en millimètres sauf indication contraire*

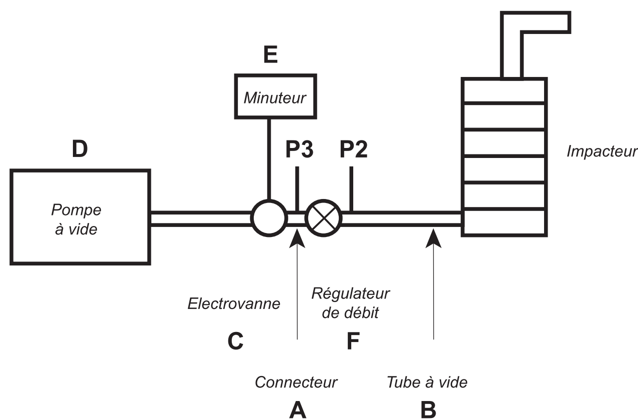



Figure 2.9.18.-8. – *Montage expérimental utilisé pour les inhalateurs à poudre*

Tableau 2.9.18.-2. – *Spécifications des éléments de l'appareil C représenté figures 2.9.18.-4/6*

| **Code*** | **Elément** | **Description** | **Dimensions**** |
|---|---|---|---|
| A,H | Gicleur | Tube métallique à paroi interne polie, vissé dans le plafond, avec joint d'étanchéité (C). | Voir figure 2.9.18.-5 |
| B,G | Plafond | Plaque métallique circulaire : | |
| | | – *diamètre* | 120 |
| | | – *épaisseur* | Voir figure 2.9.18.-5 |
| C | Joint d'étanchéité | Par exemple en PTFE | Adapté au gicleur |
| D | Plaque de dépôt | Disque en verre fritté de porosité 0 | |
| | | – *diamètre* | Voir figure 2.9.18.-5 |
| E | Cuve | Section de tube cylindrique en verre poli : | |
| | | – *hauteur, joint compris* | 46 |
| | | – *diamètre extérieur* | 100 |
| | | – *épaisseur de paroi* | 3,5 |
| | | – *diamètre de l'orifice d'accès (F)* | 18 |
| | | – *bouchon de l'orifice d'accès* | ISO 24/25 |
| J | Cadre métallique | Cadre circulaire à profil en L avec gorge | |
| | | – *diamètre intérieur* | Adapté à la plaque de dépôt |
| | | – *hauteur* | 4 |
| | | – *épaisseur de la section horizontale* | 0,5 |
| | | – *épaisseur de la section verticale* | 2 |
| K | Fil métallique | Fils métalliques (2 par cadre) reliant le cadre métallique au manchon | |
| | | – *diamètre* | 1 |
| L | Manchon | Manchon métallique vissé sur le gicleur | |
| | | – *diamètre intérieur* | Adapté au gicleur |
| | | – *hauteur* | 6 |
| | | – *Epaisseur* | 5 |
| M | Joint d'étanchéité | En silicone par exemple | Adapté à la cuve |
| N | Boulons | Boulons métalliques avec écrous (6 paires) | |
| | | – *longueur* | 205 |
| | | – *diamètre* | 4 |
| P | Joint torique | Joint torique en caoutchouc | |
| | | – *diamètre × épaisseur* | 66,34 × 2,62 |
| Q | Joint torique | Joint torique en caoutchouc | |
| | | – *diamètre × épaisseur* | 29,1 × 1,6 |
| R | Porte-filtre | Boitier métallique avec support et orifice de sortie | Voir figure 2.9.18.-6 |
| S | Support de filtre | Feuille métallique perforée | |
| | | – *diamètre* | 65 |
| | | – *diamètre des perforations* | 3 |
| | | – *distance entre les perforations (entraxe)* | 4 |
| T | Sauterelles | | |
| U | Gicleur multiple | Gicleur (H) se terminant par un dispositif multi-jets | Voir vues de détail figure 2.9.18.-5 |

*Voir figure 2.9.18.-4.

**Sauf indication contraire, dimensions en millimètres avec tolérance selon l'ISO 2768-m.

Tableau 2.9.18.-3. – *Dimensions[1] des gicleurs et des plaques de dépôt de l'appareil C*

| **Type** | **Code[2]** | **Etage 1** | **Etage 2** | **Etage 3** | **Etage 4** | **Filtre (étage 5)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Distance | 1 | 9,5 (-0,0+0,5) | 5,5 (-0,0+0,5) | 4,0 (-0,0+0,5) | 6,0 (-0,0+0,5) | n.a. |
| Distance | 2 | 26 | 31 | 33 | 30,5 | 0 |
| Distance | 3 | 8 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Distance | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | n.a. |
| Distance | 5 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Distance | 6 [3] | 20 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Distance | 7 | n.a. | n.a. | n.a. | 8,5 | n.a. |
| Diamètre | c | 25 | 14 | 8,0 (± 0,1) | 21 | 14 |
| Diamètre | d | 50 | 30 | 20 | 30 | n.a. |
| Diamètre | e | 27,9 | 16,5 | 10,5 | 23,9 | n.a. |
| Diamètre | f | 31,75 (-0,0+0,5) | 22 | 14 | 31 | 22 |
| Diamètre | g | 25,4 | 21 | 13 | 30 | 21 |
| Diamètre | h | n.a. | n.a. | n.a. | 2,70 (± 0,5) | n.a. |
| Diamètre | j | n.a. | n.a. | n.a. | 6,3 | n.a. |
| Diamètre | k | n.a. | n.a. | n.a. | 12,6 | n.a. |
| Rayon[4] | r | 16 | 22 | 27 | 28,5 | 0 |
| Rayon | s | 46 | 46 | 46 | 46 | n.a. |
| Rayon | t | n.a. | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Angle | w | 10° | 53° | 53° | 53° | 53° |
| Angle | u | n.a. | n.a. | n.a. | 45° | n.a. |
| Angle | v | n.a. | n.a. | n.a. | 60° | n.a. |

[1]Sauf indication contraire, dimensions en millimètres avec tolérances selon l'ISO 2768-m.
[2]Voir figure 2.9.18.-5.
[3]Joint d'étanchéité compris.
[4]Centre du compartiment de l'étage considéré.
n.a. : non applicable.

Tableau 2.9.18.-4. – *Spécifications des éléments du montage représenté figure 2.9.18.-8*

| Code | Elément | Description |
|---|---|---|
| A | Connecteur | d.i. ≥ 8 mm, par exemple manchon métallique court avec branchement de faible diamètre vers P3. |
| B | Tube à vide | Longueur de tube approprié de d.i. ≥ 8 mm et de volume intérieur 25 ± 5 mL. |
| C | Electrovanne | Electrovanne 2/2 (2 voies, 2 orifices) avec orifice à résistance à l'écoulement minimale de d.i. ≥ 8 mm et temps d'ouverture ≤ 100 ms (par exemple type 256-A08, Bürkert GmbH, D-74653 Ingelfingen) ou équivalent. |
| D | Pompe à vide | Pompe capable d'instaurer le débit requis à travers l'appareil assemblé, avec l'inhalateur à poudre placé dans l'adaptateur d'embout (par exemple produit type 1023, 1423 ou 2565, Gast Manufacturing Inc., Benton Harbor, MI 49022) ou équivalent.<br>La pompe est connectée à l'électrovanne 2/2 au moyen d'un tube à vide court et/ou large (d.i. ≥ 10 mm) et de connecteurs permettant de réduire la capacité de pompage requise. |
| E | Minuteur | Minuteur capable de piloter l'électrovanne 2/2 pendant le temps requis (par exemple type G814, RS Components International, Corby, NN17 9RS, UK) ou équivalent. |
| P2<br>P3 | Mesures manométriques | Mesures en régime stationnaire avec transducteur de pression absolue. |
| F | Régulateur de débit | Robinet réglable avec maximum $C_v$ ≥ 1 (par exemple type 8FV12LNSS, Parker Hannifin plc., Barnstaple, EX31 1NP, UK) ou équivalent. |

Vérifiez que le régime critique est instauré dans le régulateur de débit, avec l'inhalateur en place et au débit d'essai établi, en mesurant la pression absolue à l'entrée et à la sortie du régulateur (points de mesure P2 et P3 de la figure 2.9.18.-8). Un rapport P3/P2 inférieur ou égal à 0,5 indique que le débit est critique. Si le débit critique n'est pas atteint, remplacez la pompe par une pompe plus puissante et déterminez à nouveau le débit d'essai.

Introduisez, dans chacun des 4 étages supérieurs de l'appareil, 20 mL d'un solvant capable de dissoudre la substance active, puis replacez les bouchons. Inclinez l'appareil pour humecter les bouchons et ainsi neutraliser les charges électrostatiques. Installez un adaptateur approprié à l'extrémité de la tuyère d'admission.

Préparez l'inhalateur à poudre pour l'emploi comme indiqué dans la notice d'utilisation. Mettez la pompe en marche et fermez l'électrovanne, puis placez l'embout de l'inhalateur dans l'adaptateur. Provoquez une décharge de poudre dans l'appareil en ouvrant l'électrovanne pendant le temps *T* requis (± 5 pour cent). Répétez la procédure de décharge. Le nombre de décharges ainsi recueillies ne doit pas être trop élevé (en règle générale pas plus de 10), tout en étant suffisant pour permettre une détermination exacte et fidèle de la dose des particules fines.

Démontez l'étage de filtration de l'appareil. Sortez le filtre avec précaution et procédez à l'extraction de la substance active dans un volume approprié de solvant. Démontez la tuyère d'admission et l'adaptateur d'embout et procédez de même. Si nécessaire, rincez l'intérieur du gicleur de l'étage 1 avec du solvant, en recueillant les produits de rinçage dans la cuve de l'étage 1. Récupérez dans la cuve de chacun des 4 étages supérieurs les résidus de substance active déposés sur les parois et la plaque de dépôt correspondant à cet étage, en inclinant et faisant tourner l'appareil avec précaution de façon à éviter tout transfert de liquide entre les étages.

Déterminez, par une méthode d'analyse appropriée, la quantité de substance active contenue dans chacun des volumes de solvant.

Calculez la dose des particules fines (voir Calcul).

APPAREIL D - IMPACTEUR À CASCADE ANDERSEN

L'impacteur à cascade Andersen 1 ACFM se compose de 8 étages plus 1 étage de filtration terminal. Il peut être constitué d'aluminium, d'acier inoxydable ou d'un autre matériau approprié. Les étages sont assemblés les uns aux autres par des clips et l'étanchéité des jonctions est assurée par des joints toriques. Les dimensions critiques appliquées par le fabricant de l'appareil D sont indiquées dans le tableau 2.9.18.-5. En cours d'utilisation, des phénomènes d'occlusion et d'usure des trous peuvent se produire. Les tolérances dimensionnelles en cours d'utilisation doivent être justifiées. Dans la configuration utilisée pour les inhalateurs pressurisés (figure 2.9.18.-9), le cône d'entrée de l'impacteur est connecté à une tuyère d'admission (voir figure 2.9.18.-7). Un adaptateur approprié assure une jonction étanche entre l'embout de l'inhalateur et la tuyère, et permet d'aligner dans un même plan la face avant de l'embout et celle de la tuyère.

Dans la configuration utilisée pour les inhalateurs à poudre, un pré-séparateur placé au-dessus de l'étage supérieur permet de collecter la plus grande partie de la fraction non respirable de la poudre. Il est connecté à la tuyère d'admission comme représenté figure 2.9.18.-10. Pour permettre l'instauration de forts débits gazeux à travers l'impacteur, la tubulure de sortie assurant la connexion de l'impacteur à la pompe à vide est élargie, avec un diamètre intérieur supérieur ou égal à 8 mm.

Tableau 2.9.18.-5. – *Dimensions critiques de l'appareil D*

| Description | Numéro | Dimension (mm) |
|---|---|---|
| Etage 0 - diamètre de buse | 96 | 2,55 ± 0,025 |
| Etage 1 - diamètre de buse | 96 | 1,89 ± 0,025 |
| Etage 2 - diamètre de buse | 400 | 0,914 ± 0,0127 |
| Etage 3 - diamètre de buse | 400 | 0,711 ± 0,0127 |
| Etage 4 - diamètre de buse | 400 | 0,533 ± 0,0127 |
| Etage 5 - diamètre de buse | 400 | 0,343 ± 0,0127 |
| Etage 6 - diamètre de buse | 400 | 0,254 ± 0,0127 |
| Etage 7 - diamètre de buse | 201 | 0,254 ± 0,0127 |

**Mode opératoire applicable aux inhalateurs pressurisés**

Placez dans l'appareil un filtre approprié. Assemblez l'impacteur et vérifiez l'étanchéité du système. Suivez les instructions du fabricant à cet égard. Installez un adaptateur approprié à l'extrémité de la tuyère de telle sorte que l'embout du diffuseur, une fois inséré dans l'adaptateur, soit aligné sur l'axe horizontal de la tuyère et que le corps de l'inhalateur soit orienté comme indiqué pour l'emploi normal. Branchez une pompe appropriée à la sortie de l'appareil et réglez le débit d'air traversant l'appareil (mesuré à l'entrée de la tuyère d'admission) à 28,3 L/min (± 5 pour cent). Arrêtez la pompe.

Sauf indication contraire dans la notice d'utilisation, agitez l'inhalateur pendant 5 s et actionnez une fois à perte. Mettez la pompe en marche, placez l'embout du diffuseur dans l'adaptateur et déchargez l'inhalateur tête en bas dans l'impacteur, en appuyant sur la valve le temps voulu pour obtenir une décharge complète. Attendez 5 s avant de séparer l'ensemble de l'inhalateur de l'adaptateur. Répétez la procédure de décharge. Le nombre de décharges ainsi recueillies ne doit pas être trop élevé (en règle générale pas plus de 10), tout en étant suffisant pour permettre une détermination exacte et fidèle de la dose des particules fines. Après la dernière décharge, attendez 5 s puis arrêtez la pompe.

Démontez l'appareil. Sortez le filtre avec précaution et procédez à l'extraction de la substance active au moyen d'un volume approprié de solvant. Démontez la tuyère d'admission et l'adaptateur d'embout et procédez de même. Récupérez les résidus de substance active déposés sur les parois et la plaque de dépôt de chacun des étages de l'appareil, au moyen de volumes appropriés de solvant.

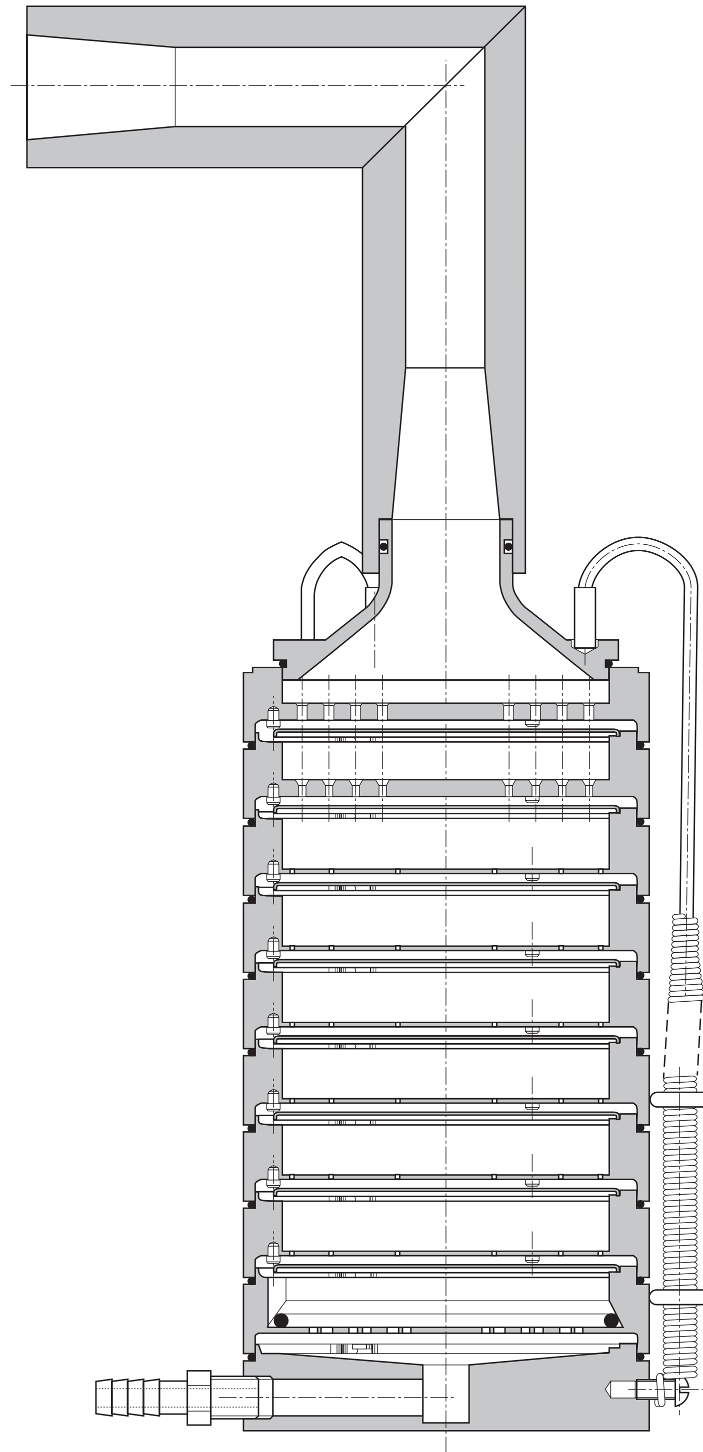


Figure 2.9.18.-9. – *Appareil D : impacteur à cascade Andersen utilisé pour les inhalateurs pressurisés*

Déterminez, par une méthode d'analyse appropriée, la quantité de substance active contenue dans chacun des volumes de solvant.

Calculez la dose des particules fines (voir Calcul).

**Mode opératoire applicable aux inhalateurs à poudre**

*Les diamètres de coupure des différents étages de cet appareil ne sont pas encore bien établis pour les débits autres que 28,3 L/min.* Il incombe aux utilisateurs de justifier et valider l'emploi de l'impacteur dans les conditions choisies lorsqu'ils opèrent à des débits différents de 28,3 L/min.

Placez dans l'appareil un filtre approprié, assemblez l'impacteur avec un pré-séparateur et vérifiez l'étanchéité du système. Dans certains cas justifiés et autorisés, en fonction des caractéristiques du produit, le pré-séparateur peut être omis. Les étages 6 et 7 peuvent également être omis aux débits élevés, sous réserve de justification. Le pré-séparateur peut recevoir le même traitement, favorisant la capture des particules, que les plaques ou peut contenir 10 mL d'un solvant approprié. Connectez l'appareil à un circuit hydraulique conforme au schéma de la figure 2.9.18.-8 et aux indications du tableau 2.9.18.-4.

Sauf indication contraire, effectuez l'essai au débit $Q_{out}$ utilisé dans l'essai d'uniformité de la dose délivrée, en aspirant 4 L d'air à travers l'appareil, depuis l'embout de l'inhalateur.

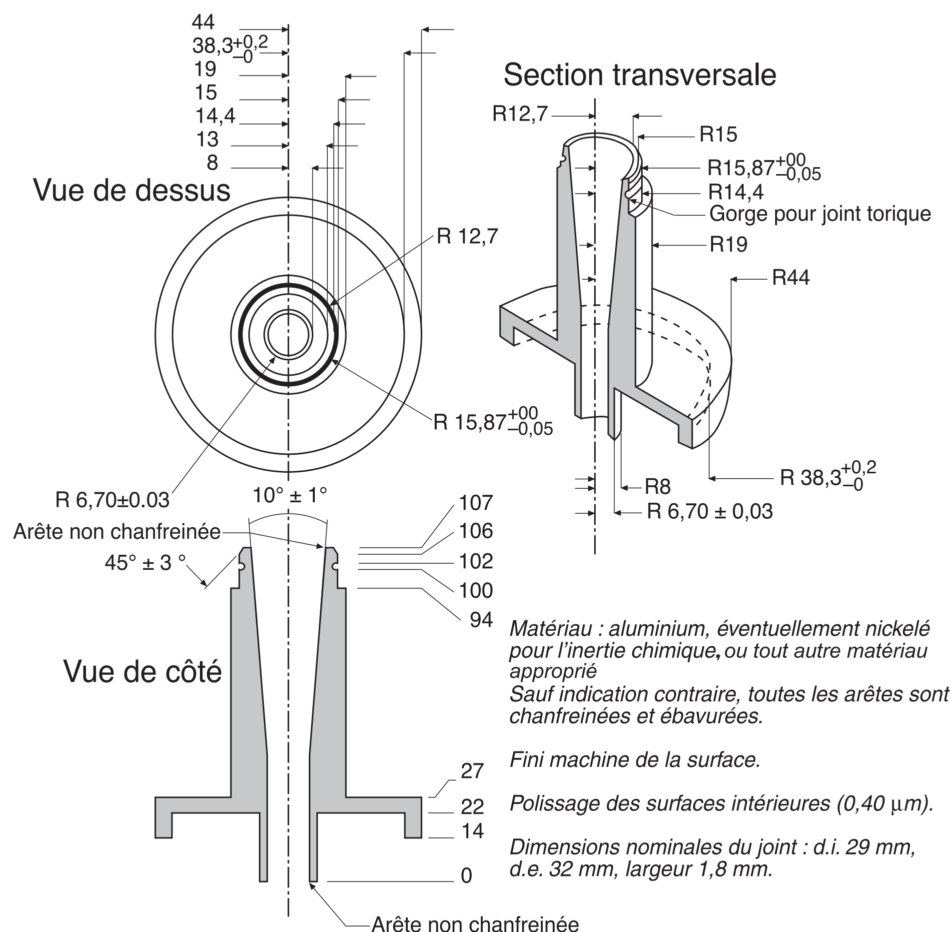



Figure 2.9.18.-10. – *Connexion de la tuyère au pré-séparateur de l'impacteur à cascade Andersen*

*Dimensions en millimètres sauf indication contraire*

Branchez sur la tuyère d'admission un débitmètre volumétrique. Utilisez un débitmètre étalonné pour le courant gazeux sortant ou calculez le débit gazeux en sortie du débitmètre ($Q_{out}$) d'après la loi des gaz parfaits. Dans le cas d'un débitmètre étalonné pour le courant gazeux entrant ($Q_{in}$), utilisez l'expression suivante :

$$Q_{out} = \frac{Q_{in} \times P_0}{P_0 - \Delta P}$$

$P_0$ = pression atmosphérique,

$\Delta P$ = perte de charge dans le débitmètre.

Ajustez le débit au moyen du régulateur de débit de façon à instaurer dans l'appareillage un régime stationnaire au débit $Q_{out}$ requis (± 5 pour cent). Vérifiez que le régime critique est instauré dans le régulateur de débit par la méthode décrite pour l'appareil C. Arrêtez la pompe.

Préparez l'inhalateur à poudre pour l'emploi comme indiqué dans la notice d'utilisation. Mettez la pompe en marche et fermez l'électrovanne, puis placez l'embout de l'inhalateur dans l'adaptateur. Provoquez une décharge de poudre dans l'appareil en ouvrant l'électrovanne pendant le temps *T* requis (± 5 pour cent). Répétez la procédure de décharge. Le nombre de décharges ainsi recueillies ne doit pas être trop élevé (en règle générale pas plus de 10), tout en étant suffisant pour permettre une détermination exacte et fidèle de la dose des particules fines.

Démontez l'appareil. Sortez le filtre avec précaution et procédez à l'extraction de la substance active au moyen d'un volume approprié de solvant. Démontez le pré-séparateur, la tuyère d'admission et l'adaptateur d'embout et procédez de même.

Récupérez les résidus de substance active déposés sur les parois et la plaque de dépôt de chacun des étages de l'appareil, au moyen de volumes appropriés de solvant.

Déterminez, par une méthode d'analyse appropriée, la quantité de substance active contenue dans chacun des volumes de solvant.

Calculez la dose des particules fines (voir Calcul).

APPAREIL E

L'appareil E est un impacteur à cascade comportant 7 étages et 1 collecteur terminal à micro-orifices (CMO). Sur la plage de débit allant de 30 L/min à 100 L/min, les diamètres de coupure correspondant à une efficacité de rétention de 50 pour cent (valeurs $D_{50}$) s'échelonnent de 0,24 µm à 11,7 µm, à intervalles constants sur une échelle logarithmique. Sur cette plage de débit, l'appareil comporte toujours au moins 5 étages dont les $D_{50}$ se situent entre 0,5 µm et 6,5 µm. Les courbes d'efficacité de rétention de chaque étage présentent un profil aigu, ce qui réduit autant que possible le chevauchement entre les étages.

L'appareil est constitué d'aluminium, d'acier inoxydable ou d'un autre matériau approprié.

L'appareil fonctionne avec des coupelles d'impaction amovibles, toutes situées dans un même plan (figures 2.9.18.-11/14). Il comprend 3 parties principales : une base qui comporte des logements destinés aux coupelles, un corps intermédiaire qui assure la fermeture hermétique des coupelles et porte les buses, et un couvercle à l'intérieur duquel s'effectue le passage entre les étages (figures 2.9.18.-11/12). Des buses à orifices multiples sont utilisées à tous les étages sauf le premier (figure 2.9.18.-13). La circulation de l'air à travers l'impacteur s'effectue selon un trajet en dents de scie.

Les dimensions critiques sont fournies dans le tableau 2.9.18.-6.

Tableau 2.9.18.-6. – *Dimensions critiques de l'appareil E*

| **Description** | **Dimension (mm)** |
|---|---|
| Pré-séparateur (dimension a - voir figure 2.9.18.-15) | 12,8 ± 0,05 |
| Diamètre de buse - étage 1* | 14,3 ± 0,05 |
| Diamètre de buse - étage 2* | 4,88 ± 0,04 |
| Diamètre de buse - étage 3* | 2,185 ± 0,02 |
| Diamètre de buse - étage 4* | 1,207 ± 0,01 |
| Diamètre de buse - étage 5* | 0,608 ± 0,01 |
| Diamètre de buse - étage 6* | 0,323 ± 0,01 |
| Diamètre de buse - étage 7* | 0,206 ± 0,01 |
| CMO* | approx. 0,070 |
| Profondeur de la coupelle (dimension b - voir figure 2.9.18.-14) | 14,625 ± 0,10 |
| Rugosité de la surface des coupelles (Ra) | 0,5 - 2 µm |
| Dimension c à l'étage 1** | 0 ± 1,18 |
| Dimension c à l'étage 2** | 5,236 ± 0,736 |
| Dimension c à l'étage 3** | 8,445 ± 0,410 |
| Dimension c à l'étage 4** | 11,379 ± 0,237 |
| Dimension c à l'étage 5** | 13,176 ± 0,341 |
| Dimension c à l'étage 6** | 13,999 ± 0,071 |
| Dimension c à l'étage 7** | 14,000 ± 0,071 |
| Dimension c au niveau du CMO** | 14,429 à 14,571 |

* Voir figure 2.9.18.-13
** Voir figure 2.9.18.-14

En fonctionnement de routine, le corps intermédiaire et le couvercle sont solidaires et forment un ensemble unique. Les coupelles d'impaction sont accessibles lorsque l'on ouvre l'appareil en fin d'essai. Elles sont logées dans un plateau-support, ce qui permet de les sortir toutes en même temps en soulevant le plateau.

Une tuyère d'admission, dont les dimensions internes (adaptées au trajet de circulation de l'air) sont définies figure 2.9.18.-7, vient se connecter à l'entrée de l'impacteur. Un pré-séparateur peut au besoin être ajouté, notamment pour les inhalateurs à poudre ; il s'intercale alors entre la tuyère d'admission et l'impacteur. Pour assurer une connexion étanche entre l'inhalateur et la tuyère d'admission, il convient d'utiliser un adaptateur d'embout approprié.

L'appareil E comporte un collecteur terminal à micro-orifices (CMO) qui permet, pour la plupart des formulations, d'éviter l'utilisation d'un filtre terminal (après validation du procédé). Le CMO est une plaque d'impaction dont la buse comporte nominalement 4032 trous d'un diamètre approximatif de 70 µm chacun. La plupart des particules non capturées à l'étage 7 de l'impacteur le sont sur la surface en coupelle située sous le CMO. Dans le cas d'impacteurs fonctionnant à un débit de 60 L/min, le CMO permet de collecter 80 pour cent des particules de 0,14 µm. Pour les formulations contenant une fraction significative de particules non retenues par le CMO, un porte-filtre optionnel est disponible ; il peut soit remplacer le CMO soit être monté en aval (un filtre en fibre de verre convient).

**Mode opératoire applicable aux inhalateurs pressurisés**

Installez des coupelles dans les logements du plateau. Mettez le plateau en place dans la base, puis fermez le couvercle (avec le corps intermédiaire en place) et manoeuvrez la poignée pour verrouiller le tout de façon que le système soit étanche.

Connectez à l'orifice d'entrée de l'impacteur une tuyère d'admission de dimensions internes telles que définies figure 2.9.18.-7. A l'autre extrémité de la tuyère, installez un adaptateur approprié de telle sorte que l'embout du diffuseur, une fois inséré dans l'adaptateur, soit aligné sur l'axe horizontal de la tuyère. La face avant de l'embout et celle de la tuyère doivent être alignées dans un même plan. Lorsqu'il est assemblé à l'adaptateur d'embout, l'inhalateur doit être

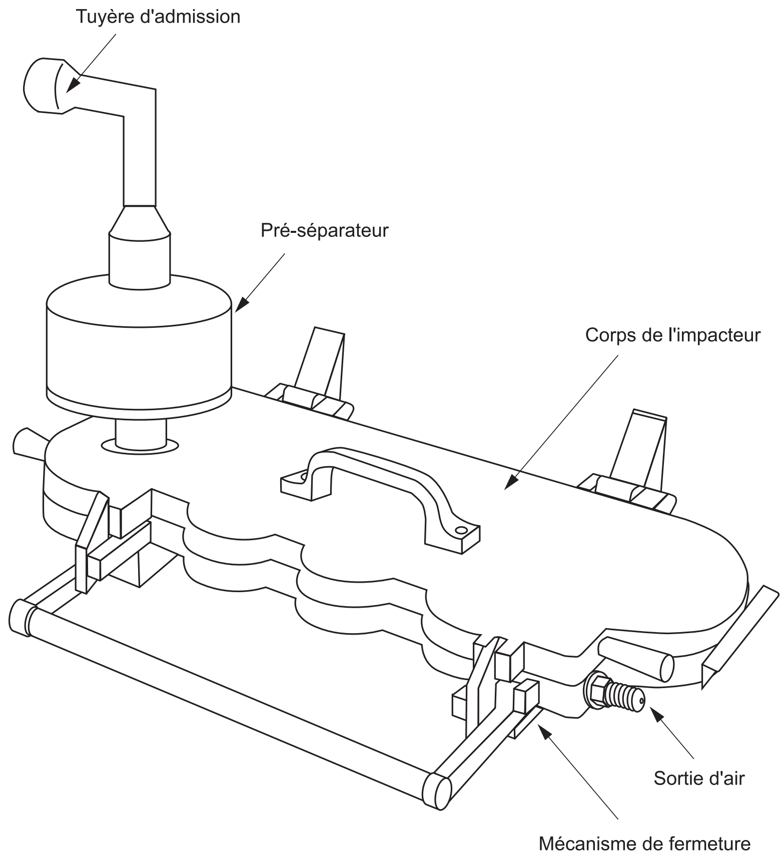



Figure 2.9.18.-11. – *Appareil E (représenté avec le pré-séparateur en place)*

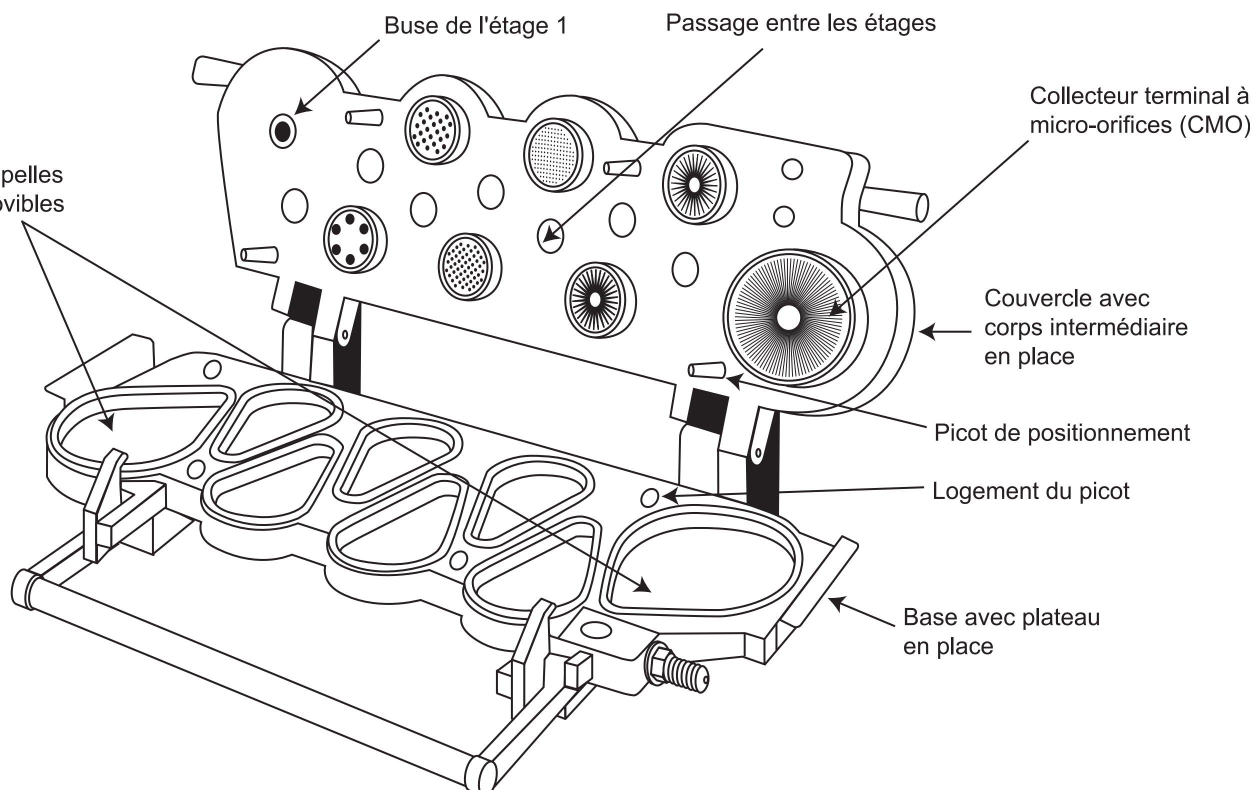



Figure 2.9.18.-12. − *Eléments composant l'appareil E*

orienté comme indiqué pour l'emploi normal. Branchez une pompe appropriée à la sortie de l'appareil et réglez le débit d'air traversant l'appareil (mesuré à l'entrée de la tuyère d'admission) à 30 L/min (± 5 pour cent). Arrêtez la pompe.

Sauf indication contraire dans la notice d'utilisation, agitez l'inhalateur pendant 5 s et actionnez une fois à perte. Mettez la pompe en marche. Préparez l'inhalateur pour l'emploi comme indiqué dans la notice d'utilisation. Placez l'embout du diffuseur dans l'adaptateur et déchargez l'inhalateur dans l'appareil, en appuyant sur la valve le temps voulu pour obtenir une décharge complète. Attendez 5 s avant de séparer l'ensemble de l'inhalateur de l'adaptateur. Répétez la procédure de décharge. Le nombre de décharges ainsi recueillies ne doit pas être trop élevé (en règle générale pas plus de 10), tout en étant suffisant pour permettre une détermination exacte et fidèle de la dose des particules fines. Après la dernière décharge, attendez 5 s puis arrêtez la pompe.

Démontez l'appareil, puis procédez comme suit pour recueillir la substance active : démontez la tuyère d'admission et l'adaptateur d'embout et recueillez la substance active déposée avec un volume approprié de solvant. Ouvrez l'appareil en déverrouillant la poignée et soulevez le couvercle. Sortez le plateau avec les coupelles et recueillez la substance active déposée dans chaque coupelle avec un volume approprié de solvant.

Déterminez, par une méthode d'analyse appropriée, la quantité de substance active contenue dans chacun des volumes de solvant.

Calculez la dose des particules fines (voir Calcul).

**Mode opératoire applicable aux inhalateurs à poudre**

Assemblez l'appareil et le pré-séparateur (figure 2.9.18.-15). Dans certains cas justifiés, en fonction des caractéristiques du produit, le pré-séparateur peut être omis.

Installez des coupelles dans les logements du plateau. Mettez le plateau en place dans la base, puis fermez le couvercle (avec le corps intermédiaire en place) et manoeuvrez la poignée pour verrouiller le tout de façon que le système soit étanche.

Pour installer un pré-séparateur, procédez comme suit. Placez l'insert sur la base du pré-séparateur. Montez la base du pré-séparateur à l'entrée de l'impacteur, puis remplissez la coupelle centrale de l'insert avec 15 mL du solvant utilisé pour l'extraction de la substance active. Placez le corps du pré-séparateur sur le tout et fermez les 2 cliquets.

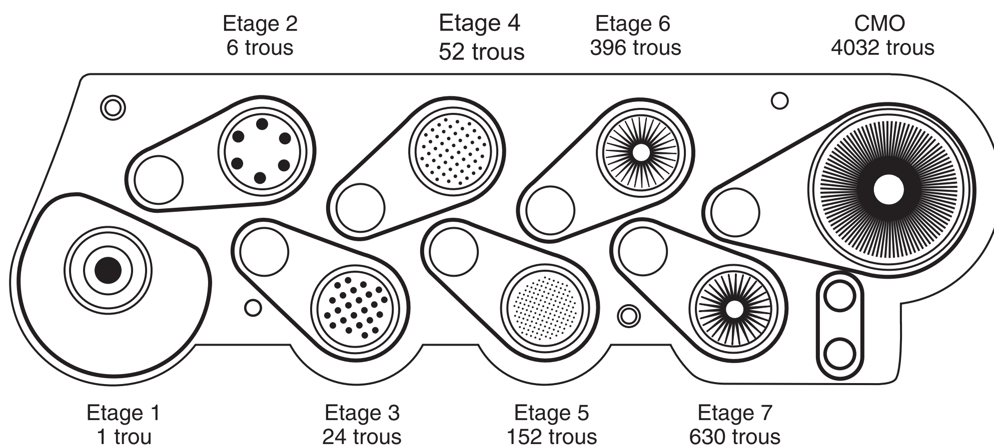



Figure 2.9.18.-13. − *Appareil E : configuration des buses*

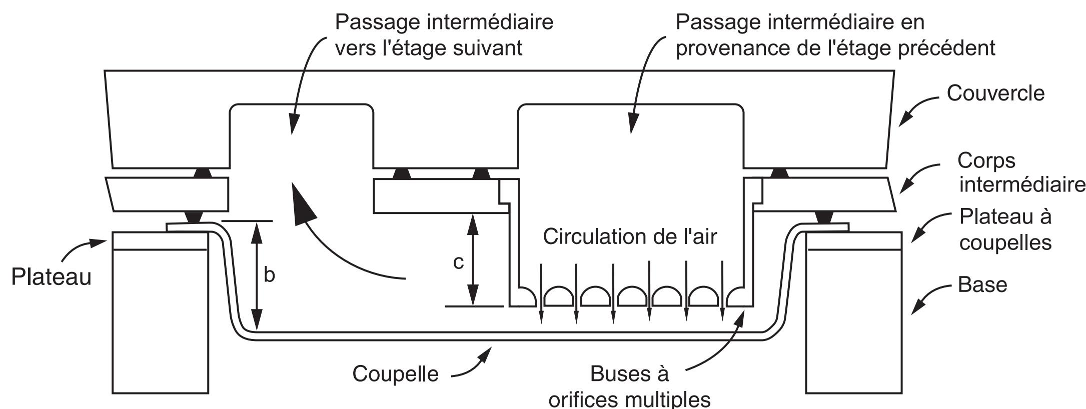



Figure 2.9.18.-14. – *Appareil E : circulation entre les étages*

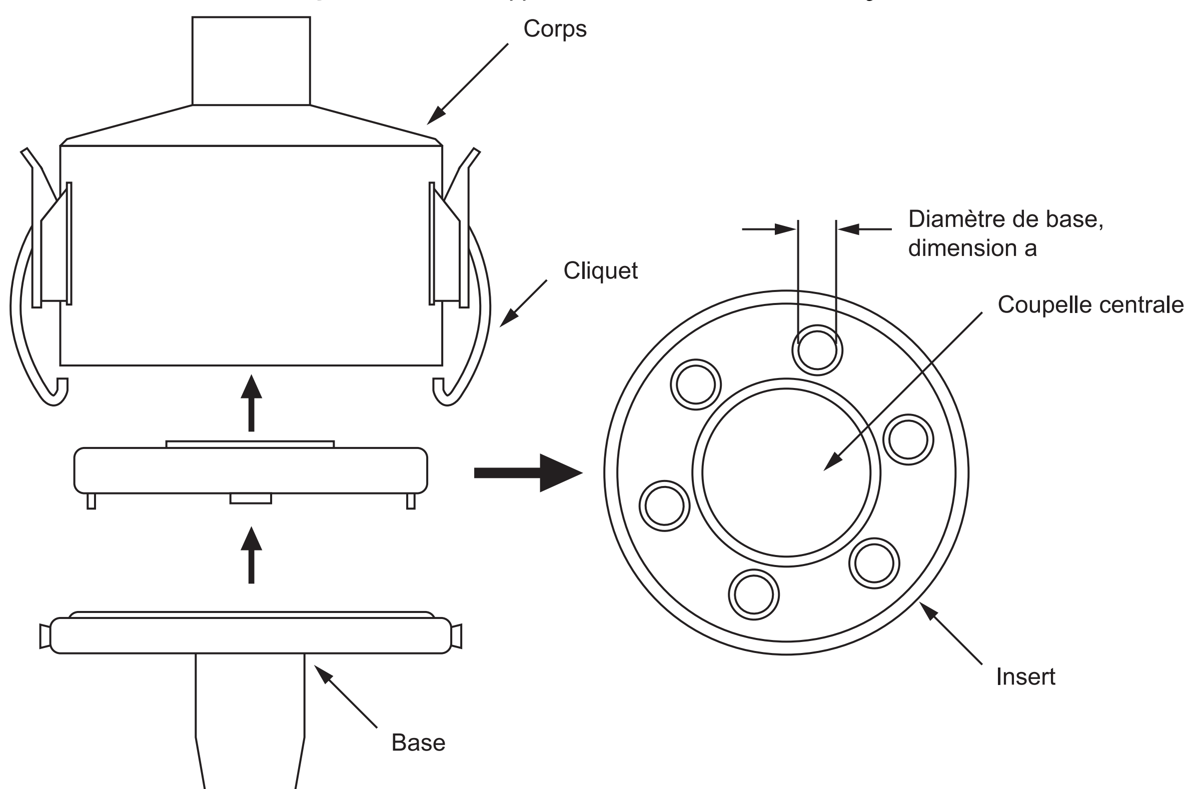



Figure 2.9.18.-15. – *Appareil E : configuration du pré-séparateur*

Connectez à l'orifice d'entrée de l'impacteur, ou du pré-séparateur, une tuyère d'admission de dimensions internes telles que définies figure 2.9.18.-7. A l'autre extrémité de la tuyère, installez un adaptateur approprié de telle sorte que l'embout de l'inhalateur, une fois inséré dans l'adaptateur, soit aligné sur l'axe horizontal de la tuyère. La face avant de l'embout et celle de la tuyère doivent être alignées dans un même plan. Lorsqu'il est assemblé à l'adaptateur, l'inhalateur doit être orienté comme indiqué pour l'emploi normal. Connectez l'appareil à un circuit hydraulique conforme au schéma de la figure 2.9.18.-8 et au tableau 2.9.18.-4.

Sauf indication contraire, effectuez l'essai au débit $Q_{out}$ utilisé dans l'essai d'uniformité de la dose délivrée, en aspirant 4 L d'air à travers l'appareil, depuis l'embout de l'inhalateur. Branchez sur la tuyère d'admission un débitmètre volumétrique. Utilisez un débitmètre étalonné pour le courant gazeux sortant, ou calculez le débit gazeux en sortie du débitmètre ($Q_{out}$) d'après la loi des gaz parfaits. Dans le cas d'un débitmètre étalonné pour le courant gazeux entrant ($Q_{in}$), utilisez l'expression suivante :

$$Q_{out} = \frac{Q_{in} \times P_0}{P_0 - \Delta P}$$

$P_0$ = pression atmosphérique,

$\Delta P$ = perte de charge dans le débitmètre.

Ajustez le débit au moyen du régulateur de débit de façon à instaurer dans l'appareillage un régime stationnaire au débit $Q_{out}$ requis (± 5 pour cent). Vérifiez que le régime critique est instauré dans le régulateur de débit par la méthode décrite pour l'appareil C. Arrêtez la pompe.

Préparez l'inhalateur à poudre pour l'emploi comme indiqué dans la notice d'utilisation. Mettez la pompe en marche et fermez l'électrovanne, puis placez l'embout de l'inhalateur dans l'adaptateur. Provoquez une décharge de poudre dans l'appareil en ouvrant l'électrovanne pendant le temps *T* requis (± 5 pour cent). Répétez la procédure de décharge. Le nombre de décharges ainsi recueillies ne doit pas être trop élevé (en règle générale pas plus de 10), tout en étant suffisant pour permettre une détermination exacte et fidèle de la dose des particules fines.

Démontez l'appareil, puis procédez comme suit pour recueillir la substance active. Séparez la tuyère d'admission et l'adaptateur d'embout du pré-séparateur (le cas échéant) et recueillez la substance active déposée au moyen d'un volume approprié de solvant. Séparez (le cas échéant) le pré-séparateur de

l'impacteur, en veillant à ne pas introduire dans l'impacteur du liquide contenu dans la coupelle, puis recueillez la substance active contenue dans le pré-séparateur.

Ouvrez l'impacteur en déverrouillant la poignée et soulevez le couvercle. Sortez le plateau avec les coupelles et recueillez la substance active déposée dans chaque coupelle avec un volume approprié de solvant.

Déterminez, par une méthode d'analyse appropriée, la quantité de substance active contenue dans chacun des volumes de solvant.

Calculez la dose des particules fines (voir Calcul).

CALCUL

A partir du résultat de l'analyse des solutions, calculez la masse de substance active déposée lors de chaque décharge aux différents étages ainsi que dans la tuyère d'admission, l'adaptateur d'embout et, le cas échéant, le pré-séparateur.

En commençant par le site de collecte terminal (filtre ou CMO), calculez pour chacun des étages la masse cumulée en fonction du diamètre de coupure de l'étage, en présentant les résultats sous forme de tableau (voir tableaux 2.9.18.-7 pour l'appareil C, 2.9.18.-8 pour l'appareil D, 2.9.18.-9 pour l'appareil E). Calculez par interpolation la masse de substance active de granulométrie inférieure à 5 μm. Cette masse représente la dose des particules fines (DPF).

Si nécessaire et dans les cas appropriés (par exemple en cas de distribution log-normale), tracez sur papier logarithmique le graphe de la fraction cumulée de substance active en fonction du diamètre de coupure (voir tableaux 2.9.18.-7/9), et utilisez ce graphe pour déterminer la valeur du diamètre aérodynamique médian massique (DAMM) ou de l'écart type géométrique (ETG), selon le cas. Des méthodes informatiques appropriées peuvent également être utilisées.

Tableau 2.9.18.-7. – *Méthode de calcul pour l'appareil C. Utilisez* $q = \sqrt{(60/Q)}$ *où Q est le débit en litres par minute* ($Q_{out}$ *pour les inhalateurs à poudre)*

| **Diamètre de coupure (μm)** | **Masse de substance active déposée par décharge** | **Masse cumulée de substance active déposée par décharge** | **Fraction cumulée de substance active (pour cent)** |
|---|---|---|---|
| $d_4 = 1{,}7 \times q$ | masse recueillie à l'étage 5, $m_5$* | $c_4 = m_5$ | $f_4 = (c_4/c) \times 100$ |
| $d_3 = 3{,}1 \times q$ | masse recueillie à l'étage 4, $m_4$ | $c_3 = c_4 + m_4$ | $f_3 = (c_3/c) \times 100$ |
| $d_2 = 6{,}8 \times q$ | masse recueillie à l'étage 3, $m_3$ | $c_2 = c_3 + m_3$ | $f_2 = (c_2/c) \times 100$ |
| | masse recueillie à l'étage 2, $m_2$ | $c = c_2 + m_2$ | 100 |

* L'étage 5 est l'étage de filtration.

Tableau 2.9.18.-8. – *Méthode de calcul pour l'appareil D utilisé à un débit de 28,3 L/min*

| **Diamètre de coupure (μm)** | **Masse de substance active déposée par décharge** | **Masse cumulée de substance active déposée par décharge** | **Fraction cumulée de substance active (pour cent)** |
|---|---|---|---|
| $d_7 = 0{,}4$ | masse recueillie à l'étage 8, $m_8$ | $c_7 = m_8$ | $f_7 = (c_7/c) \times 100$ |
| $d_6 = 0{,}7$ | masse recueillie à l'étage 7, $m_7$ | $c_6 = c_7 + m_7$ | $f_6 = (c_6/c) \times 100$ |
| $d_5 = 1{,}1$ | masse recueillie à l'étage 6, $m_6$ | $c_5 = c_6 + m_6$ | $f_5 = (c_5/c) \times 100$ |
| $d_4 = 2{,}1$ | masse recueillie à l'étage 5, $m_5$ | $c_4 = c_5 + m_5$ | $f_4 = (c_4/c) \times 100$ |
| $d_3 = 3{,}3$ | masse recueillie à l'étage 4, $m_4$ | $c_3 = c_4 + m_4$ | $f_3 = (c_3/c) \times 100$ |
| $d_2 = 4{,}7$ | masse recueillie à l'étage 3, $m_3$ | $c_2 = c_3 + m_3$ | $f_2 = (c_2/c) \times 100$ |
| $d_1 = 5{,}8$ | masse recueillie à l'étage 2, $m_2$ | $c_1 = c_2 + m_2$ | $f_1 = (c_1/c) \times 100$ |
| $d_0 = 9{,}0$ | masse recueillie à l'étage 1, $m_1$ | $c_0 = c_1 + m_1$ | $f_0 = (c_0/c) \times 100$ |
| | masse recueillie à l'étage 0, $m_0$ | $c = c_0 + m_0$ | 100 |

Tableau 2.9.18.-9. – *Méthode de calcul pour l'appareil E. Utilisez* $q = (60/Q)^x$ *où Q est le débit utilisé, en litres par minute, et x est donné dans le tableau*

| **Diamètre de coupure (μm)** | **x** | **Masse de substance active déposée par décharge** | **Masse cumulée de substance active déposée par décharge** | **Fraction cumulée de substance active (pour cent)** |
|---|---|---|---|---|
| $d_7 = 0{,}34 \times q$ | 0,67 | masse recueillie dans le CMO ou le filtre terminal, $m_8$ | $c_7 = m_8$ | $F_7 = (c_7/c) \times 100$ |
| $d_6 = 0{,}55 \times q$ | 0,60 | masse recueillie à l'étage 7, $m_7$ | $c_6 = c_7 + m_7$ | $F_6 = (c_6/c) \times 100$ |
| $d_5 = 0{,}94 \times q$ | 0,53 | masse recueillie à l'étage 6, $m_6$ | $c_5 = c_6 + m_6$ | $F_5 = (c_5/c) \times 100$ |
| $d_4 = 1{,}66 \times q$ | 0,47 | masse recueillie à l'étage 5, $m_5$ | $c_4 = c_5 + m_5$ | $F_4 = (c_4/c) \times 100$ |
| $d_3 = 2{,}82 \times q$ | 0,50 | masse recueillie à l'étage 4, $m_4$ | $c_3 = c_4 + m_4$ | $F_3 = (c_3/c) \times 100$ |
| $d_2 = 4{,}46 \times q$ | 0,52 | masse recueillie à l'étage 3, $m_3$ | $c_2 = c_3 + m_3$ | $F_2 = (c_2/c) \times 100$ |
| $d_1 = 8{,}06 \times q$ | 0,54 | masse recueillie à l'étage 2, $m_2$ | $c_1 = c_2 + m_2$ | $F_1 = (c_1/c) \times 100$ |
| | | masse recueillie à l'étage 1, $m_1$ | $c = c_1 + m_1$ | 100 |

**01/2008:20919**

# 2.9.19. CONTAMINATION PARTICULAIRE : PARTICULES NON VISIBLES

La contamination particulaire des préparations injectables et des préparations pour perfusion est composée des particules étrangères, non dissoutes et mobiles, autres que des bulles de gaz, qui ont été involontairement introduites dans ces préparations.

Pour la détermination de la contamination particulaire, 2 procédés sont spécifiés ci-après : méthode 1 (essai de comptage des particules par blocage de la lumière) et méthode 2 (essai de comptage des particules au microscope optique). Pour la recherche des particules non visibles dans les préparations injectables et les préparations pour perfusion, utilisez de préférence la méthode 1. Il peut toutefois être nécessaire de réaliser sur certaines préparations l'essai de comptage des particules par blocage de la lumière en premier lieu, puis l'essai de comptage des particules au microscope optique, pour pouvoir conclure quant à la conformité des résultats obtenus.

La recherche des particules non visibles effectuée en appliquant l'une de ces méthodes, voire les deux, n'est pas possible pour toutes les préparations parentérales. Lorsque la méthode 1 n'est pas applicable, par exemple dans le cas des préparations à faible limpidité ou à forte viscosité, l'essai est réalisé selon la méthode 2 (cas des émulsions, des colloïdes et des préparations liposomales). De même, un essai de comptage des particules au microscope optique peut également être exigé dans le cas de produits entraînant la formation de bulles d'air ou de gaz lorsqu'ils passent à travers le détecteur. Si la viscosité de la préparation à examiner est telle que l'examen par l'une ou l'autre méthode est impossible, une dilution quantitative avec un diluant approprié peut être effectuée, afin de réduire la viscosité au degré jugé nécessaire pour permettre l'analyse.

Les résultats obtenus en examinant la contamination particulaire d'une unité ou d'un groupe d'unités ne peuvent être extrapolés avec certitude par rapport à d'autres unités qui n'ont pas été testées. Par conséquent, il convient de mettre au point des plans d'échantillonnage statistiquement valides, si l'on veut tirer des conclusions valables à partir des données observées, pour déterminer le degré de contamination particulaire dans un grand groupe d'unités.

## MÉTHODE 1. ESSAI DE COMPTAGE DES PARTICULES PAR BLOCAGE DE LA LUMIÈRE

Utilisez un appareil approprié, basé sur le principe de l'interception d'un rayon lumineux, permettant la détermination automatique de la taille des particules et le nombre de celles-ci par taille.

L'appareil est étalonné à l'aide de substances de référence certifiées appropriées consistant en des dispersions de particules sphériques de taille connue et comprise entre 10 µm et 25 µm. Ces particules de référence sont dispersées dans de l'*eau exempte de particules R*, en évitant l'agglomération des particules.

### Précautions générales

Effectuez l'essai dans des conditions limitant la contamination particulaire, de préférence dans une enceinte à flux laminaire.

Lavez très soigneusement la verrerie utilisée et le matériel de filtration, à l'exception des membranes filtrantes, avec une solution détergente chaude, puis rincez abondamment à l'eau pour éliminer toute trace de solution détergente. Immédiatement avant utilisation, rincez le matériel de haut en bas, à l'extérieur, puis à l'intérieur, avec de l'*eau exempte de particules R*.

Evitez d'introduire des bulles d'air dans la préparation à examiner, spécialement lors du transfert des fractions de la préparation dans le récipient dans lequel la détermination est réalisée.

Afin de vérifier que l'environnement est approprié à l'essai, que la verrerie est nettoyée de manière convenable et que l'eau utilisée est exempte de particules, effectuez l'essai suivant : déterminez la contamination particulaire de 5 échantillons d'*eau exempte de particules R*, de 5 mL chacun, en suivant le mode opératoire décrit ci-après. Si le nombre de particules de 10 µm ou plus est supérieur à 25 pour les 25 mL réunis, les précautions prises pour l'essai ne sont pas suffisantes et les manipulations préparatoires doivent être répétées jusqu'à ce que l'environnement, la verrerie et l'eau soient appropriés à l'essai.

### Mode opératoire

Mélangez le contenu de l'échantillon par 20 retournements lents et successifs du récipient. Otez avec précaution, si nécessaire, la capsule de scellage. Nettoyez les surfaces externes de l'ouverture du flacon à l'aide d'un jet d'*eau exempte de particules R* et retirez l'obturateur en évitant toute contamination du contenu. Eliminez les bulles de gaz par des mesures appropriées, par exemple en laissant reposer la solution pendant 2 min ou en appliquant un traitement aux ultrasons.

Dans le cas des préparations parentérales de grand volume, effectuez l'essai sur des unités de prise. Concernant les préparations parentérales de petit volume, dont le volume est inférieur à 25 mL, le contenu de 10 unités ou plus est réuni dans un récipient nettoyé de façon à obtenir un volume d'au minimum 25 mL ; dans les cas justifiés et autorisés, la solution à examiner peut être préparée en mélangeant le contenu d'un nombre approprié de fioles et en complétant la solution à 25 mL avec de l'*eau exempte de particules R* ou un solvant convenable exempt de contamination particulaire, lorsque l'*eau exempte de particules R* n'est pas appropriée. Les préparations parentérales de petit volume, dont le volume est supérieur ou égal à 25 mL, peuvent être examinées individuellement.

Dans le cas des poudres pour administration parentérale, reconstituez la préparation avec de l'*eau exempte de particules R* ou un solvant convenable exempt de contamination particulaire, lorsque l'*eau exempte de particules R* n'est pas appropriée.

Le nombre d'échantillons doit être suffisant pour permettre une évaluation statistiquement valide. Dans le cas de préparations parentérales de grand volume ou de préparations parentérales de petit volume dont le volume est supérieur ou égal à 25 mL, moins de 10 unités peuvent être examinées, sur la base d'un plan d'échantillonnage approprié.

Prélevez à 4 reprises une quantité supérieure ou égale à 5 mL. Déterminez le nombre de particules de taille supérieure ou égale à 10 µm et à 25 µm. Calculez le nombre moyen de particules dans la préparation à examiner sans tenir compte du résultat obtenu avec la première fraction.

### Evaluation

Dans le cas des préparations conditionnées en récipients de contenance nominale supérieure à 100 mL, appliquez les critères de l'essai 1.A.

Dans le cas des préparations conditionnées en récipients de contenance nominale inférieure à 100 mL, appliquez les critères de l'essai 1.B.

Dans le cas des préparations conditionnées en récipients de contenance nominale égale à 100 mL, appliquez les critères de l'essai 1B.

Si le nombre moyen de particules dépasse les limites, effectuez l'essai de comptage des particules au microscope optique.

*Essai 1.A − Solutions pour perfusion et solutions injectables conditionnées en récipients de contenance nominale supérieure à 100 mL*

La préparation satisfait à l'essai si le nombre moyen de particules présentes dans les unités examinées n'est pas supérieur à 25 par millilitre pour les particules de taille supérieure ou égale à 10 µm et à 3 par millilitre pour les particules de taille supérieure ou égale à 25 µm.

*Essai 1.B – Solutions pour perfusion ou solutions injectables conditionnées en récipients de contenance nominale inférieure à 100 mL.*

La préparation satisfait à l'essai si le nombre moyen de particules présentes dans les unités examinées n'est pas supérieur à 6000 par récipient pour les particules de taille supérieure ou égale à 10 µm et à 600 par récipient pour les particules de taille supérieure ou égale à 25 µm.

MÉTHODE 2. ESSAI DE COMPTAGE DES PARTICULES AU MICROSCOPE OPTIQUE

Utilisez un microscope binoculaire approprié, un dispositif de filtration pour retenir la contamination particulaire et une membrane filtrante.

Le microscope est équipé d'un micromètre oculaire étalonné à l'aide d'un micromètre objectif, d'une platine à mouvements croisés capable de maintenir et de traverser toute la surface de filtration de la membrane filtrante, de 2 illuminateurs appropriés permettant un éclairage épiscopique et un éclairage oblique, et est ajusté à un grossissement de 100 ± 10.

Le micromètre oculaire est un réticule circulaire (voir Figure 2.9.19-1) et comprend un grand cercle divisé en quartiers par des croisées, des cercles de référence noirs et transparents d'un diamètre de 10 µm et de 25 µm à un grossissement de 100, et une échelle linéaire graduée tous les 10 µm. Il est étalonné à l'aide d'un micromètre objectif certifié par une organisation internationale ou nationale de normalisation. Une erreur relative de ± 2 pour cent sur l'échelle linéaire du réticule est acceptable. Le grand cercle est appelé champ de visée du réticule (GFOV).

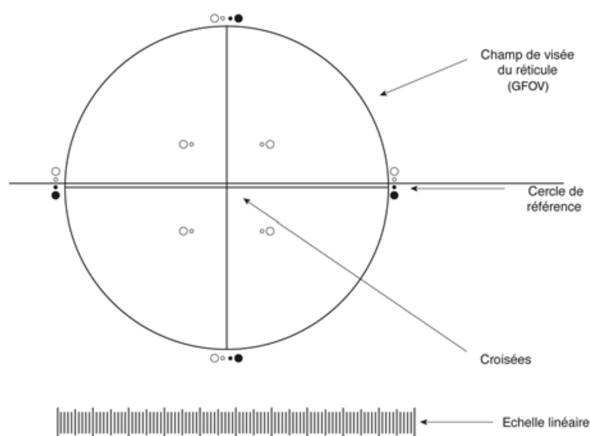



Figure 2.9.19.-1. – *Réticule circulaire*

2 illuminateurs sont nécessaires, un illuminateur épiscopique pour fond clair, interne au microscope, et un illuminateur auxiliaire externe, avec mise au point réglable, ajustable pour permettre un éclairage oblique réfléchi selon un angle de 10-20°.

Le dispositif de filtration destiné à retenir la contamination particulaire comprend un support de filtre en verre ou en un autre matériau convenable, une source de vide et une membrane filtrante adéquate.

La membrane filtrante, de dimensions appropriées, est de couleur noire ou gris foncé ; elle est recouverte ou non d'une grille et la taille des pores est inférieure ou égale à 1,0 µm.

**Précautions générales**

Effectuez l'essai dans des conditions limitant la contamination particulaire, de préférence dans une enceinte à flux laminaire.

Lavez très soigneusement la verrerie utilisée et le système de filtration, à l'exception de la membrane filtrante, avec une solution détergente chaude, puis rincez abondamment à l'eau pour éliminer toute trace de solution détergente. Immédiatement avant utilisation, rincez les 2 côtés de la membrane filtrante et le matériel de haut en bas, à l'extérieur, puis à l'intérieur, avec de l'*eau exempte de particules R*.

Afin de vérifier que l'environnement est approprié à l'essai, que la verrerie et la membrane filtrante sont nettoyées de manière convenable et que l'eau utilisée est exempte de particules, effectuez l'essai suivant : déterminez la contamination particulaire sur un volume de 50 mL d'*eau exempte de particules R* en suivant le mode opératoire décrit ci-après. Lorsque la surface de filtration comporte un nombre de particules de 10 µm ou plus supérieur à 20 ou un nombre de particules de 25 µm ou plus supérieur à 5, les précautions prises pour l'essai ne sont pas suffisantes et les manipulations préparatoires doivent être répétées jusqu'à ce que l'environnement, la verrerie, la membrane filtrante et l'eau soient appropriés à l'essai.

**Mode opératoire**

Mélangez le contenu de l'échantillon par 20 retournements lents et successifs du récipient. Otez avec précaution, si nécessaire, la capsule de scellage. Nettoyez les surfaces externes de l'ouverture du flacon à l'aide d'un jet d'*eau exempte de particules R* et retirez l'obturateur en évitant toute contamination du contenu.

Dans le cas des préparations parentérales de grand volume, effectuez l'essai sur des unités de prise. Dans le cas des préparations de petit volume, dont le volume est inférieur à 25 mL, le contenu de 10 unités ou plus est réuni dans un récipient nettoyé ; dans les cas justifiés et autorisés, la solution à examiner peut être préparée en mélangeant le contenu d'un nombre approprié de fioles et en complétant à 25 mL avec de l'*eau exempte de particules R* ou un solvant convenable exempt de contamination particulaire, lorsque l'*eau exempte de particules R* n'est pas appropriée. Les préparations parentérales de petit volume dont le volume est supérieur ou égal à 25 mL, peuvent être examinées individuellement.

Dans le cas des poudres pour administration parentérale, reconstituez la préparation avec de l'*eau exempte de particules R* ou un solvant convenable exempt de contamination particulaire lorsque l'*eau exempte de particules R* n'est pas appropriée.

Le nombre d'échantillons doit être suffisant pour permettre une évaluation statistiquement valide. Dans le cas de préparations parentérales de grand volume ou de préparations de petit volume dont le volume est supérieur ou égal à 25 mL, moins de 10 unités peuvent être examinées individuellement, sur la base d'un plan d'échantillonnage approprié.

Humidifiez l'intérieur du support de filtre muni de la membrane filtrante avec quelques millilitres d'*eau exempte de particules R*. Transvasez dans l'entonnoir la totalité de l'échantillon à analyser (mélange de prises d'essai ou unité de prise) et appliquez le vide. Si nécessaire, ajoutez petit à petit une fraction de la solution jusqu'à ce que le volume entier soit filtré. Après la dernière addition, commencez le rinçage des parois intérieures du support de filtre en utilisant un jet d'*eau exempte de particules R*. Maintenez le vide jusqu'à ce que la surface de la membrane filtrante soit exempte de liquide. Placez le filtre dans une boîte de Pétri et faites-le sécher à l'air en laissant la boîte légèrement ouverte. Lorsque le filtre est sec, placez la boîte de Pétri sur la platine du microscope, effectuez un balayage de la membrane filtrante entière sous la lumière réfléchie de l'illuminateur, et comptez le nombre de particules de taille supérieure ou égale à 10 µm et le nombre de particules de taille supérieure ou égale à 25 µm. Il est également possible d'effectuer un comptage partiel et de déterminer par calcul le nombre total de particules retenues sur le filtre. Calculez le nombre moyen de particules présentes dans la préparation à examiner.

Pour déterminer la taille des particules à l'aide du réticule circulaire, opérez une transformation mentale de l'image de chaque particule en un cercle, puis comparez-la aux cercles de référence du réticule de 10 µm et de 25 µm. Ainsi, les particules gardent leur position initiale à l'intérieur du champ de visée du réticule et ne sont pas superposées aux cercles de référence pour les besoins de la comparaison. Le diamètre intérieur des cercles de référence transparents du réticule est utilisé pour déterminer la taille des particules blanches et transparentes, alors que la taille des particules sombres est déterminée à l'aide du diamètre extérieur des cercles de référence noirs et opaques du réticule.

En réalisant l'essai de comptage des particules au microscope, ne cherchez pas à mesurer ou à énumérer les matières amorphes, semi-liquides, ou encore morphologiquement indistinctes, qui ressemblent à une tache ou à une zone décolorée de la membrane filtrante. Ces matières peuvent présenter un relief faible ou nul et revêtir un aspect gélatineux ou l'apparence d'un film. L'interprétation de l'énumération peut alors être facilitée en réalisant l'essai de comptage des particules par blocage de la lumière sur un échantillon de la solution.

**Evaluation**

Dans le cas des préparations conditionnées en récipients de contenance nominale supérieure à 100 mL, appliquez les critères de l'essai 2.A.

Dans le cas des préparations conditionnées en récipients de contenance nominale inférieure à 100 mL, appliquez les critères de l'essai 2.B.

Dans le cas des préparations conditionnées en récipients de contenance nominale égale à 100 mL, appliquez les critères de l'essai 2.B.

*Essai 2.A – Solutions pour perfusion et solutions injectables conditionnées en récipients de contenance nominale supérieure à 100 mL*

La préparation satisfait à l'essai si le nombre moyen de particules présentes dans les unités examinées n'est pas supérieur à 12 par millilitre pour les particules de taille supérieure ou égale à 10 µm et à 2 par millilitre pour les particules de taille supérieure ou égale à 25 µm.

*Essai 2.B – Solutions pour perfusion et solutions injectables conditionnées en récipient de contenance nominale inférieure à 100 mL*

La préparation satisfait à l'essai si le nombre moyen de particules présentes dans les unités examinées n'est pas supérieur à 3000 par récipient pour les particules de taille supérieure ou égale à 10 µm et à 300 par récipient pour les particules de taille supérieure ou égale à 25 µm.

**01/2008:20920**

## 2.9.20. CONTAMINATION PARTICULAIRE : PARTICULES VISIBLES

La contamination particulaire des préparations injectables et des préparations pour perfusion est composée de particules étrangères, non dissoutes et mobiles autres que des bulles de gaz et qui se trouvent involontairement dans ces solutions.

L'objectif de l'essai est de fournir une méthode simple d'évaluation visuelle de la qualité des solutions parentérales en ce qui concerne les particules visibles. D'autres méthodes validées peuvent être utilisées.

APPAREILLAGE

L'appareillage (voir figure 2.9.20.-1) se compose d'un poste d'observation comprenant :

– un panneau noir mat de dimensions appropriées, placé en position verticale,
– un panneau blanc anti-éblouissant de dimensions appropriées, placé en position verticale à côté du panneau noir,
– une rampe d'éclairage orientable comportant une source de lumière blanche protégée et un diffuseur appropriés (une rampe comprenant 2 tubes fluorescents de 13 W et d'une longueur de 525 mm chacun est appropriée). L'éclairement au point d'observation est maintenu entre 2000 lux et 3750 lux, bien qu'il soit préférable d'utiliser un éclairement plus élevé pour les récipients en verre coloré ou en plastique.

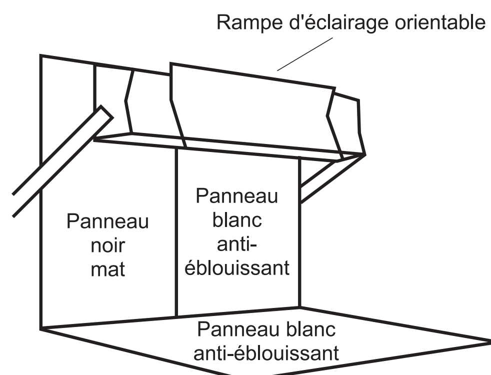



Figure 2.9.20.-1. – *Appareillage pour les particules visibles*

MODE OPÉRATOIRE

Décollez éventuellement les étiquettes, puis lavez et séchez l'extérieur du récipient. Agitez doucement ou renversez le récipient avec précaution, en veillant à éviter la formation de bulles d'air, puis observez-le pendant 5 s environ contre le panneau blanc. Répétez cette opération contre le panneau noir. Notez la présence de toute particule.

**01/2008:20922**

## 2.9.22. TEMPS DE RAMOLLISSEMENT DES SUPPOSITOIRES LIPOPHILES

Cet essai est destiné à déterminer, dans des conditions définies, le temps écoulé jusqu'à ce qu'un suppositoire placé dans l'eau soit suffisamment ramolli pour ne plus offrir de résistance à une charge définie.

APPAREILLAGE A

L'appareil (figure 2.9.22.-1) est constitué par un tube de verre à fond plat d'un diamètre intérieur de 15,5 mm et d'une longueur d'environ 140 mm. Un couvercle amovible de matière plastique, comportant un orifice de 5,2 mm de diamètre, sert de fermeture. L'appareil comprend une tige de 5,0 mm de diamètre, dont l'extrémité inférieure est plus large, avec un diamètre de 12 mm. Sur la face inférieure est fixée une pointe métallique de 2 mm de longueur et de 1 mm de diamètre.

La tige est constituée de 2 parties, une partie inférieure en matière plastique et une partie supérieure en matière plastique ou en métal comportant un disque de charge. Les parties supérieure et inférieure sont, soit solidaires (version manuelle), soit maintenues séparées (version automatisée). Le poids de la tige entière est de 30 ± 0,4 g. La partie supérieure de la tige est pourvue d'une bague de repère déplaçable. Lorsque la tige repose sur le fond du tube vide, la bague du repère se trouve à fleur du couvercle en matière plastique.

Figure 2.9.22.-1. – *Appareillage A de mesure du temps de ramollissement des suppositoires lipophiles*

*Dimensions en millimètres*

Figure 2.9.22.-2. – *Appareillage B de mesure du temps de ramollissement des suppositoires lipophiles*

*Dimensions en millimètres*

**Mode opératoire**. Remplissez le tube de verre de 10 mL d'eau à 36,5 ± 0,5 °C. Plongez le tube de verre d'au moins 7 cm dans un bain d'eau thermostaté sans qu'il touche le fond. Disposez un suppositoire, préalablement porté à température ambiante, la pointe en bas dans le tube de verre. Introduisez rapidement la tige dans le tube de verre jusqu'à ce qu'elle touche le suppositoire et ajustez le couvercle (début de la mesure). Mesurez le temps écoulé jusqu'à ce que la tige soit descendue sur le fond du tube et que la bague de repère ait atteint la partie supérieure du couvercle de matière plastique.

APPAREILLAGE B

L'appareil (figure 2.9.22.-2) est constitué par un bain-marie (B) dans lequel est placé un tube intérieur (A), lui-même fermé par un bouchon à son extrémité inférieure. L'appareil comporte un thermomètre et l'un des 2 accessoires suivants :

– une baguette de verre creuse (C1) constituée d'un tube scellé à ses 2 extrémités et comportant un rebord à la base ; la baguette est lestée avec de la grenaille de plomb et sa masse est de 30 ± 0,4 g,
– un système à poinçonner (C2) constitué d'une tige de 7,5 ± 0,1 g dans un tube s'élargissant vers le bas pour recevoir le suppositoire ; la tige et le tube sont en acier inoxydable.

**Mode opératoire**. Introduisez 5 mL d'eau à 36,5 ± 0,5 °C dans le tube intérieur (A), puis le suppositoire pointe en bas et enfin l'accessoire voulu (C1 ou C2). Mesurez le temps écoulé entre cet instant et le moment où le rebord de la baguette (C1) ou la tige d'acier (C2) atteint l'étranglement du tube intérieur ; la fusion ou la dissolution est alors considérée comme terminée.

**07/2008:20923**

## 2.9.23. MASSE VOLUMIQUE DES SOLIDES PAR PYCNOMÉTRIE À GAZ

La masse volumique par pycnométrie à gaz est déterminée par mesure du volume occupé par une masse connue de poudre, par équivalence avec le volume de gaz déplacé par la poudre dans un pycnomètre à déplacement de gaz. Dans les mesures de la masse volumique par pycnométrie à gaz, le volume déterminé exclut le volume occupé par les pores ouverts mais comprend le volume occupé par les pores fermés ou non accessibles au gaz.

L'hélium est habituellement le gaz retenu pour l'essai du fait de sa grande diffusibilité dans les petits pores ouverts. Si d'autres gaz sont utilisés, des valeurs différentes seront obtenues car la pénétration du gaz dépend de la taille des pores et de la section transversale des molécules du gaz.

La masse volumique mesurée est la moyenne pondérée par le volume de la masse volumique individuelle des particules de poudre. Elle est appelée masse volumique particulaire, à distinguer de la masse volumique vraie d'un solide ou de la masse volumique vrac d'une poudre. La masse volumique d'un solide est exprimée en grammes par centimètre cube ($g/cm^3$), bien que l'Unité Internationale soit le kilogramme par mètre cube ($1\ g/cm^3 = 1000\ kg/m^3$).

APPAREILLAGE

L'appareil utilisé (voir figure 2.9.23.-1) comprend les éléments suivants :

– une cellule d'essai scellée, de volume à vide $V_c$, connectée par un robinet à une cellule d'expansion de volume $V_r$,
– un système permettant de porter la pression interne de la cellule d'essai, au moyen du gaz de mesure, à une valeur définie $P$ indiquée par un manomètre,
– une source délivrant au système un gaz de mesure qui, sauf spécification contraire, est de préférence de l'hélium.

La mesure de la masse volumique par pycnométrie à gaz est réalisée à une température comprise entre 15 °C et 30 °C qui ne doit pas varier de plus de 2 °C au cours de la mesure.

L'étalonnage de l'appareil (détermination des volumes $V_c$ et $V_r$) est réalisé au moyen d'un étalon de calibrage approprié dont le volume total est connu à 0,001 $cm^3$ près. La méthode décrite ci-après est appliquée en 2 temps : dans un premier temps avec la cellule d'essai à vide et dans un second temps en plaçant l'étalon de calibrage dans la cellule d'essai. Les volumes $V_c$ et $V_r$ sont calculés à l'aide de l'équation indiquée pour le calcul du volume de l'échantillon, en attribuant à ce volume ($V_s$) la valeur zéro dans la première phase de la détermination.

MÉTHODE

Les contaminants volatils contenus dans la poudre sont éliminés par dégazage sous flux d'hélium constant préalablement à la mesure. Il est parfois nécessaire de procéder à un dégazage sous vide. Une pesée de l'échantillon est effectuée après la détermination pycnométrique du volume en raison du risque de dégagement de contaminants volatils au cours de la mesure.

Pesez la cellule d'essai du pycnomètre et notez la masse obtenue. Remplissez la cellule d'essai avec une masse donnée de la poudre à examiner. Montez la cellule dans le pycnomètre, de façon étanche. Notez la pression de référence $P_r$ du système, qui est la valeur indiquée par le manomètre lorsque le robinet de communication entre la cellule d'expansion et la cellule d'essai est ouvert. Fermez le robinet pour isoler les 2 cellules. Au moyen du gaz, portez la pression interne de la cellule d'essai à une pression initiale $P_i$, et notez cette valeur. Ouvrez le robinet pour rétablir la communication entre les 2 cellules. Notez la pression finale $P_f$. Répétez la mesure sur le même échantillon de poudre jusqu'à obtention, pour le volume $V_s$, de 2 résultats successifs présentant un écart inférieur ou égal à 0,2 pour cent. Démontez la cellule d'essai et mesurez la masse finale ($m$) de la poudre, exprimée en grammes. Si le pycnomètre utilisé diffère dans son mode d'emploi ou sa conception de celui décrit dans la figure 2.9.23.-1, suivez les instructions du fabricant du pycnomètre.

EXPRESSION DES RÉSULTATS

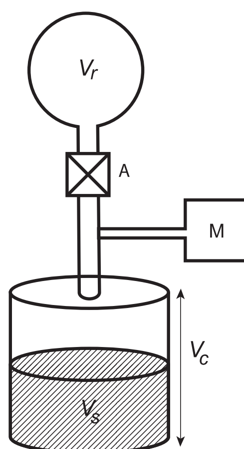
Le volume $V_s$ de l'échantillon est donné par l'équation suivante :

$$V_s = V_c - \frac{V_r}{\frac{P_i - P_r}{P_f - P_r} - 1}$$

La masse volumique $\rho$ est donnée par l'équation suivante :

$$\rho = \frac{m}{V_s}$$

Le mode de conditionnement de l'échantillon est indiqué avec les résultats ; il convient par exemple de préciser si l'échantillon est examiné en l'état ou après dessiccation dans des conditions spécifiques, telles que celles décrites pour la perte à la dessiccation.




A = valve,

$V_r$ = volume de la cellule d'expansion, en centimètres cube,

$V_c$ = volume de la cellule d'essai, en centimètres cube,

$V_s$ = volume de l'échantillon, en centimètres cube,

M = manomètre.

Figure 2.9.23.-1. – *Représentation schématique d'un pycnomètre à gaz*

**01/2008:20925**

# 2.9.25. ESSAI DE DISSOLUTION DES GOMMES À MÂCHER MÉDICAMENTEUSES

PRINCIPE

L'essai est destiné à déterminer la vitesse de dissolution des substances actives contenues dans les gommes à mâcher médicamenteuses. Il consiste à soumettre à une mastication artificielle un morceau de gomme placé dans une petite chambre conçue pour simuler une opération de mastication.

APPAREILLAGE

L'appareil (figure 2.9.25.-1) comporte :

- 1 chambre de mastication,
- 1 piston vertical,
- 2 pistons horizontaux munis de joints toriques et de joints d'étanchéité.

La chambre de mastication est composée de 4 éléments :

- 1 chambre centrale,
- 1 cheminée (figure 2.9.25.-2),
- 2 éléments de guidage à bague-guide (figure 2.9.25.-3).

La cheminée et les éléments de guidage sont montés sur la chambre centrale. Les joints toriques sont installés dans une gorge prévue à cet effet sur le piston et doublés par les joints qui assurent l'étanchéité de la chambre. Les pistons horizontaux sont introduits dans la chambre de mastication à travers les éléments de guidage.

La gomme est soumise à une mastication artificielle sous l'action des pistons horizontaux ; un piston vertical assure son maintien en place entre les cycles de mastication.

La vitesse de l'appareil est réglée de façon à assurer la réalisation de cycles constants. Un cycle de mastication est ainsi défini : les pistons horizontaux partent de leur position extrême d'ouverture, se déplacent jusqu'à leur position extrême de fermeture puis reviennent à leur position initiale. Au cours de ce cycle, le piston vertical remonte de sa position la plus basse vers sa position la plus haute puis revient à sa position initiale.

La course de chaque piston horizontal est de 25,0 mm. La distance maximale entre ces 2 pistons est de 50 mm. La distance minimale entre les 2 pistons horizontaux est de 0,1 mm à 1,0 mm. La course du piston vertical est de 22,0 mm.

Le mouvement des pistons horizontaux est réglé pour que les 2 pistons se trouvent simultanément à leur position extrême de fermeture. Le mouvement du piston vertical est réglé pour ne pas interférer avec celui des pistons horizontaux.

Si nécessaire, l'appareil peut être construit de telle sorte que, à la fin du cycle de mastication, les pistons horizontaux pivotent autour de leur axe ; en sens opposé l'un de l'autre, afin d'exercer sur la gomme des efforts de mastication maximaux.

Toutes les parties de l'appareil susceptibles d'entrer en contact avec la préparation ou le milieu de dissolution sont chimiquement inertes et n'adsorbent pas les composants de l'échantillon ni ne réagissent avec eux ou n'interfèrent dans leur comportement.

MODE OPÉRATOIRE

Les informations suivantes sont requises pour chaque détermination :

- composition, volume et température du milieu de dissolution,
- nombre de cycles de mastication par minute,
- conditions d'échantillonnage (temps et méthode),
- si l'analyse est à effectuer sur le résidu de gomme ou sur le milieu de libération,
- méthode d'analyse.

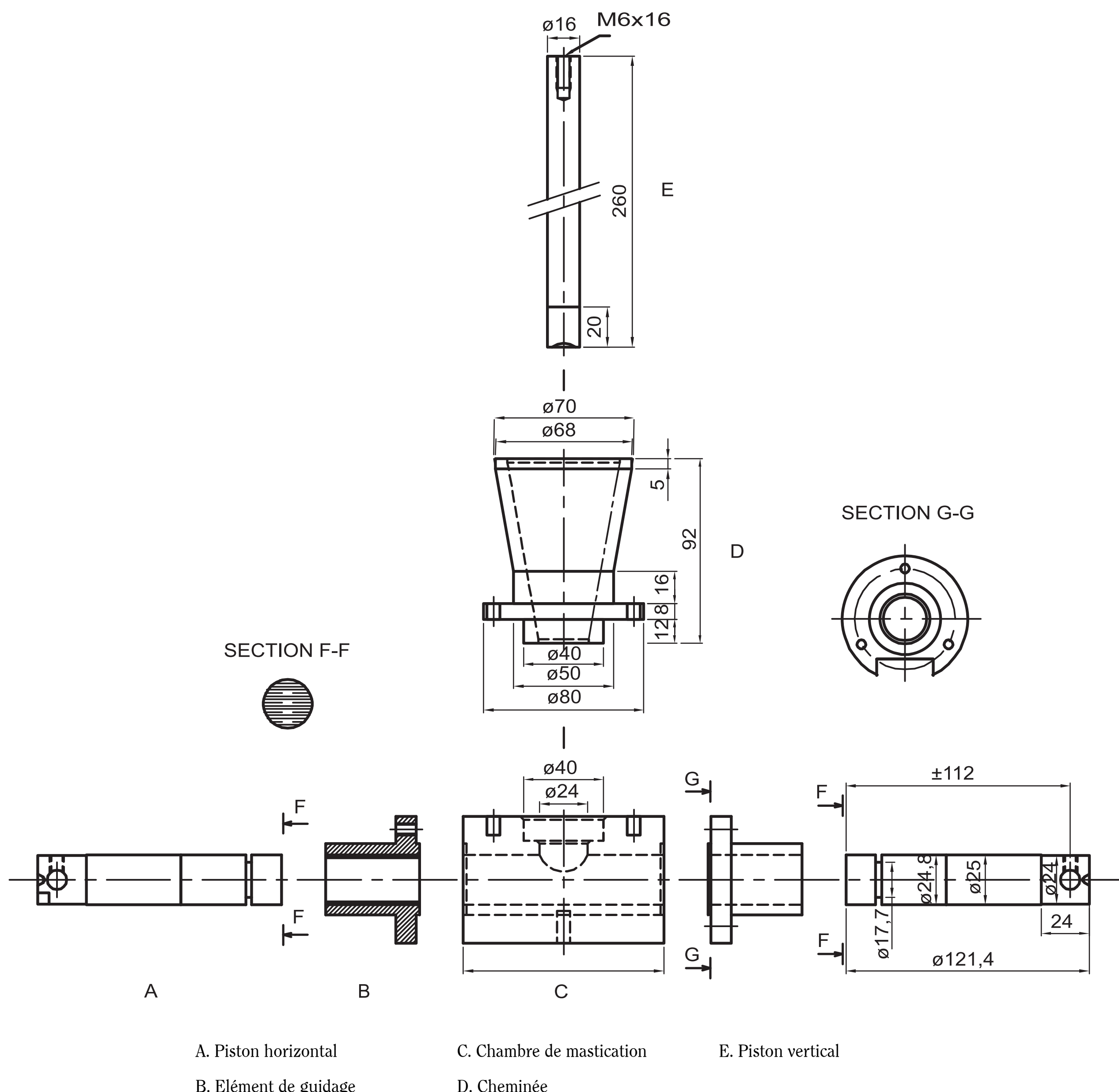



Figure 2.9.25.-1 – *Chambre de mastication et pistons*

(*dimensions en millimètres*)

Introduisez dans la chambre de mastication le volume prescrit de milieu de dissolution, généralement 20 mL de *solution tampon phosphate pH 6,0 R2*. Maintenez la température du milieu à 37 ± 0,5 °C au moyen d'un dispositif électrique avec contrôle externe. Maintenez la vitesse des pistons au nombre prescrit de cycles par minute (généralement 60). Pesez exactement un morceau de gomme à mâcher (ou une gomme à mâcher entière), placez-le dans la chambre de mastication et mettez l'appareil en marche.

ÉCHANTILLONNAGE ET ÉVALUATION

Arrêtez l'appareil au temps prescrit. Eliminez le résidu de gomme et prélevez un échantillon du milieu. Déterminez la teneur en substance(s) active(s) par une méthode d'analyse appropriée. Le milieu peut être remplacé après chaque prélèvement, mais il faut appliquer aux résultats une correction numérique pour tenir compte de la variation de volume ou de dilution. La teneur en substance(s) active(s) peut également être déterminée dans le résidu de gomme. Réalisez successivement l'essai sur 6 gommes à mâcher médicamenteuses.

La quantité de substance(s) active(s) dissoute(s) dans un temps prescrit est exprimée en pourcentage de la teneur déclarée sur l'étiquette.

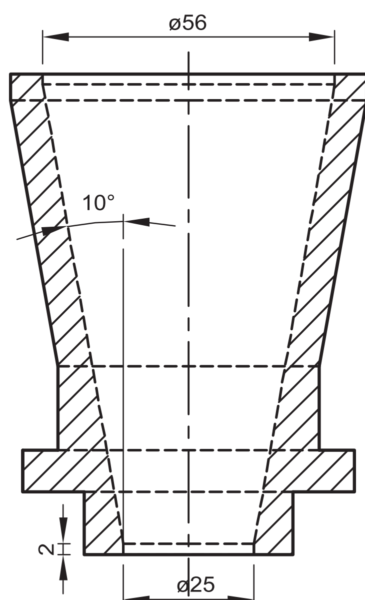



Figure 2.9.25.-2 – *Cheminée*
(*dimensions en millimètres*)

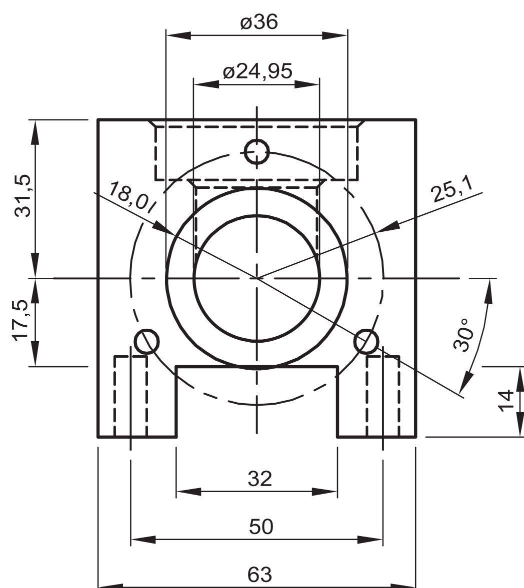



Figure 2.9.25.-3 – *Elément de guidage (section G-G)*
(*dimensions en millimètres*)

**01/2010:20926**

# 2.9.26. SURFACE SPÉCIFIQUE PAR ADSORPTION GAZEUSE(7)

INTRODUCTION

Cet essai consiste à déterminer la surface spécifique d'une poudre par adsorption physique d'un gaz sur la surface du solide, et par calcul de la quantité de gaz adsorbé (gaz de mesure) sous forme d'une couche monomoléculaire sur la surface. L'adsorption physique est le résultat d'interactions relativement faibles (forces de van der Waals) entre les molécules gazeuses (gaz de mesure) et la surface de la poudre. La détermination est généralement effectuée à la température de l'azote liquide. La quantité de gaz adsorbée peut être mesurée par volumétrie ou en flux continu.

FONCTION DE BRUNAUER, EMMETT ET TELLER (BET) ET DÉTERMINATION DE LA SURFACE SPÉCIFIQUE

*DÉTERMINATION MULTIPOINTS*

Les données recueillies sont traitées par l'équation des isothermes d'adsorption de Brunauer, Emmett et Teller (BET) :

$$\frac{1}{\left[V_a\left(\frac{P_o}{P}-1\right)\right]}=\frac{C-1}{V_mC}\times\frac{P}{P_o}+\frac{1}{V_mC} \qquad (1)$$

$P$ = pression de vapeur partielle du gaz de mesure à l'équilibre avec la surface à 77,4 K (Eb. de l'azote liquide), en pascals,

$P_o$ = pression de saturation du gaz de mesure, en pascals,

$V_a$ = volume de gaz adsorbé dans les conditions normales de température et de pression [273,15 K et pression atmosphérique ($1{,}013 \times 10^5$ Pa)], en millilitres,

$V_m$ = volume de gaz adsorbé qui, dans les conditions normales de température et de pression, produit une monocouche apparente en surface de l'échantillon, en millilitres,

$C$ = constante sans dimension en rapport avec l'enthalpie d'adsorption du gaz en surface de l'échantillon de poudre.

Effectuez une mesure de $V_a$ pour au moins 3 valeurs de $P/P_o$.

Tracez le graphe des valeurs de la variable BET

$$\frac{1}{\left[V_a\left(\frac{P_o}{P}-1\right)\right]}$$

en fonction de $P/P_o$ selon l'équation (1). Le graphe obtenu présente normalement un tracé linéaire sur l'intervalle de pressions relatives compris environ entre 0,05 et 0,3. Les données sont considérées comme acceptables si le coefficient de corrélation $r$ de la régression linéaire n'est pas inférieur à 0,9975 (soit $r^2$ égal ou supérieur à 0,995). Evaluez par analyse de régression linéaire la pente de la droite obtenue, qui est égale à $(C - 1)/V_mC$, et son ordonnée à l'origine, qui est égale à $1/V_mC$. On peut en déduire la valeur de $V_m$ au moyen de la relation 1/(*pente* + *ordonnée à l'origine*), et celle de $C$ au moyen de la relation (*pente/ordonnée à l'origine*) + 1. A partir de la valeur de $V_m$ ainsi obtenue, calculez la surface spécifique $S$, en $m^2 \cdot g^{-1}$, à l'aide de l'équation :

$$S=\frac{V_mNa}{m\times 22400} \qquad (2)$$

$N$ = nombre d'Avogadro ($6{,}022 \times 10^{23}$ $mol^{-1}$),

$a$ = section effective d'une molécule du gaz de mesure, en mètres carrés (0,162 $nm^2$ pour l'azote et 0,195 $nm^2$ pour le krypton),

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes,

22400 = volume occupé par 1 mole du gaz de mesure dans les conditions normales de température et de pression (compte tenu d'un léger écart possible par rapport à la situation idéale), en millilitres.

Au minimum 3 points de mesure sont nécessaires. Des mesures supplémentaires peuvent être effectuées, notamment dans les cas où une non-linéarité est observée lorsque la valeur $P/P_o$ est proche de 0,3. Comme la courbe est souvent non-linéaire aux valeurs $P/P_o$ inférieures à 0,05, il est déconseillé de procéder à des mesures dans ce domaine de valeurs. Le test de linéarité, le mode de traitement des données et la méthode de calcul de la surface spécifique de l'échantillon sont décrits plus haut.

(7) Ce chapitre a fait l'objet du processus d'harmonisation des pharmacopées. Voir chapitre *5.8. Harmonisation des pharmacopées.*

2. Méthodes analytiques

*DÉTERMINATION MONOPOINT*

En règle générale, il est nécessaire d'effectuer 3 mesures au moins de $V_a$, correspondant chacune à une valeur différente de $P/P_o$, pour déterminer la surface spécifique par adsorption gazeuse, que la mesure soit effectuée en flux dynamique (*Procédé I*) ou par volumétrie (*Procédé II*). Sous certaines conditions précisées ci-après, il est néanmoins admissible de déterminer la surface spécifique d'une poudre à partir d'une seule valeur de $V_a$ mesurée à un point $P/P_o$ unique, par exemple 0,300 (valeur correspondant à 0,300 mole d'azote ou 0,001038 mole de krypton). On utilise alors l'équation suivante pour calculer $V_m$ :

$$V_m = V_a \left(1 - \frac{P}{P_o}\right) \qquad (3)$$

et l'équation (2) permet de calculer la surface spécifique à partir de la valeur de $V_m$ ainsi obtenue.

La méthode monopoint peut être utilisée directement pour une série d'échantillons de poudre, constitués d'un produit donné dont la constante $C$ est très supérieure à l'unité. On peut vérifier que cette condition est satisfaite en comparant les valeurs de la surface spécifique respectivement obtenues, pour une série d'échantillons de poudre, par la méthode monopoint et par la méthode multipoints. L'obtention de valeurs voisines par ces 2 méthodes indique que $1/C$ tend vers zéro.

La méthode monopoint peut aussi être utilisée indirectement pour une série d'échantillons de poudre très semblables constitués d'un produit donné dont la constante $C$ n'est pas infinie mais peut être considérée comme invariable. Dans ces conditions, il est possible de réduire, voire d'éliminer l'erreur associée à l'emploi de la méthode monopoint en utilisant la méthode multipoints pour évaluer la valeur $C$ de l'un des échantillons de la série à partir de la représentation de la fonction BET, dont on peut déduire $C$ par la formule (1 + *pente /ordonnée à l'origine*). On calcule alors $V_m$ à partir de l'unique valeur de $V_a$ mesurée (pour une pression relative $P/P_o$ unique), au moyen de l'équation suivante :

$$V_m = V_a \left(\frac{P_o}{P} - 1\right) \left[\frac{1}{C} + \frac{C-1}{C} \times \left(\frac{P}{P_o}\right)\right] \qquad (4)$$

et on en déduit la surface spécifique au moyen de l'équation (2).

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

Cette section décrit les modes opératoires à utiliser pour la préparation des échantillons et pour la mise en oeuvre des méthodes d'adsorption gazeuse en flux dynamique (*Procédé I*) et volumétrique (*Procédé II*).

*PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS*

**Dégazage**

Avant de pouvoir déterminer la surface spécifique d'un échantillon, il faut éliminer tous les gaz et vapeurs susceptibles d'avoir été adsorbés physiquement sur sa surface après la production et en cours de traitement, de manutention et de conservation. Il est indispensable de réaliser ce dégazage sous peine d'obtenir des valeurs sous-estimées, ou variables, de la surface spécifique parce qu'une zone de surface intermédiaire est couverte de molécules des gaz ou vapeurs précédemment adsorbés. Dans le cas des produits pharmaceutiques, les conditions de dégazage constituent un facteur critique pour l'obtention de mesures présentant la fidélité et l'exactitude requises, en raison de la haute sensibilité de surface de ces produits.

*Conditions de dégazage*. Il doit être démontré que les conditions de dégazage appliquées permettent d'obtenir des tracés BET reproductibles et une masse de poudre constante, et n'entraînent aucune modification physique ou chimique de la poudre.

Les conditions de dégazage, définies par la température, la pression et la durée, doivent être choisies de façon à assurer le maintien, autant que possible, de l'état de surface initial. Le dégazage de nombreuses substances est souvent réalisé par application d'un vide, par balayage par un flux de gaz inerte sec, ou en appliquant une méthode de cycles de désorption-adsorption. Dans tous les cas, on opère parfois à température élevée pour accélérer l'élimination des contaminants. Lorsque des températures élevées sont utilisées pour le dégazage d'échantillons de poudre, des précautions doivent être prises afin de ne pas affecter la nature de la surface et l'intégrité de l'échantillon.

Si l'on procède par chauffage, il est recommandé d'utiliser une température et un temps de dégazage aussi faibles que possible afin de pouvoir mesurer de façon reproductible la surface spécifique dans un temps acceptable. Pour les échantillons sensibles, l'emploi d'autres méthodes de dégazage est recommandé, par exemple celle des cycles de désorption-adsorption.

**Gaz de mesure**

La procédure normale est l'adsorption d'azote de qualité analytique à la température de liquéfaction de l'azote.

Pour les poudres de faible surface spécifique (< 0,2 $m^2 \cdot g^{-1}$), la proportion de gaz adsorbé est peu élevée. Dans ce cas l'emploi de krypton à la température de liquéfaction de l'azote est préférable, car l'erreur se trouve considérablement réduite du fait de la faible pression de vapeur exercée par ce gaz. Lorsque cela est possible, l'utilisation d'échantillons plus grands (correspondant à une surface totale de 1 $m^2$ ou plus, lorsque l'azote est utilisé) peut compenser les erreurs dans la mesure où des surfaces réduites sont mesurées.

Tous les gaz utilisés doivent être exempts d'humidité.

**Prise d'essai**

Pesez exactement une quantité de poudre à examiner telle que la surface totale de l'échantillon soit au moins de 1 $m^2$ lorsque le gaz de mesure est de l'azote et de 0,5 $m^2$ lorsqu'il s'agit de krypton.

Des quantités plus faibles d'échantillon peuvent être utilisées après validation appropriée.

*MESURE*

La quantité de gaz adsorbé, à une pression donnée, tend à croître lorsque la température décroît. C'est pourquoi les mesures d'adsorption sont généralement effectuées à basse température. La température standard est de 77,4 K, c'est-à-dire le point d'ébullition de l'azote liquide.

**Procédé I : mesure en flux dynamique**

*Principe*

Pour les déterminations en flux dynamique (voir figure 2.9.26.-1), le gaz de mesure recommandé est l'azote ou le krypton secs, l'hélium servant de gaz diluant et n'étant pas adsorbé dans les conditions prescrites.

Il est nécessaire d'utiliser au minimum 3 mélanges hélium-gaz de mesure différents de façon à couvrir l'intervalle de valeurs $P/P_o$ allant de 0,05 à 0,30.

Le détecteur-intégrateur doit fournir un signal sensiblement proportionnel au volume de gaz le traversant dans des conditions définies de température et de pression. Il existe différents types d'instruments utilisables à cet effet, par exemple les détecteurs à conductivité thermique comportant un intégrateur électronique. Il convient d'effectuer au moins 3 mesures correspondant à des valeurs de $P/P_o$ comprises dans l'intervalle recommandé (0,05-0,30).

*Mode opératoire*

Faites passer un mélange gazeux (en général azote plus hélium) de composition connue dans une cellule à conductivité thermique, puis dans l'échantillon et à nouveau dans la cellule à conductivité thermique, qui envoie un signal à un potentiomètre enregistreur.

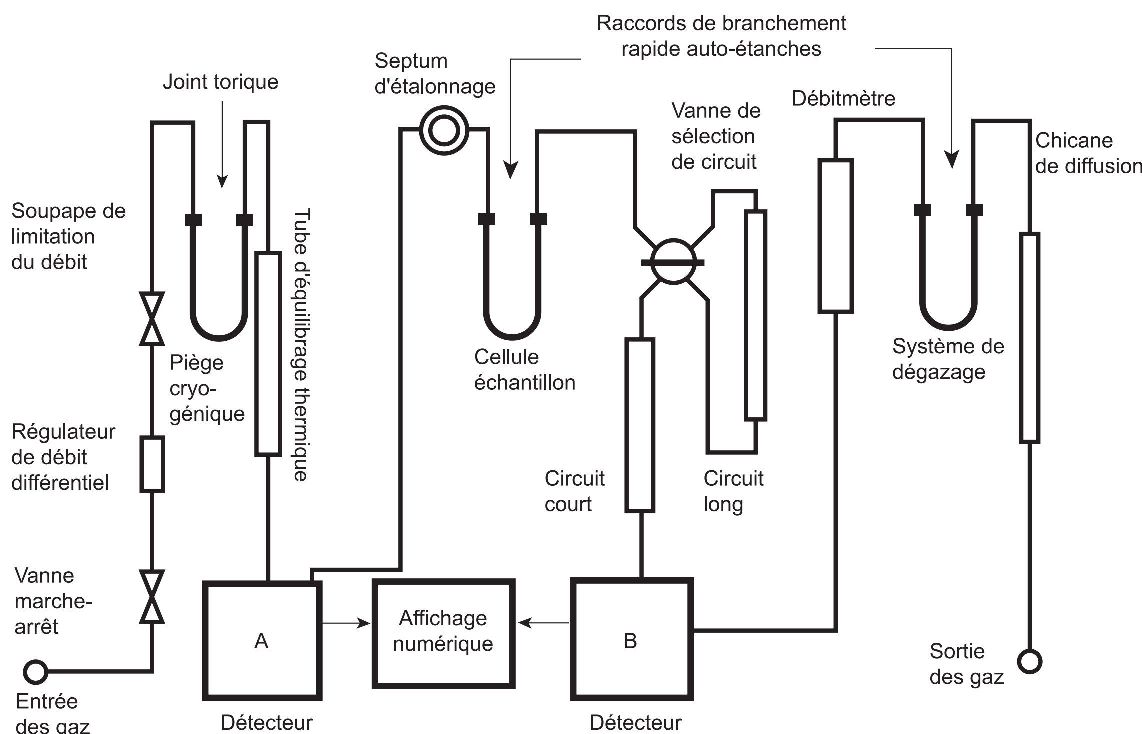



Figure 2.9.26.-1. – *Représentation schématique de l'appareil de mesure en flux dynamique*

Immergez la cellule échantillon dans de l'azote liquide. Il se produit une adsorption de l'azote gazeux contenu dans la phase mobile. Ceci créée un déséquilibre dans la cellule à conductivité thermique, qui envoie alors un signal à l'enregistreur.

Sortez l'échantillon du réfrigérant. Il apparaît un pic de désorption, de surface égale et de sens opposé à ceux du pic d'adsorption. Ce pic de désorption ayant une meilleure définition que le pic d'adsorption, c'est lui qui sert à effectuer la détermination.

Pour procéder à l'étalonnage, injectez dans le système une quantité connue de gaz de mesure suffisante pour produire un pic de même amplitude que celle du pic de désorption et déterminer la proportion de volume de gaz par unité de surface de pic.

Pour les déterminations monopoint, utilisez un mélange azote/hélium. Pour les déterminations multipoints, utilisez plusieurs mélanges de ce type ou procédez par prémélange de 2 courants gazeux.

Le principe du calcul est le même que pour les mesures volumétriques.

**Procédé II : mesure volumétrique**

*Principe*

Pour les mesures volumétriques (voir figure 2.9.26.-2), le gaz de mesure recommandé est l'azote. Il est introduit dans l'espace vide situé au-dessus de l'échantillon préalablement dégazé, de façon à instaurer une pression d'équilibre définie $P$. L'emploi d'un gaz diluant tel que l'hélium n'est donc pas nécessaire, mais de l'hélium peut être utilisé à d'autres fins, par exemple pour mesurer le volume mort.

Comme le gaz de mesure est utilisé à l'état pur, et non en mélange, le problème des interférences dues à la diffusion thermique ne se pose pas avec cette méthode.

*Mode opératoire*

Introduisez une petite quantité d'azote sec dans le tube à échantillon, de façon à éviter la contamination des surfaces propres, puis enlevez le tube à échantillon, bouchez-le et pesez. Calculez la masse de la prise d'essai. Fixez le tube à échantillon à l'appareil de mesure volumétrique. Faites le vide dans le tube, avec précaution, jusqu'à une pression définie (par exemple entre 2 Pa et 10 Pa). Certains appareillages peuvent également faire le vide selon une variation de pression définie, en fonction du temps (par exemple moins de 13 Pa/30 s) et maintenir la pression pendant un temps défini avant de passer à l'étape suivante.

Si le principe de fonctionnement de l'instrument requiert la mesure du volume mort dans le tube à échantillon, par exemple par introduction d'un gaz non adsorbé tel que l'hélium, effectuez alors cette détermination, puis évacuez le gaz. La détermination du volume mort peut être évitée en effectuant des mesures différentielles, c'est-à-dire en utilisant un tube à échantillon et un tube témoin raccordés au moyen d'un transducteur différentiel. Procédez ensuite à la mesure de l'adsorption de l'azote gazeux comme décrit ci-après.

Plongez la cellule à échantillon, jusqu'à un point défini, dans un vase de Dewar contenant de l'azote liquide à 77,4 K. Introduisez dans le système un volume de gaz de mesure suffisant pour obtenir la pression relative souhaitée la plus basse, et mesurez le volume adsorbé $V_a$. Dans le cas de déterminations multipoints, répétez la mesure de $V_a$ pour des valeurs de $P/P_o$ croissantes. Lorsque le gaz de mesure utilisé est de l'azote, des valeurs $P/P_o$ de 0,10, 0,20 et 0,30 sont souvent appropriées.

ÉTALONS

Vérifiez périodiquement le bon fonctionnement de l'appareil en utilisant des étalons appropriés de surface spécifique connue, tel l'α-alumine, ayant une surface spécifique comparable à celle de la substance à examiner.

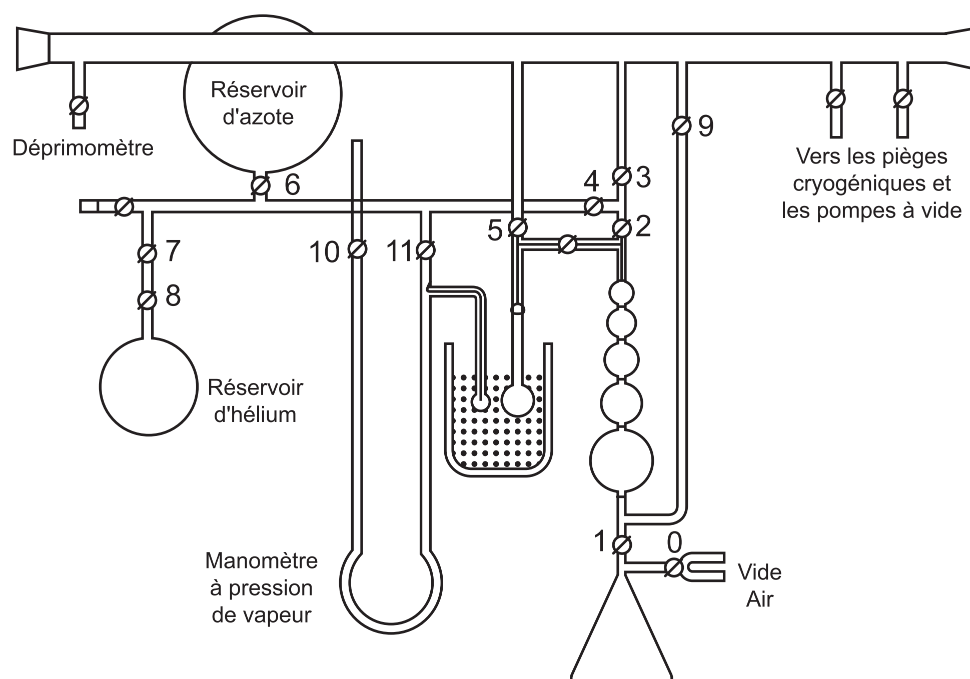



Figure 2.9.26.-2. – *Représentation schématique de l'appareil de mesure volumétrique*

01/2008:20927

## 2.9.27. UNIFORMITÉ DE MASSE DE LA DOSE DÉLIVRÉE PAR LES RÉCIPIENTS MULTIDOSES

*L'essai suivant est destiné aux formes pharmaceutiques orales telles que les granulés, les poudres orales et les liquides pour usage oral, qui sont conditionnées en récipients multidoses auxquels le fabricant adjoint un dispositif doseur.*

Pesez séparément 20 doses, prélevées au hasard dans un ou plusieurs flacons à l'aide du dispositif doseur et déterminez leur masse individuelle et la masse moyenne. 2 masses individuelles au maximum peuvent s'écarter de la masse moyenne de plus de 10 pour cent et aucune ne s'en écarte de plus de 20 pour cent.

01/2008:20929

## 2.9.29. DISSOLUTION INTRINSÈQUE

L'essai est destiné à déterminer la vitesse intrinsèque de dissolution de substances solides pures après compaction.

Il est réalisé dans des conditions expérimentales spécifiées, permettant d'obtenir une mesure pratique de la vitesse intrinsèque de dissolution.

La vitesse intrinsèque de dissolution est une valeur théorique se réferrant à des substances solides pures de porosité nulle ; mais en pratique la vitesse intrinsèque de dissolution est déterminée sur des substances de porosité minimale.

PRINCIPE

La vitesse intrinsèque de dissolution est définie comme la vitesse de dissolution de substances pures après compaction, dans des conditions de surface constante. Son évaluation est utile à la caractérisation des substances actives et des excipients.

La vitesse de dissolution d'une substance pure peut être affectée par toutes les propriétés de l'état solide telles que le faciès cristallin, la cristallinité, l'amorphisme, le polymorphisme, le pseudo-polymorphisme, la taille des particules et la surface spécifique. Elle peut également être influencée par des facteurs extrinsèques (conditions d'essai) tels que les conditions hydrodynamiques, la température, la viscosité, le pH, le pouvoir tampon et la force ionique du milieu de dissolution.

L'évaluation de la vitesse intrinsèque de dissolution d'une substance solide implique la préparation d'un compact. Il est donc nécessaire de s'assurer que la poudre à examiner présente des propriétés de compaction appropriées.

La vitesse intrinsèque de dissolution est déterminée dans des conditions d'immersion, par exposition d'une surface constante de la substance compactée à un milieu de dissolution approprié ; la vitesse d'agitation, la température, la force ionique et le pH étant maintenus constants.

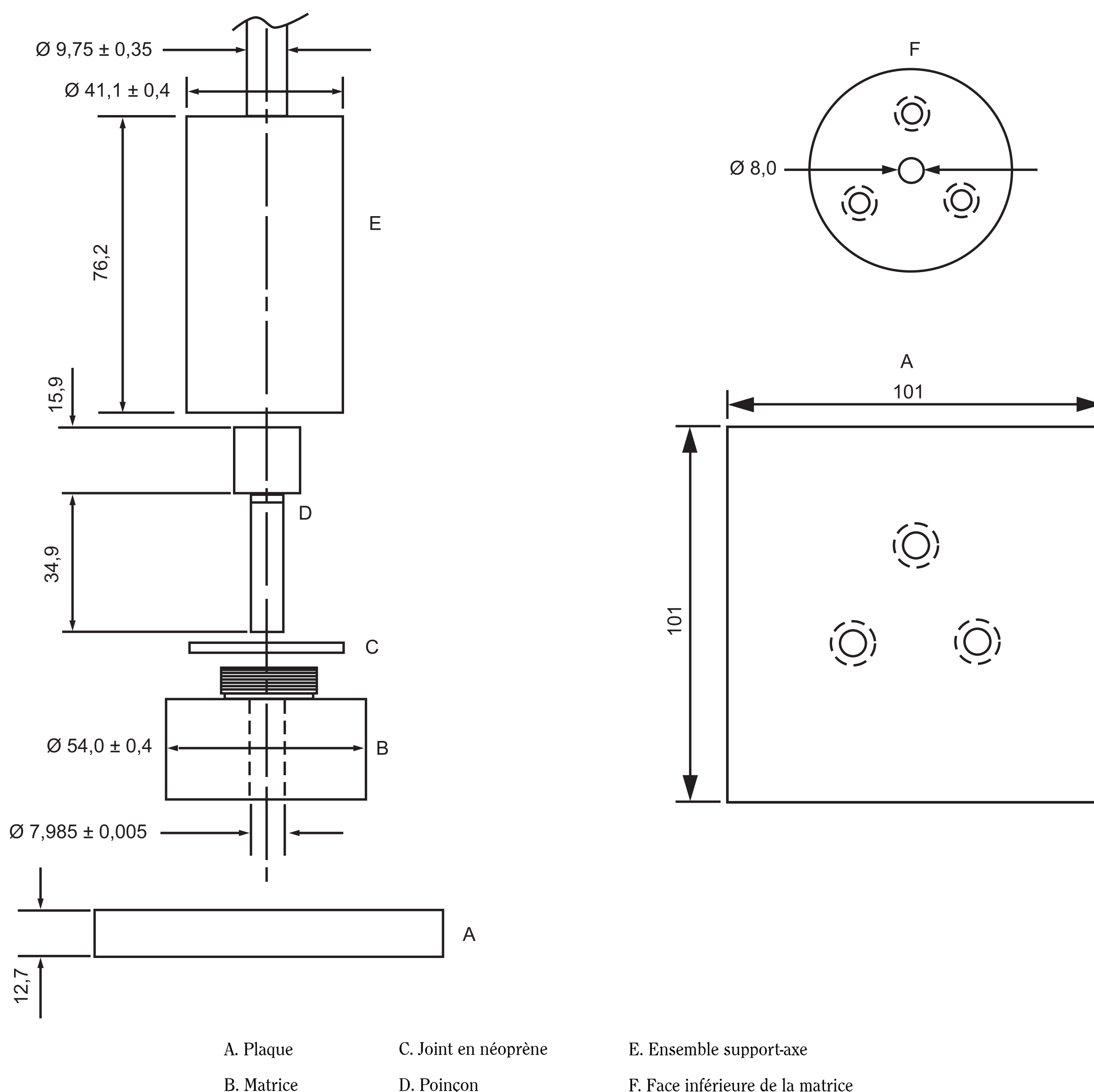
La vitesse intrinsèque de dissolution est exprimée en termes de masse de substance dissoute par unité de temps et par unité de surface exposée, soit en général en milligrammes par minute et par centimètre carré ($mg{\cdot}min^{-1}{\cdot}cm^{-2}$).

APPAREILLAGE

L'appareillage type se compose d'un poinçon et d'une matrice en acier trempé. La base de la matrice comporte 3 trous taraudés permettant la fixation d'une plaque plane en acier poli, qui fournit au compact une surface d'appui aussi lisse qu'un miroir. La matrice comporte une cavité d'un diamètre de 0,1-1,0 cm, dans laquelle est placée une quantité mesurée de la poudre à examiner. Le poinçon est alors introduit dans la cavité et compacte la poudre généralement sous l'action d'une presse hydraulique de laboratoire. Une ouverture ménagée à travers la tête du poinçon permet l'insertion d'une tige métallique pour faciliter son retrait à la fin de l'essai. Il se forme dans la cavité un compact dont une seule face, de surface définie, est exposée à la base de la matrice (figure 2.9.29.-1). La base de la matrice comporte une ouverture dimensionnée afin que le compact ne puisse tomber que lorsqu'il a atteint un taux de dissolution de 50-75 pour cent. Le haut de la matrice comporte un épaulement fileté permettant de la fixer à un support. Ce support est assemblé à un agitateur de laboratoire, et l'ensemble de la matrice, lorsque le compact est en place, est immergé dans le milieu de dissolution puis mis en rotation par l'agitateur.

MODE OPÉRATOIRE

Pesez la poudre sur du papier à peser. Fixez la plaque métallique polie sous la partie inférieure de la matrice à l'aide des 3 vis fournies à cet effet. Transférez l'échantillon de poudre dans la cavité de la matrice. Introduisez le poinçon dans la cavité et fixez la plaque de métal qui surmonte l'ensemble. Compactez la poudre au moyen d'une presse hydraulique en appliquant une pression appropriée pendant une durée suffisante pour




A. Plaque — C. Joint en néoprène — E. Ensemble support-axe

B. Matrice — D. Poinçon — F. Face inférieure de la matrice

Figure 2.9.29.-1. – *Appareillage type utilisé pour obtenir le compact nécessaire à la détermination de la dissolution intrinsèque*
*Dimensions en millimètres*

garantir une porosité minimale ; il faut en effet éviter autant que possible la désagrégation du compact, qui entraînerait une augmentation de la surface exposée et donc de la vitesse de dissolution. Démontez la plaque métallique polie et vissez solidement la matrice au support, avec le poinçon toujours en place. Nettoyez la surface de la matrice avec un courant d'air comprimé ou d'azote pour éliminer les résidus de poudre libre.

Fixez l'ensemble matrice-support à l'appareil de dissolution à l'aide du dispositif de serrage. Positionnez l'axe dans l'arbre fileté de telle sorte que, lorsque l'ensemble est descendu en position basse, la surface exposée du compact soit à 3,8 cm du fond du récipient.

Procédez à l'alignement de façon à réduire au minimum le voile et évitez la formation de bulles qui risqueraient de réduire la surface de poudre en contact avec le milieu de dissolution. Les conditions d'immersion sont si possible maintenues pendant toute la durée de l'essai. Cependant, afin d'obtenir des concentrations en soluté détectables, il peut être nécessaire d'utiliser un volume de milieu de dissolution relativement faible, du fait de la faible surface exposée au milieu de dissolution.

Portez le milieu de dissolution à la température choisie pour l'essai. Abaissez l'ensemble de mesure jusqu'à la position d'essai avant la mise en rotation. Veillez à éviter la formation de bulles à la surface du compact, car elles risqueraient de réduire la surface en contact avec le milieu de dissolution. Mettez immédiatement l'appareil en route à la vitesse de rotation choisie pour l'essai.

Prélevez des échantillons à intervalles de temps fixés et procédez au dosage par une méthode analytique de sensibilité et d'exactitude appropriées.

## ÉVALUATION DES RÉSULTATS

Il convient de corriger les données obtenues (quantité cumulée dissoute à chaque temps de prélèvement) pour tenir compte des pertes dues à l'échantillonnage. Pour calculer la vitesse intrinsèque de dissolution, tracez le graphe de la quantité cumulée de substance dissoute, par unité de surface de poudre compactée, en fonction du temps. La quantité dissoute cumulée par unité de surface est obtenue en divisant la quantité dissoute cumulée à chaque temps de prélèvement par la surface exposée. Les données expérimentales réduites sont alors soumises à une analyse de régression linéaire en considérant un intervalle de temps approprié précédant l'éventuelle désagrégation du compact. La vitesse intrinsèque de dissolution de la substance à examiner, exprimée en milligrammes par minute et par centimètre carré, est donnée par la pente de la droite de régression. Les conditions exactes de préparation du compact et de réalisation de l'essai (milieu de dissolution, volume du

milieu utilisé, vitesse d'agitation, température, etc.) doivent être précisées avec la valeur obtenue pour la vitesse intrinsèque de dissolution.

*NOTE* : il est admis, dans certains cas justifiés, d'utiliser un appareil de configuration différente, par exemple un appareil où le support de la matrice maintient le compact en position verticale fixe, l'agitation étant assurée par une palette placée à une distance définie de la surface du compact.

**01/2010:20931**

## 2.9.31. ANALYSE DE LA TAILLE DES PARTICULES PAR DIFFRACTION DE LA LUMIÈRE LASER

La méthode décrite est basée sur les normes ISO 13320-1(1999) et 9276-1(1998).

INTRODUCTION

La technique de diffraction de la lumière laser utilisée pour la détermination de la distribution de la taille des particules repose sur l'analyse du profil de diffraction obtenu lorsque des particules sont exposées à un faisceau de lumière monochromatique. Les premiers instruments de diffractométrie laser utilisaient exclusivement la diffusion lumineuse sous des angles faibles. La technique a toutefois été étendue depuis. Elle couvre aujourd'hui la diffusion lumineuse sur une plage angulaire plus large et met en application la théorie de Mie, en plus de l'approximation de Fraunhofer et de la diffraction anomale.

La diffractométrie laser ne permet pas de distinguer la diffusion due à des particules élémentaires de la diffusion due à des amas de particules primaires (agglomérats ou agrégats). Comme la plupart des échantillons particulaires contiennent des agglomérats ou agrégats et que l'analyse vise généralement la distribution de taille des particules primaires, il est courant de procéder avant la mesure à la dispersion des amas pour obtenir des particules primaires.

Dans le cas des particules non sphériques, la distribution granulométrique obtenue est celle de sphères équivalentes, car le modèle optique associé à la technique suppose la sphéricité des particules. La distribution granulométrique résultante peut différer de celle obtenue par des méthodes reposant sur des principes physiques différents (sédimentation, tamisage, etc.).

Le présent chapitre constitue un guide pour l'analyse de la distribution granulométrique des particules dans différents systèmes dispersés (poudres, pulvérisations, aérosols, suspensions, émulsions, bulles de gaz dans un liquide, par exemple), par analyse de leur diffusion lumineuse sous différents angles. Il n'a pas pour objet de définir des exigences spécifiques s'appliquant à la granulométrie de produits spécifiques.

PRINCIPE

Un échantillon représentatif, dispersé à concentration adéquate dans un liquide ou un gaz approprié, traverse un faisceau de lumière monochromatique, généralement produit par une source laser. La lumière diffusée sous différents angles par les particules est mesurée au moyen d'un multidétecteur et les données numériques représentant le profil de diffusion sont enregistrées pour analyse. Ces données de diffusion sont alors transformées, au moyen d'un modèle optique et d'un algorithme mathématique appropriés, pour obtenir une partition du volume total en un nombre discret de classes de taille, c'est-à-dire une distribution granulométrique en volume.

INSTRUMENT

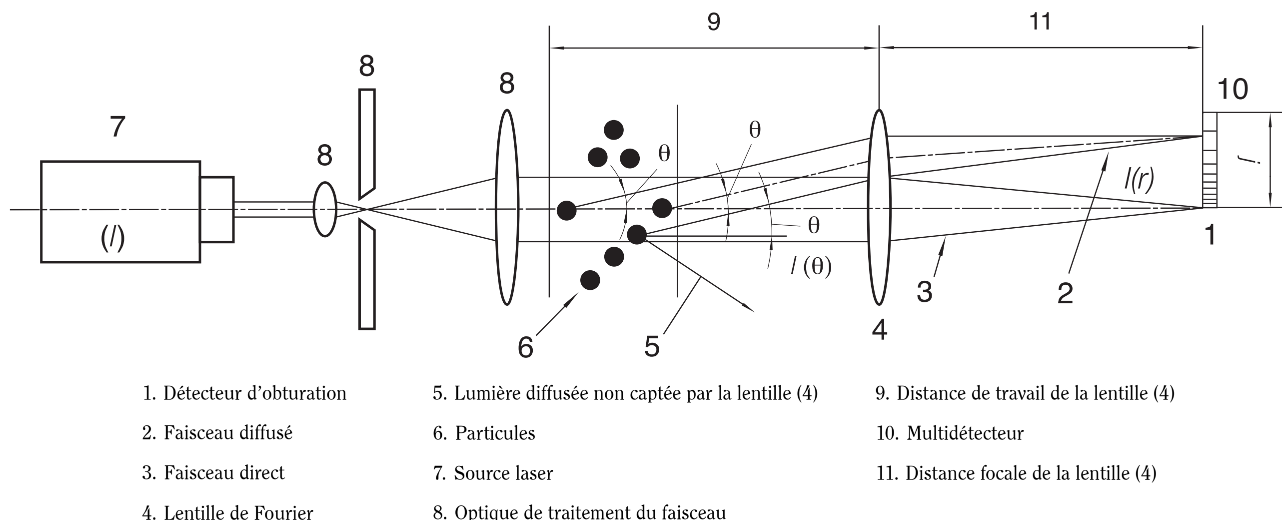
L'instrument est installé dans un environnement où il n'est pas affecté par des bruits électriques, des vibrations mécaniques, des fluctuations de température, l'humidité ou une lumière vive directe.

La figure 2.9.31.-1 représente un exemple de dispositif instrumental de diffractométrie laser. D'autres équipements peuvent être utilisés.

L'instrument comprend une source lumineuse laser, des composants optiques de traitement du faisceau, une fenêtre (ou cellule) de mesure, une lentille de Fourier et un multidétecteur permettant la mesure du profil de diffraction. Un système de traitement des données est également nécessaire pour la conversion, par déconvolution, des données de diffusion en distribution granulométrique en volume, ainsi que pour les opérations associées d'analyse des données et de présentation des résultats.

Il existe 2 approches possibles pour le passage des particules dans le faisceau laser. Dans la géométrie classique, les particules rencontrent le faisceau parallèle avant la lentille collectrice, dans sa distance de travail. Dans la géométrie dite d'optique de Fourier inversée, l'exposition s'effectue après la lentille collectrice, donc dans un faisceau convergent. L'avantage de la géométrie classique est de laisser à l'échantillon une longueur de chemin optique raisonnable dans la distance de travail de la lentille. Le second dispositif n'autorise qu'une longueur de chemin optique réduite, mais permet la mesure de la lumière diffusée sous de plus grands angles, ce qui est utile pour les particules de taille submicronique.

L'interaction du faisceau incident et de l'ensemble des particules dispersées produit un profil de diffusion où les intensités lumineuses varient selon l'angle considéré. La distribution angulaire totale d'intensité, à laquelle contribuent à la fois la lumière directe et la lumière diffusée, est ensuite focalisée sur




1. Détecteur d'obturation
2. Faisceau diffusé
3. Faisceau direct
4. Lentille de Fourier
5. Lumière diffusée non captée par la lentille (4)
6. Particules
7. Source laser
8. Optique de traitement du faisceau
9. Distance de travail de la lentille (4)
10. Multidétecteur
11. Distance focale de la lentille (4)

Figure 2.9.31.-1. – *Exemple de dispositif instrumental de diffractométrie laser*

un multidétecteur par une lentille ou une série de lentilles. Ces lentilles produisent un profil de diffusion qui est, dans certaines limites, indépendant de la localisation des particules dans le faisceau lumineux. La distribution angulaire continue d'intensité peut donc être convertie sur une série d'éléments détecteurs en distribution spatiale discrète d'intensité.

L'une des hypothèses du calcul est que le profil de diffusion mesuré pour l'ensemble des particules est la somme des images générées individuellement par les particules dispersives présentes à des positions relatives aléatoires. Il est à noter que la lumière diffusée n'est collectée par la (les) lentille(s), et donc par le détecteur, que sur une plage angulaire limitée.

## DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE

La mesure de la taille des particules par diffraction laser peut produire des données reproductibles, même à l'échelle submicronique, si l'instrument utilisé et l'échantillon examiné sont soigneusement contrôlés de façon à limiter la variabilité des conditions d'essai (milieu de dispersion, méthode de mise en dispersion de l'échantillon, par exemple).

La mesure de la taille des particules par diffraction laser a longtemps été réservée aux particules de taille comprise entre environ 0,1 μm et 3 mm. Aujourd'hui, grâce aux progrès réalisés dans la conception des lentilles et des équipements, certains instruments sont capables d'opérer en routine sur une plage plus étendue. Il incombe à l'utilisateur de démontrer, par le biais du rapport de validation, l'applicabilité de la méthode pour l'usage envisagé.

**Echantillonnage**. La technique d'échantillonnage mise en oeuvre doit permettre d'obtenir un échantillon représentatif, de volume adapté aux mesures granulométriques. Des techniques de fractionnement de l'échantillon peuvent être appliquées (diviseur rotatif ou méthode du cône, par exemple).

**Evaluation de la procédure de dispersion**. Examinez l'échantillon à analyser, à l'oeil nu ou au microscope, pour évaluer l'intervalle de distribution granulométrique et la forme des particules. La procédure de dispersion utilisée doit être adaptée à l'objectif de la mesure : selon le cas, il peut être préférable de fractionner autant que possible les amas en particules primaires ou, au contraire, de conserver autant que possible leur intégrité. En ce sens, les particules à considérer peuvent être des particules primaires ou bien des amas.

Lors du développement de la méthode, il est fortement recommandé de s'assurer qu'il ne se produit pas de comminution des particules et, inversement, que la dispersion des particules ou amas est satisfaisante. On peut généralement le vérifier en modifiant l'énergie de dispersion et en observant l'altération résultante de la distribution granulométrique. Celle-ci ne doit pas varier significativement si l'échantillon est convenablement dispersé et si les particules ne sont ni fragiles ni solubles. Il convient par ailleurs de confirmer l'applicabilité de la méthode (par exemple, par comparaison au microscope) après toute modification apportée au procédé de production (cristallisation, broyage, etc.).

Dans le cas des pulvérisations, aérosols et bulles de gaz dans un liquide, la mesure est à effectuer directement, à condition que la concentration soit adéquate, car l'échantillonnage et la dilution altèrent généralement la distribution granulométrique.

Dans d'autres cas (émulsions, pâtes, poudres, etc.), des échantillons représentatifs peuvent être dispersés dans des liquides appropriés. On a alors souvent recours à des agents de dispersion (mouillants, stabilisants) et/ou à des contraintes mécaniques (agitation, ultrasons) pour désagglomérer ou désagréger les amas et stabiliser la dispersion. Il est habituel, pour ces dispersions liquides, d'utiliser un système à recirculation comportant une cellule de mesure optique, un bain de dispersion généralement équipé d'un agitateur et d'un générateur d'ultrasons, une pompe et des conduits. L'utilisation de cellules sous agitation, sans recirculation, est utile lorsque l'on ne dispose que de prises d'essai réduites ou que l'on a recours à des liquides de dispersion spéciaux.

Les poudres sèches peuvent également être converties en aérosols au moyen de disperseurs de poudres sèches appropriés, qui opèrent une désagglomération ou désagrégation sous l'effet de contraintes mécaniques. Ces disperseurs utilisent généralement l'énergie d'un gaz comprimé ou la pression différentielle par rapport au vide pour disperser les particules et les convertir en un aérosol qui est balayé à travers la fenêtre de mesure, généralement vers l'entrée d'une conduite à vide où sont collectées les particules. Toutefois, dans le cas des particules relativement grossières et fluides, l'effet de la pesanteur peut être suffisant pour assurer une dispersion adéquate des particules.

Si la taille maximale des particules de l'échantillon dépasse l'intervalle de mesure de l'instrument, il est possible d'éliminer par tamisage la fraction la plus grossière, en consignant la masse et le pourcentage représentés par cette fraction. Il faut néanmoins noter que l'échantillon ayant subi ce prétamisage n'est plus représentatif, sauf démonstration contraire.

**Optimisation de la dispersion liquide**. Les liquides et les agents tensioactifs ou dispersifs utilisés pour la dispersion des poudres doivent :

– être transparents à la longueur d'onde laser utilisée et pratiquement exempts de bulles d'air ou de particules ;
– posséder un indice de réfraction différent de celui du matériel examiné ;
– ne pas entraîner la dissolution du matériel examiné (liquide pur ou solution saturée pré-filtrée) ;
– ne pas modifier la taille du matériel examiné (par exemple, par effet de solubilisation, de facilitation de la solubilisation ou de recristallisation) ;
– favoriser la dispersion et sa stabilité ;
– être compatibles avec les matériaux constitutifs de l'instrument (joints toriques, joints d'étanchéité, conduits, etc.) ;
– posséder une viscosité appropriée facilitant la recirculation, l'agitation et la filtration.

Des agents tensioactifs et/ou dispersifs sont souvent utilisés pour mouiller les particules et stabiliser la dispersion. Pour les acides et les bases faibles, le tamponnage du milieu de dispersion à pH faible ou élevé, respectivement, peut aider à l'identification d'un agent dispersif approprié.

Une vérification préliminaire de la qualité de la dispersion peut être réalisée par examen visuel ou microscopique. Il est également possible d'effectuer des prélèvements fractionnés dans une dispersion mère bien homogénéisée, préparée en ajoutant un liquide à l'échantillon tout en mélangeant avec une baguette de verre, une spatule ou un mélangeur de type vortex, par exemple. Il faut veiller à assurer le transfert d'un échantillon représentatif et à éviter le dépôt des plus grandes particules. A cette fin, on peut procéder à une mise en pâte de l'échantillon ou réaliser l'échantillonnage rapidement à partir d'une suspension maintenue sous agitation.

**Optimisation de la dispersion gazeuse**. Pour les dispersions de poudres sèches et les pulvérisations, un gaz comprimé exempt d'huile, d'eau et de particules peut être utilisé. L'élimination de ces contaminants peut être effectuée au moyen d'un dessiccateur muni d'un filtre. Lorsqu'elle est utilisée, l'unité de vide doit être placée à l'écart de la zone de travail afin de ne pas perturber la mesure.

**Détermination des concentrations de travail**. La concentration particulaire de la dispersion doit être supérieure à une valeur minimale, pour que le rapport signal/bruit dans le détecteur soit acceptable. Elle ne doit pas non plus dépasser une valeur maximale, pour éviter les diffusions multiples. La plage de concentration est conditionnée par la largeur du faisceau laser,

la longueur du chemin optique dans la fenêtre de mesure, les propriétés optiques des particules et la sensibilité des éléments du détecteur.

Il convient donc d'effectuer des mesures à différentes concentrations particulaires pour déterminer la plage de concentration optimale pour tout échantillon type du matériel (Note : les divers instruments existants utilisent, pour représenter les concentrations particulaires, des échelles et grandeurs différentes telles que l'obscuration, la concentration optique, la proportion en masse par rapport à la masse totale, etc.).

**Détermination du temps de mesure**. Le temps de mesure, le temps de lecture du détecteur et la fréquence d'acquisition sont déterminés expérimentalement, en fonction de la fidélité de mesure requise. En règle générale, le temps de mesure utilisé permet au détecteur d'effectuer un grand nombre d'acquisitions ou de balayages à intervalles de temps courts.

**Choix du modèle optique**. La plupart des instruments recourent soit à la théorie de Fraunhofer, soit à la théorie de Mie, bien que d'autres théories d'approximation soient parfois appliquées pour le calcul de la matrice de diffusion. Le choix du modèle théorique utilisé dépend de l'application envisagée et des hypothèses de départ posées quant aux caractéristiques du matériel à examiner (taille, absorbance, indice de réfraction, rugosité, orientation cristalline, mélange, etc.). Si les valeurs de l'indice de réfraction (parties réelle et imaginaire à la longueur d'onde utilisée) ne sont pas exactement connues, il est possible de recourir à l'approximation de Fraunhofer, ou à la théorie de Mie avec une estimation réaliste de l'indice de réfraction. La première approche présente l'avantage d'être simple et de ne pas faire intervenir les valeurs de l'indice de réfraction ; la seconde approche introduit, en général, un moindre biais sur les distributions granulométriques dans le cas des petites particules. Si, par exemple, le modèle de Fraunhofer est utilisé pour des échantillons contenant une quantité appréciable de petites particules transparentes, le nombre de petites particules calculé peut être significativement surestimé. Pour la traçabilité des résultats, il est indispensable de consigner les valeurs utilisées pour l'indice de réfraction, car de faibles différences dans les valeurs estimées choisies pour la partie réelle et imaginaire de l'indice de réfraction complexe peuvent se traduire par des écarts significatifs dans les résultats de distribution granulométrique. On applique souvent de petites valeurs de la partie imaginaire de l'indice de réfraction (environ 0,01-0,1 i), pour permettre la correction de l'absorbance en fonction de la rugosité de surface des particules. Il est à noter, de façon générale, que les propriétés optiques de la substance à examiner ainsi que sa structure (forme, rugosité de surface, porosité) conditionnent le résultat final.

**Validation**. En règle générale, la validité d'une procédure peut être évaluée sur la base des paramètres de spécificité, linéarité, étendue de mesure, exactitude, fidélité et robustesse. En diffractométrie laser, la spécificité telle que définie dans le cadre ICH n'est pas applicable, car il n'est pas possible de discriminer les différents composants d'un échantillon, pas plus qu'il n'est possible de distinguer les agglomérats de particules dispersées, à moins de compléter la technique par un examen microscopique approprié. La recherche d'une relation linéaire entre concentration et réponse, ou d'un modèle mathématique d'interpolation, n'est pas applicable. Plutôt que d'évaluer la linéarité, il s'agit ici de définir l'intervalle de concentration à l'intérieur duquel le résultat de mesure ne présente pas de variation significative. Les concentrations plus faibles que la borne inférieure de l'intervalle donnent lieu à une erreur due à l'insuffisance du rapport signal/bruit, tandis que les concentrations plus élevées que la borne supérieure de l'intervalle donnent lieu à une erreur résultant du phénomène de diffusion multiple. Cet intervalle dépend principalement des caractéristiques instrumentales. Il convient de confirmer l'exactitude par une qualification appropriée de l'instrument et par comparaison avec un examen microscopique, tandis que la fidélité peut être évaluée à travers la répétabilité.

La répétabilité accessible avec la méthode considérée dépend principalement des caractéristiques du matériel (broyé ou non, robuste ou fragile, à distribution de taille plus ou moins étendue, etc.), tandis que la répétabilité requise est fonction de l'objectif de la mesure. Il est impossible de spécifier ici des limites d'application obligatoire, car la répétabilité (préparation différente de l'échantillon) peut sensiblement varier d'une substance à l'autre. Néanmoins, il est de bonne pratique de viser pour la répétabilité des critères d'acceptation tels que $s_{rel} \leq 10$ pour cent [$n = 6$] pour une valeur centrale de la distribution (par exemple $x_{50}$), tandis que les valeurs aux bornes de la distribution (par exemple $x_{10}$ et $x_{90}$) seront soumises à des critères d'acceptation moins stricts tels que $s_{rel} \leq 15$ pour cent [$n = 6$]. Au-dessous de 10 µm, ces valeurs sont à multiplier par 2. On peut tester la robustesse lors de la sélection et de l'optimisation des milieux et forces de dispersion. L'effet de la modification de l'énergie de dispersion peut être étudié à travers la modification induite dans la distribution de taille des particules.

MESURE

**Précautions**. Il est important de respecter les consignes figurant dans le manuel d'utilisation de l'instrument :

- ne jamais regarder en face le faisceau laser direct ou réfléchi ;
- relier à la terre tous les composants de l'instrument, en raison des risques d'inflammation des solvants ou d'explosion de poussières ;
- vérifier les réglages de l'instrument (montée en température, étendue de mesure et lentilles requises, distance de travail, position du détecteur, absence d'illumination directe par une lumière vive, etc.) ;
- dans le cas de dispersions humides, éviter la formation de bulles d'air, l'évaporation de liquide, l'existence de discontinuités de densité ou toute autre source d'inhomogénéité de la dispersion. De même, dans le cas des dispersions sèches, éviter toute perturbation des conditions de flux à masse constante à la sortie du disperseur ou les effets de turbulence. Ces effets peuvent entraîner l'obtention de distributions granulométriques erronées.

**Mesure de la diffusion de l'(des) échantillon(s) dispersé(s)**. Après alignement des composants optiques de l'instrument, il convient d'effectuer une mesure à blanc du milieu de dispersion exempt de particules, par la même méthode que celle utilisée pour l'analyse de l'échantillon. Le signal de fond obtenu doit être inférieur à un seuil approprié. Les données fournies par le détecteur sont sauvegardées pour être ultérieurement soustraites des valeurs obtenues pour l'échantillon. La dispersion de l'échantillon est mesurée selon la méthode développée.

Un signal moyen est calculé pour chaque élément du détecteur, parfois avec l'écart type associé. L'amplitude du signal fourni par chaque élément dépend de la surface de détection, de l'intensité lumineuse et de l'efficacité quantique. Les coordonnées (taille et position) des éléments du détecteur, avec la distance focale de la lentille, déterminent la gamme d'angles de diffusion correspondant à chaque élément. La plupart des instruments mesurent également l'intensité du faisceau laser central (non diffusé). Le rapport entre les intensités respectivement obtenues en présence de l'échantillon dispersé et en son absence (mesure à blanc) indique la proportion de lumière diffusée et donc la concentration particulaire.

**Conversion du profil de diffusion en distribution granulométrique**. Cette étape de déconvolution est la réciproque du calcul d'un profil de diffusion à partir d'une distribution granulométrique donnée. L'hypothèse de sphéricité des particules joue ici un rôle particulièrement important, car la plupart des algorithmes utilisent la solution mathématique qui correspond à la diffusion par des particules sphériques.

Par ailleurs, les données mesurées contiennent toujours un certain nombre d'erreurs aléatoires et systématiques, qui peuvent fausser les résultats de distribution granulométrique. Plusieurs procédures mathématiques ont été développées pour l'utilisation des instruments existants. Elles comportent des systèmes de pondération des écarts entre profils de diffusion mesurés et calculés (moindres carrés, par exemple), des contraintes (non négativité des quantités de particules, par exemple) et/ou des méthodes de lissage de la courbe de distribution granulométrique.

Les algorithmes utilisés sont spécifiques de chaque type et modèle d'instrument, et sont déposés. L'utilisation de ces algorithmes avec des instruments différents peut entraîner des différences dans les calculs de distribution granulométrique.

**Répétitions**. Le nombre de répétitions (avec préparation individuelle de l'échantillon) à effectuer dépend de la fidélité de mesure requise. Il est recommandé de définir cette valeur au cas par cas, dans le cadre de chaque méthode spécifiquement applicable à une substance.

PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

Les données de distribution granulométrique sont généralement exprimées sous forme de distribution granulométrique cumulée et/ou de distribution de densité par volume. Le symbole $x$ représente la taille des particules, elle-même définie comme le diamètre de la sphère de volume équivalent. Q3($x$) représente la fraction en volume des particules de taille inférieure à $x$. En représentation graphique, la variable $x$ est portée en abscisse et la variable dépendante Q3 est portée en ordonnée. Les valeurs caractéristiques usuelles sont généralement calculées par interpolation à partir de la courbe de distribution granulométrique. Parmi les valeurs fréquemment utilisées figurent les tailles particulaires correspondant à des fractions cumulées de 10 pour cent, 50 pour cent et 90 pour cent, respectivement notées $x_{10}$, $x_{50}$ et $x_{90}$. La valeur $x_{50}$ est également appelée taille particulaire médiane. Le symbole $d$ étant également très utilisé pour désigner la taille des particules, il peut remplacer le symbole $x$.

Par ailleurs, il convient de réunir et de consigner toutes les informations utiles concernant l'échantillon, sa préparation, les conditions de dispersion et le type de cellule utilisé. Comme les résultats dépendent de l'instrument utilisé, du programme d'analyse des données associé et du modèle optique mis en oeuvre, ces aspects doivent également être consignés dans la documentation.

CONTRÔLE DES PERFORMANCES DE L'INSTRUMENT

Utilisez l'instrument suivant les instructions du fabricant et effectuez les opérations de qualification prescrites avec une périodicité appropriée, selon l'utilisation faite de l'instrument et les substances à examiner.

**Etalonnage**. Les systèmes de diffraction laser, bien qu'utilisant des propriétés idéalisées des particules, sont fondés sur les principes premiers de la diffusion de la lumière laser. Ils ne requièrent donc pas d'étalonnage au sens strict. Il est néanmoins nécessaire de confirmer le bon fonctionnement de l'instrumentation. Cette confirmation peut être effectuée au moyen de tout matériau de référence certifié acceptable au regard de la pratique industrielle. L'examen porte sur la procédure de mesure dans son ensemble, depuis les opérations de prélèvement, de dispersion et de transport des échantillons à l'intérieur de la zone de mesure jusqu'aux procédures de mesure et de déconvolution. Il est essentiel que l'ensemble de la procédure opératoire soit décrit dans le détail.

Il est recommandé d'employer des matériaux de référence certifiés, constitués de particules sphériques de distribution granulométrique connue. Ils doivent être étalonnés en termes de distribution granulométrique en pourcentage de masse par une technique absolue, si possible, et utilisés selon une procédure opératoire détaillée approuvée. Si la théorie de Mie est mise en oeuvre pour l'analyse des données, il est essentiel d'indiquer précisément les parties réelle et imaginaire de l'indice de réfraction complexe du matériel. La représentation de la distribution granulométrique en volume sera équivalente à celle de la distribution en masse à condition que la masse volumique des particules soit la même pour toutes les fractions granulométriques.

La réponse d'un instrument de diffractométrie laser est considérée comme conforme aux exigences si la valeur $x_{50}$ moyenne obtenue à partir d'au moins 3 mesures indépendantes ne s'écarte pas de plus de 3 pour cent de l'intervalle de valeurs certifié pour le matériau de référence utilisé. Pour les valeurs moyennes de $x_{10}$ et $x_{90}$, l'écart maximum admis par rapport à l'intervalle de valeurs certifié est de 5 pour cent. En dessous de 10 µm, ces valeurs doivent être multipliées par 2.

L'emploi de matériaux constitués de particules sphériques est préférable, mais il est également admis d'employer des particules non sphériques. Il est alors souhaitable que ces particules soient caractérisées par des valeurs types ou certifiées obtenues par diffractométrie laser selon une procédure opératoire détaillée et approuvée. L'emploi de valeurs de référence obtenues par des méthodes autres que la diffraction laser peut introduire un biais significatif, car les principes inhérents à ces méthodes peuvent conduire à l'obtention de diamètres différents, en équivalent-sphère, pour les mêmes particules non sphériques.

Bien que l'emploi de matériaux de référence certifiés soit préférable, celui d'autres matériaux de référence bien définis est également admis. Ce sont des substances représentatives d'une classe spécifiée de substances, dont la distribution granulométrique s'est avérée stable dans le temps. Les résultats obtenus doivent être conformes à des données prédéterminées, avec la même fidélité et le même biais que pour le matériau de référence certifié.

**Qualification du système**. Outre l'étalonnage, il convient de vérifier les performances de l'instrument à intervalles de temps réguliers ou aussi fréquemment que nécessaire. Cette qualification peut être effectuée à l'aide de tout matériau approprié tel que défini dans la section précédente.

La qualification du système repose sur l'idée que l'équipement, l'électronique, les logiciels et les opérations analytiques constituent un système intégré pouvant être évalué comme tel. L'examen porte donc sur la procédure de mesure dans son ensemble, depuis les opérations de prélèvement, de dispersion et de transport des échantillons à l'intérieur de la zone de mesure jusqu'aux procédures de mesure et de déconvolution. Il est essentiel que l'ensemble de la procédure opératoire soit décrit dans le détail.

En règle générale, sauf indication contraire dans la monographie spécifique, la réponse d'un instrument de diffractométrie laser est considérée comme conforme aux exigences si la valeur $x_{50}$ ne s'écarte pas de plus de 10 pour cent de l'intervalle de valeurs certifié pour le matériau de référence utilisé. Si les valeurs aux bornes de la distribution (par exemple $x_{10}$ et $x_{90}$) sont également évaluées, l'écart maximum admis par rapport à l'intervalle de valeurs certifié est de 15 pour cent. Au-dessous de 10 µm, ces valeurs doivent être multipliées par 2.

*NOTE : pour l'étalonnage de l'instrument, des exigences plus strictes sont spécifiées dans le paragraphe Etalonnage.*

**07/2008:20932**

# 2.9.32. POROSITÉ ET DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES PORES DES SOLIDES PAR POROSIMÉTRIE AU MERCURE

INTRODUCTION

De façon générale, les différents types de pores peuvent être décrits comme des orifices, canaux ou cavités au sein des corps solides, ou comme des espaces (interstices ou vides) entre particules solides au sein des lits, compacts ou agrégats. Le terme « porosité », souvent utilisé pour indiquer le caractère poreux de la matière solide, est plus précisément défini comme

le rapport du volume des pores et vides accessibles au volume total occupé par une quantité donnée du solide. Outre les pores accessibles, un solide peut comporter des pores fermés, qui sont isolés de la surface extérieure et dans lesquels les fluides ne peuvent pas pénétrer. La caractérisation des pores fermés, c'est à dire des cavités ne disposant pas d'accès vers une surface extérieure, ne fait pas l'objet du présent chapitre.

Les matières poreuses peuvent se présenter sous la forme de poudres plus ou moins fines, de compacts, d'extrudats, de feuilles ou de monolithes. Leur caractérisation implique souvent de déterminer à la fois le volume total des pores, ou la porosité, et la distribution de la taille des pores.

Les performances d'un solide poreux (résistance, réactivité, perméabilité ou capacité d'adsorption, etc.) sont conditionnées par sa structure poreuse. De nombreuses méthodes ont été développées pour la caractérisation de la structure poreuse. Les résultats obtenus par ces différentes méthodes ne concordent pas toujours, ce qui n'est guère surprenant compte tenu de la complexité de la plupart des solides poreux. Aucune méthode ne permet à elle seule d'obtenir une image fiable et complète de la structure poreuse. Il convient donc de choisir la méthode la plus appropriée selon l'application envisagée du solide poreux, sa nature chimique et physique et la taille des pores qu'il renferme.

Le présent chapitre donne des indications sur la mesure de la porosité et de la distribution de la taille des pores par la technique dite de porosimétrie au mercure. Cette technique de type comparatif, généralement destructive, consiste à déterminer le volume de mercure ayant pénétré un pore ou un vide en fonction de la pression hydrostatique appliquée, qui peut être corrélée à un diamètre de pore. On peut également déduire des courbes volume-pression d'autres informations sur la forme des pores et leurs interconnexions, sur la mesure des surfaces interne et externe, sur la granulométrie d'une poudre, sur la masse volumique vrac et la masse volumique après tassement ; ces aspects ne sont toutefois pas traités dans le présent chapitre.

Pour des raisons d'ordre pratique, la pression absolue applicable avec certains appareils est actuellement limitée à des valeurs maximales de l'ordre de 400 MPa, ce qui correspond à un diamètre de pores équivalent minimum d'environ 0,003 μm. Le diamètre maximum sera limité, dans le cas des échantillons présentant une épaisseur significative, par la différence de pression hydrostatique exercée par le mercure de haut en bas de l'échantillon. Dans la plupart des cas, on peut estimer cette limite à environ 400 μm.

Il est possible de déterminer la porosité interparticulaire et intraparticulaire, mais la méthode décrite ici ne permet pas de distinguer ces 2 types de porosité lorsqu'ils coexistent.

Cette méthode convient à l'étude de la plupart des matières poreuses. Les échantillons formant des amalgames avec le mercure, comme certains métaux, peuvent ne pas se prêter à cette technique ou nécessiter une passivation préalable. D'autres risquent de se déformer ou de se compacter sous l'effet des pressions appliquées. Il est toutefois possible, dans certains cas, d'appliquer des corrections de compressibilité de l'échantillon et d'obtenir ainsi des données comparatives utiles.

La porosimétrie au mercure est à considérer comme une technique comparative dans la mesure où, pour la plupart des milieux poreux, il n'existe pas de théorie permettant le calcul absolu des résultats de distribution de la taille des pores. Son emploi est, par conséquent, principalement recommandé pour les études de développement.

Le mercure est un composé toxique. Il est donc indispensable de respecter les précautions d'usage pour protéger la santé de l'opérateur et des autres personnes travaillant dans la zone. Les déchets doivent être évacués selon des modalités appropriées, conformes à la réglementation locale en vigueur.

PRINCIPE

La technique décrite repose sur la mesure du volume de mercure qui pénètre dans un solide poreux en fonction de la pression appliquée. La mesure ne prend en compte que les pores dans lesquels le mercure est capable de pénétrer à la pression appliquée.

Un liquide non mouillant ne peut pénétrer dans un système poreux que sous pression. La pression à appliquer est inversement proportionnelle au diamètre intérieur de l'orifice des pores. Dans le cas des pores cylindriques, la corrélation entre diamètre de pore et pression est donnée par l'équation de Washburn :

$$d_p = -\frac{4 \cdot \sigma}{p} \cos\theta$$

$d_p$ = diamètre de pore, en mètres,

$\sigma$ = tension superficielle, en newtons par mètre,

$\theta$ = angle de contact du mercure sur l'échantillon, en degrés,

$p$ = pression appliquée, en pascals.

APPAREILLAGE

Le porte-échantillon, également appelé pénétromètre ou dilatomètre, est muni d'un tube capillaire calibré permettant la mise sous vide de l'échantillon et l'introduction du mercure. Ce tube capillaire est fixé à un tube plus large dans lequel est placé l'échantillon à examiner. La variation du volume de mercure résultant de l'intrusion est généralement déterminée par mesure de la variation de capacitance entre la colonne de mercure contenue dans le tube capillaire et un manchon métallique entourant ce tube. Si l'on veut procéder à des mesures précises, il faut que le volume total présumé des vides et des pores de l'échantillon soit compris entre 20 pour cent et 90 pour cent du volume interne du tube capillaire. Compte tenu de la diversité des valeurs de porosité des solides, il peut être nécessaire d'utiliser plusieurs pénétromètres se différenciant par le diamètre du capillaire et le volume d'échantillon. La figure 2.9.32.-1 représente le montage type d'un porosimètre au mercure. Le porosimètre peut comporter des ports séparés pour les opérations à haute ou basse pression ; les mesures à basse pression peuvent également être effectuées sur une unité séparée.

La fourchette de pression est généralement de 4-300 kPa pour les opérations à basse pression et supérieure à 300 kPa pour les opérations à haute pression, selon la configuration de l'appareillage et l'usage attendu.

MODE OPÉRATOIRE

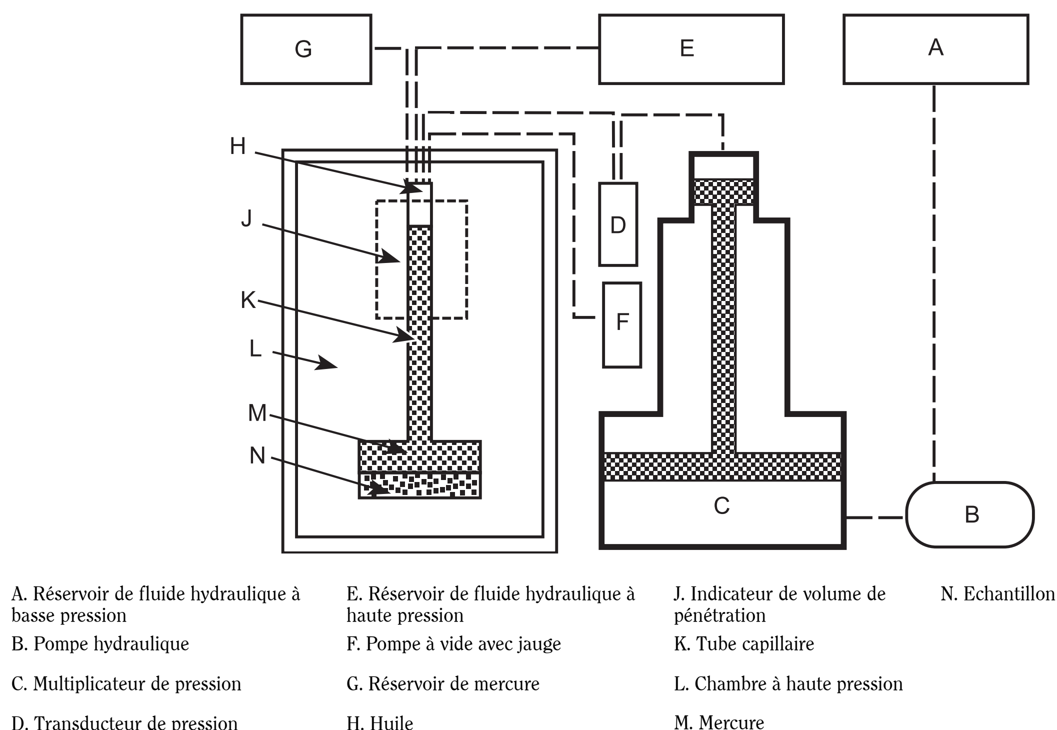
**Préparation de l'échantillon**

L'échantillon doit subir un traitement préalable permettant d'éliminer les matières adsorbées qui pourraient masquer sa porosité accessible. On peut, par exemple, procéder par chauffage et/ou mise sous vide, ou par balayage par un flux de gaz inerte. Pour les solides mouillables ou pouvant former des amalgames, il est possible de procéder à une passivation de la surface, par exemple en produisant une fine couche d'oxyde ou en recouvrant la surface de stéarate.

Pesez et transférez dans le pénétromètre l'échantillon de solide ainsi traité. Procédez au dégazage sous vide du système poral de l'échantillon, jusqu'à une pression résiduelle maximale de 7 Pa.

**Remplissage du pénétromètre avec le mercure**

Le mercure utilisé doit être de qualité analytique. Recouvrez l'échantillon de mercure, en opérant sous vide. Le vide est nécessaire pour assurer le transfert du mercure du réservoir dans le pénétromètre. Dans un pénétromètre rempli, la pression de remplissage comprend la pression appliquée et la composante de pression générée par la tête de mercure au contact de l'échantillon. La pression de remplissage type est de l'ordre de




A. Réservoir de fluide hydraulique à basse pression
B. Pompe hydraulique
C. Multiplicateur de pression
D. Transducteur de pression
E. Réservoir de fluide hydraulique à haute pression
F. Pompe à vide avec jauge
G. Réservoir de mercure
H. Huile
J. Indicateur de volume de pénétration
K. Tube capillaire
L. Chambre à haute pression
M. Mercure
N. Echantillon

Figure 2.9.32.-1. – *Exemple de montage d'un porosimètre au mercure*

4 kPa. On peut réduire la pression hydrostatique du mercure sur l'échantillon en remplissant le pénétromètre en position horizontale.

**Mesure sous basse pression**

Procédez à l'admission contrôlée de l'air ou de l'azote de façon à augmenter la pression soit par paliers correspondant aux tailles particulières de pores visées, soit en continu de façon lente. Notez la variation concomitante de longueur de la colonne de mercure dans le tube capillaire. Une fois la pression maximale prescrite atteinte, revenez à la pression atmosphérique.

**Mesure sous pression élevée**

Après avoir effectué la mesure sous basse pression, transférez le pénétromètre rempli de mercure dans le port ou unité de l'appareil destiné aux pressions élevées et recouvrez de fluide hydraulique. L'intrusion du mercure dans le système poral s'effectue par l'intermédiaire du fluide hydraulique. Augmentez la pression dans le système jusqu'à la valeur maximale atteinte lors de la mesure sous basse pression et notez le volume d'intrusion sous cette pression ; c'est en effet à partir de ce volume initial que sera calculé le volume d'intrusion ultérieur. Augmentez à nouveau la pression soit par paliers correspondant aux tailles particulières de pores visées, soit en continu de façon lente. Mesurez la baisse de niveau concomitante de la colonne de mercure. Une fois la pression maximale prescrite atteinte, revenez à la pression atmosphérique en faisant, si nécessaire, redescendre la pression par paliers ou en continu de façon lente pour déterminer la courbe d'extrusion du mercure.

Effectuez les corrections nécessaires pour tenir compte des variations affectant, sous pression élevée, le volume de mercure, le pénétromètre et les autres composants du système de détermination du volume. La valeur de ces corrections peut être déterminée à l'aide de mesures à blanc effectuées dans des conditions identiques.

La figure 2.9.32.-2 représente une courbe volume-pression établie expérimentalement.

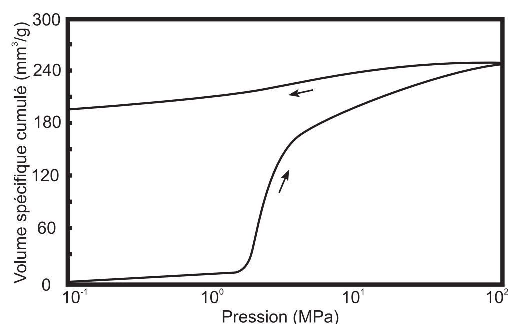



Figure 2.9.32.-2. – *Courbe volume-pression en coordonnées semi-logarithmiques*

RÉSULTATS

Convertissez les lectures de pression en diamètres de pores à l'aide de l'équation de Washburn ou selon une autre modélisation.

La tension superficielle ($\sigma$) du mercure dépend non seulement de la température, mais aussi, dans le cas de surfaces fortement incurvées, du rayon de courbure. En général, les valeurs mesurées à température ambiante vont de 0,41 $N{\cdot}m^{-1}$ à 0,52 $N{\cdot}m^{-1}$. Si la valeur de $\sigma$ n'est pas connue, on peut prendre $\sigma$ = 0,48 $N{\cdot}m^{-1}$.

L'angle de contact ($\theta$) du mercure est dans la plupart des cas supérieur à 90°. Il peut être déterminé à l'aide d'un instrument de mesure de l'angle de contact. Si la valeur de $\theta$ n'est pas connue, on peut prendre $\theta$ = 130°. Il convient d'indiquer avec les résultats les valeurs de la tension superficielle et de l'angle de contact utilisées ainsi que la modélisation utilisée.

La représentation visuelle des données peut être réalisée avec différents types de graphes. Dans ces représentations graphiques, on porte souvent en abscisse le diamètre des pores et en ordonnée le volume d'intrusion par unité de masse de l'échantillon, afin de visualiser la distribution de taille des pores. L'emploi d'une échelle logarithmique en abscisse est recommandé (voir figure 2.9.32.-3). Les espaces interparticulaires de l'échantillon solide sont assimilés à des pores dans le calcul. Si les pores diffèrent des vides par leur taille, il est possible d'isoler ces derniers en choisissant la gamme de tailles de pores appropriée.

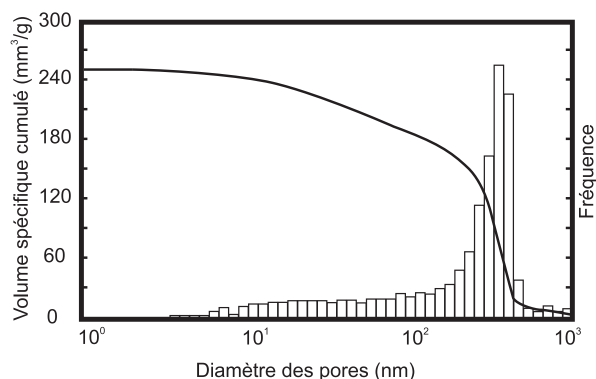



Figure 2.9.32.-3. – *Distribution de la taille des pores en coordonnées semi-logarithmiques de la distribution de densité cumulée et normalisée*

Les courbes d'extrusion peuvent ne pas être utilisées pour calculer la distribution de la taille des pores (pour l'hystérésis, voir figure 2.9.32.-2) car une partie du mercure introduit est retenue dans le système poral. Le taux de rétention peut en revanche être un paramètre utile pour la caractérisation qualitative des pores qui ne sont accessibles que par des ouvertures étroites (pores en « bouteille d'encre »).

Les valeurs caractéristiques les plus courantes, comme le volume spécifique d'intrusion total et le diamètre médian et moyen des pores, sont calculées à partir de la distribution de la taille des pores. De plus, les résultats doivent être accompagnés d'informations suffisantes sur l'échantillon, son mode de préparation, les conditions de mise sous vide et l'instrumentation utilisée.

CONTRÔLE DES PERFORMANCES DE L'INSTRUMENT

La technique de porosimétrie au mercure étant considérée comme une méthode comparative, cet aspect ne fait pas l'objet d'une présentation détaillée dans le présent chapitre. Il est simplement recommandé d'examiner de façon régulière un matériel de référence stable pour vérifier l'étalonnage et les performances de l'instrument.

**01/2009:20933**

## 2.9.33. CARACTÉRISATION DES SOLIDES CRISTALLINS ET PARTIELLEMENT CRISTALLINS PAR DIFFRACTION X SUR POUDRE

Chaque phase cristalline présente dans une substance donnée produit une « image » de diffraction X caractéristique.

De telles images, appelées diffractogrammes (ou encore diagrammes ou spectres de diffraction), sont obtenues à partir de poudres cristallines présentant une orientation aléatoire, composées de cristallites ou fragments cristallins de taille finie. Le diffractogramme d'une poudre fournit essentiellement 3 types d'informations : la position angulaire des raies de diffraction, qui est fonction de la géométrie et de la taille de la maille cristalline ; l'intensité des raies de diffraction, qui dépend principalement de la nature et de l'arrangement des atomes ainsi que de l'orientation des particules dans l'échantillon ; et la forme des raies de diffraction, qui est fonction de la résolution de l'instrument, de la taille des cristallites, des contraintes et de l'épaisseur d'échantillon.

L'étude de la position angulaire et de l'intensité des raies de diffraction peut servir à des applications telles que l'analyse qualitative des phases (par exemple, identification des phases cristallines) et l'analyse quantitative des phases d'un matériau cristallin. Une estimation des fractions amorphe et cristalline[(8)] peut également être effectuée.

La diffractométrie X sur poudre comporte l'avantage, sur d'autres méthodes d'analyse, d'être en général non destructive (la préparation des échantillons se limite habituellement à un broyage destiné à assurer une orientation aléatoire au sein de l'échantillon). Les analyses de diffractométrie X sur poudre peuvent par ailleurs être réalisées dans des conditions *in situ* sur des échantillons exposés à des conditions non ambiantes, par exemple, à des températures et des taux d'humidité faibles ou élevés.

PRINCIPE

La diffraction des rayons X résulte de l'interaction de ces rayons avec le nuage électronique des atomes. Selon l'arrangement atomique, les rayons X diffractés produisent des interférences.

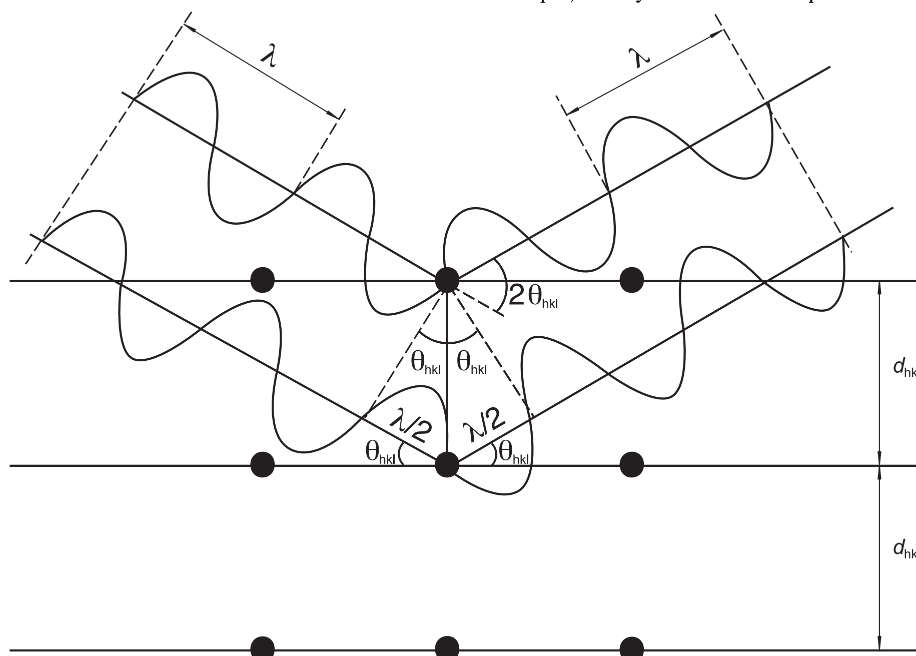



Figure 2.9.33.-1. – *Diffraction des rayons X par un cristal, selon la loi de Bragg*

(8) Il existe de nombreuses autres applications de la diffractométrie X sur poudre qui peuvent concerner les substances pharmaceutiques à structure cristalline : élucidation et affinement des structures cristallines, détermination de la pureté cristallographique des phases cristallines, caractérisation de la texture cristallographique, etc. Ces applications ne sont pas décrites dans ce chapitre.

Ces interférences sont constructives si la différence de marche entre 2 ondes X diffractées est un multiple entier de la longueur d'onde, condition décrite par la relation (ou loi) de Bragg (figure 2.9.33.-1) :

$$2d_{\mathrm{hkl}}\sin\theta_{\mathrm{hkl}} = \mathrm{n}\lambda$$

La longueur d'onde λ du rayonnement X est du même ordre de grandeur que la distance $d_{hkl}$ séparant les plans réticulaires successifs, ou distance inter-réticulaire ; $\theta_{hkl}$ est l'angle d'incidence du faisceau X sur la famille de plans réticulaires, et $\sin\theta_{hkl}$ est inversement proportionnel à la distance inter-réticulaire.

L'orientation et l'espacement des plans par rapport aux axes des mailles élémentaires sont définis par les indices de Miller {*hkl*}. Ces indices sont les inverses, réduits à l'entier immédiatement inférieur, des intersections du plan avec les axes de la maille élémentaire. Les dimensions de la maille élémentaire sont données par les distances sur les axes *a*, *b* et *c* et par les angles α, β et γ formés par ces axes.

La distance inter-réticulaire d'une famille donnée de plans parallèles *hkl* est notée $d_{hkl}$. Chaque famille de plans ainsi identifiée peut présenter des ordres de diffraction supérieurs, où les valeurs *d* associées aux familles de plans n*h*, n*k*, n*l* diminuent d'un facteur 1/n (n étant un entier : 2, 3, 4, etc.).

A chaque famille de plans présente dans un cristal est associé, selon la relation de Bragg, un angle de diffraction spécifique $\theta_{hkl}$ (pour une longueur d'onde λ spécifique).

Un échantillon de poudre est supposé polycristallin, de sorte qu'il existe pour tout angle $\theta_{hkl}$ des cristallites dont l'orientation permet la diffraction selon la loi de Bragg[(9)]. Pour une longueur d'onde X donnée, la position des pics de diffraction (également appelés « raies », « réflexions » ou « réflexions de Bragg ») est caractéristique de l'architecture du réseau cristallin (distances inter-réticulaires), tandis que leur intensité théorique dépend du contenu de la maille élémentaire (nature et position des atomes) et la forme des raies de la perfection et de l'étendue du réseau cristallin. Le pic de diffraction présente alors une intensité finie qui est la résultante de l'arrangement atomique, du type d'atomes, des mouvements thermiques et des imperfections structurelles, ainsi que des caractéristiques instrumentales.

L'intensité dépend de plusieurs paramètres tels que la structure, la température, la cristallinité, la polarisation, la multiplicité et le facteur de Lorentz.

Les principaux paramètres caractérisant les raies de diffraction sont la position 2θ, la hauteur, la surface et la forme des pics (décrite, par exemple, par la largeur ou l'asymétrie du pic, ou par une fonction analytique ou une représentation empirique). A titre d'exemple, des enregistrements obtenus pour une même substance sous 5 phases solides différentes sont présentés dans la figure 2.9.33.-2.

Outre les pics de diffraction, une analyse par diffractométrie X génère un fond plus ou moins uniforme, sur lequel se surimposent les pics. A ce bruit de fond contribuent, en plus de la préparation de l'échantillon, d'autres facteurs comme le porte-échantillon, la diffraction diffuse due à l'air et à l'équipement, et d'autres paramètres instrumentaux tels que le bruit du détecteur, le rayonnement général du tube générateur de rayons X, etc. Il est possible d'augmenter le rapport signal/bruit en réduisant le fond et en opérant avec des temps d'exposition plus longs.

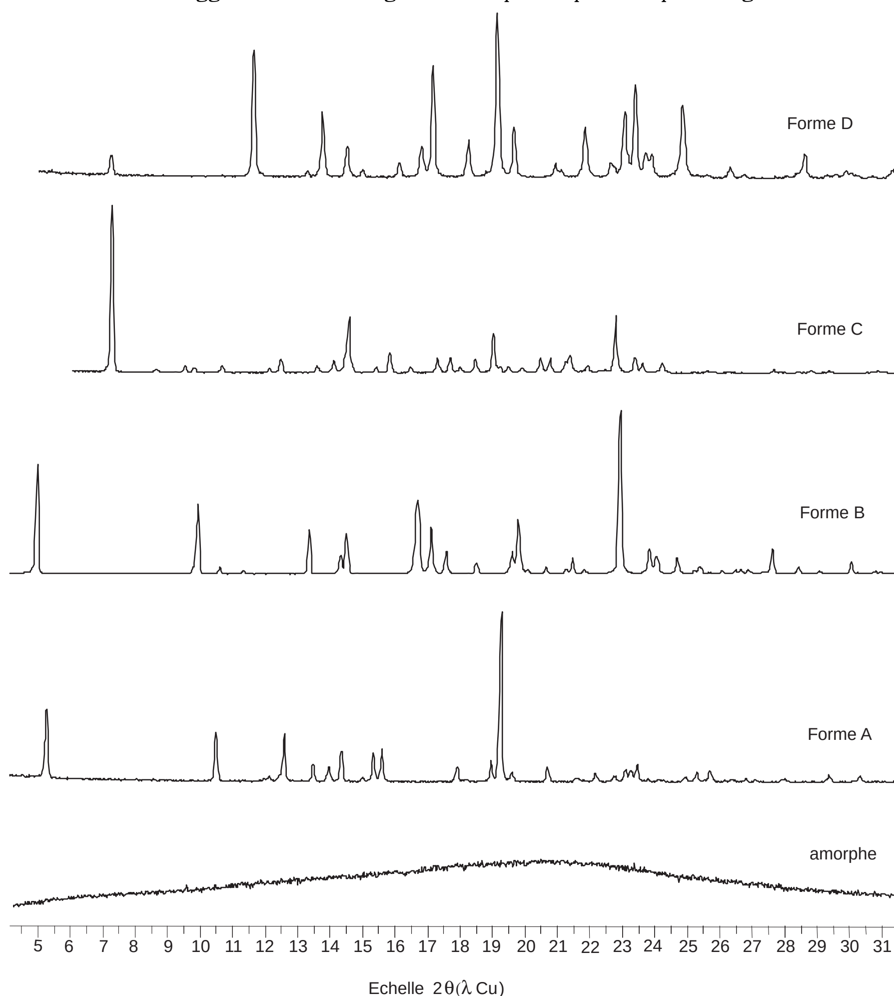



Figure 2.9.33.-2. – *Diffractogrammes obtenus avec 5 phases solides différentes d'une même substance (intensités normalisées)*

(9) La poudre « idéale », pour une étude de diffraction, se compose d'un grand nombre de petits cristallites sphériques (domaines cristallins à diffraction cohérente) d'orientation aléatoire. Si leur nombre est suffisant, il y aura toujours dans la poudre suffisamment de cristallites présentant une orientation telle que l'on puisse obtenir un diffractogramme reproductible.

APPAREILLAGE

**Composants de l'appareillage**. Les analyses par diffraction X sont généralement effectuées au moyen de diffractomètres sur poudre ou d'appareils à chambre photographique.

Un diffractomètre sur poudre comprend généralement 5 parties principales : une source de rayons X, des éléments optiques agissant sur le faisceau incident (monochromatisation, filtrage, collimation et/ou focalisation, etc.), un goniomètre, des éléments optiques agissant sur le faisceau diffracté (monochromatisation, filtrage, collimation et focalisation ou parallélisation, etc.) et un détecteur. Des systèmes d'acquisition et de traitement des données sont également nécessaires et sont généralement inclus dans les appareils modernes.

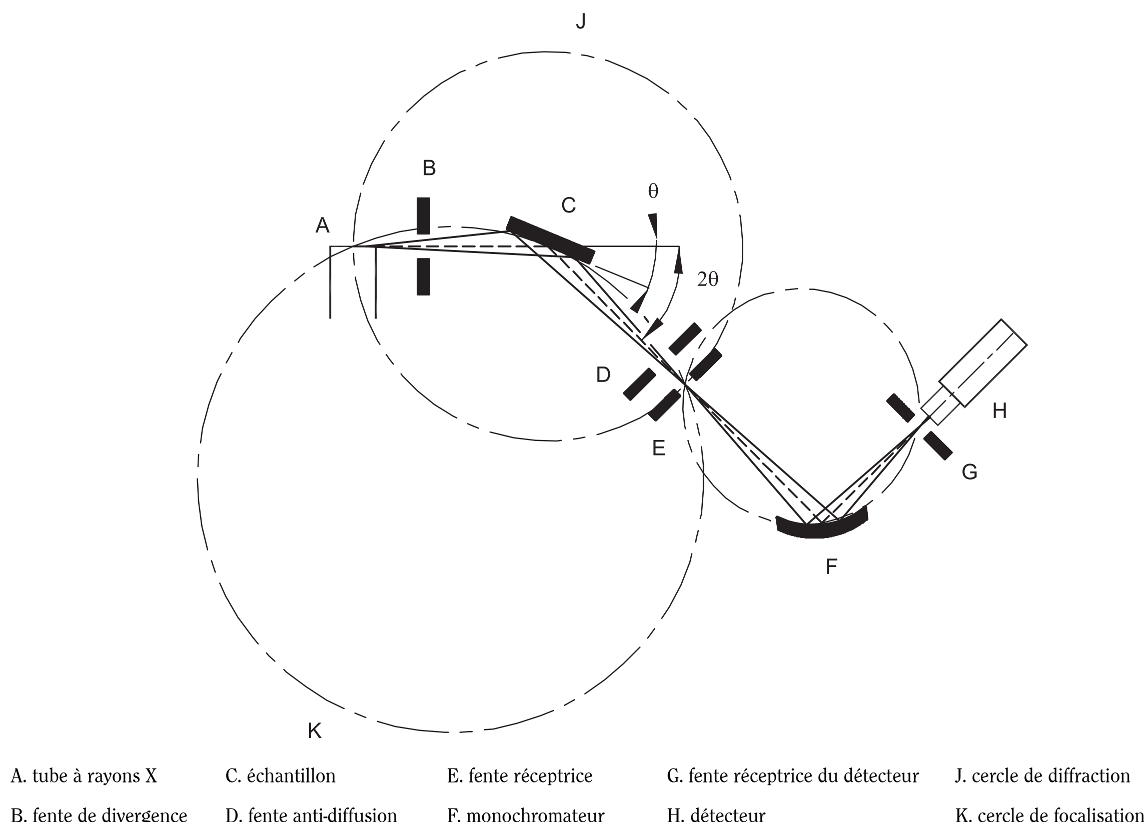
Le type d'analyse à effectuer (identification de phases, analyse quantitative, détermination des paramètres de maille, etc.) conditionne la configuration instrumentale et le niveau de performance requis. L'instrument le plus simple permettant d'enregistrer des diffractogrammes de poudres est la chambre photographique. Le remplacement du film photographique par des détecteurs photoniques comme outils de détection a conduit au développement de diffractomètres où la géométrie des éléments optiques n'est pas à véritable focalisation, mais à focalisation approchée comme dans la géométrie de Bragg-Brentano. Le montage en focalisation approchée de Bragg-Brentano, actuellement le plus utilisé, est brièvement décrit ici.

Un instrument donné peut être utilisé soit en géométrie $\theta/2\theta$ horizontale ou verticale soit en géométrie $\theta/\theta$ verticale. Dans les 2 géométries, le faisceau X incident forme un angle $\theta$ avec la surface plane de l'échantillon et le faisceau X diffracté forme un angle $2\theta$ avec la direction du faisceau X incident (et un angle $\theta$ avec la surface plane de l'échantillon). Le montage classique est représenté figure 2.9.33.-3. Le faisceau incident divergent émis par le tube générateur (dit « faisceau primaire ») passe à travers des collimateurs parallèles et une fente de divergence, puis illumine la surface plane de l'échantillon. Tous les rayons diffractés selon un angle $2\theta$ par des cristallites convenablement orientés convergent en une ligne au niveau d'une fente réceptrice. Un second groupe de collimateurs parallèles et une fente anti-diffusion peuvent être placés avant ou après la fente réceptrice. Les axes de la focale et de la fente réceptrice se situent à égale distance de l'axe du goniomètre. Les quanta de rayonnement X sont comptés par un détecteur de rayonnement, qui est généralement un compteur à scintillation, un compteur proportionnel à gaz scellé ou un détecteur « état solide » sensible à la position, par exemple à plaque photosensible (*image plate*) ou à couplage de charge (CCD). La fente réceptrice et le détecteur sont solidaires et se déplacent tangentiellement au cercle de focalisation. Pour les balayages $\theta/2\theta$, le goniomètre entraîne l'échantillon en rotation autour du même axe que le détecteur, mais à une vitesse 2 fois plus faible, selon une géométrie $\theta/2\theta$. La surface de l'échantillon reste donc tangentielle au cercle de focalisation. Le collimateur parallèle limite la divergence axiale du faisceau et contrôle donc partiellement la forme des raies de diffraction.

Un diffractomètre peut également être utilisé en mode transmission. L'avantage de cette technique est de réduire les effets dus à l'orientation préférentielle. Un capillaire d'une épaisseur d'environ 0,5-2 mm peut également être utilisé pour les petits échantillons.

**Rayonnement X**. Au laboratoire, les rayons X sont produits par bombardement d'une anode métallique avec des électrons émis par effet thermoionique et accélérés dans un champ électrique puissant (produit par un générateur haute tension). L'énergie cinétique des électrons est en grande partie dissipée sous forme de chaleur, ce qui limite la puissance des tubes et nécessite un système efficace de refroidissement de l'anode. L'utilisation d'anodes tournantes et l'emploi d'optiques X permettent un gain de brillance d'un facteur 20 à 30. Une autre approche possible consiste à produire des photons X dans un centre de rayonnement à grande échelle (synchrotron).

Le spectre d'émission d'un tube générateur de rayons X opérant sous une différence de potentiel suffisante se compose d'un fond continu de rayonnement polychromatique auquel s'ajoute un rayonnement caractéristique dépendant du type d'anode. Seul ce rayonnement caractéristique est utilisé dans les analyses par diffraction X. Les sources les plus courantes en diffractométrie X sont les tubes à vide à anode de cuivre, molybdène, fer, cobalt




A. tube à rayons X  C. échantillon  E. fente réceptrice  G. fente réceptrice du détecteur  J. cercle de diffraction
B. fente de divergence  D. fente anti-diffusion  F. monochromateur  H. détecteur  K. cercle de focalisation

Figure 2.9.33.-3. – *Montage en focalisation approchée de Bragg-Brentano*

ou chrome ; les rayons X du cuivre, du molybdène ou du cobalt sont les plus utilisés pour les substances organiques (les anodes de cobalt, notamment, peuvent permettre une meilleure séparation des raies X). Le choix du rayonnement à mettre en oeuvre dépendra des propriétés d'absorption de l'échantillon et d'une éventuelle émission de fluorescence par les atomes contenus dans l'échantillon. Les longueurs d'onde utilisées en diffractométrie de poudre correspondent généralement au rayonnement $K_\alpha$ émis par l'anode. Il est donc souhaitable de rendre le faisceau X « monochromatique » en éliminant toutes les autres composantes du spectre d'émission. Cette opération peut être partiellement assurée par des filtres $K_\beta$, qui sont des filtres métalliques dont le seuil d'absorption est compris entre les longueurs d'onde $K_\alpha$ et $K_\beta$ émises par le tube.

Un tel filtre est généralement inséré entre le tube générateur de rayons X et l'échantillon. Une autre façon, de plus en plus employée, d'obtenir un faisceau X monochromatique est d'utiliser un cristal monochromateur de grande taille (communément appelé « monochromateur »). Ce cristal, placé avant ou après l'échantillon, diffracte les différents pics caractéristiques du faisceau X (c'est-à-dire $K_\alpha$ et $K_\beta$) selon différents angles, de façon à permettre la sélection et l'entrée dans le détecteur d'un seul d'entre eux. Il est même possible de séparer les rayonnements $K_{\alpha 1}$ et $K_{\alpha 2}$ en utilisant un monochromateur spécifique. Malheureusement, le gain obtenu en produisant un faisceau monochromatique à l'aide d'un filtre ou d'un monochromateur est contrebalancé par une perte d'intensité. Une autre méthode permettant de séparer les longueurs d'onde $K_\alpha$ et $K_\beta$ consiste à utiliser des miroirs courbes pour rayons X, capables d'opérer simultanément la monochromatisation et la focalisation ou la parallélisation du faisceau X.

*PROTECTION CONTRE LES RAYONNEMENTS : l'exposition de toute partie du corps humain à un rayonnement X constitue un risque pour la santé. Il est donc essentiel, lorsque l'on utilise un équipement mettant en oeuvre des rayons X, de prendre des précautions adéquates pour assurer la protection de l'opérateur et de toute autre personne se trouvant à proximité. Les pratiques recommandées pour assurer cette protection, ainsi que les niveaux maximums admissibles d'exposition aux rayons X, sont régis par la législation nationale de chaque pays. En l'absence de réglementations ou recommandations officielles dans un pays, il convient de se référer aux recommandations les plus récentes de la Commission Internationale de Protection Radiologique.*

## PRÉPARATION ET MONTAGE DE L'ÉCHANTILLON

La préparation des matériaux pulvérisés et le montage des échantillons dans un porte-échantillon approprié constituent des étapes critiques de nombreuses méthodes d'analyse, particulièrement en diffractométrie X sur poudre où elles peuvent affecter très sensiblement la qualité des données collectées[(10)]. Les principales sources d'erreur associées à la préparation et au montage de l'échantillon sont brièvement discutées ici, dans le contexte des instruments opérant en focalisation approchée de Bragg-Brentano.

### *PRÉPARATION*

La morphologie des particules cristallines tend en général à donner un échantillon présentant dans son support un certain degré d'orientation préférentielle. Ceci est particulièrement évident dans le cas de cristaux en forme d'aiguilles ou de plaquettes, où la réduction de taille donne des aiguilles ou des plaquettes plus petites. L'orientation préférentielle au sein de l'échantillon affecte l'intensité des différentes réflexions, si bien que certaines sont moins intenses et d'autres plus intenses que ce que l'on attendrait d'un échantillon sans orientation préférentielle. Plusieurs techniques peuvent être mises en oeuvre pour améliorer le caractère aléatoire de l'orientation des cristallites (et donc limiter l'orientation préférentielle), mais l'approche la plus simple et la plus satisfaisante est souvent une réduction plus poussée de la taille des particules. Le nombre optimal de cristallites dépend de la géométrie du diffractomètre, de la résolution requise et de l'atténuation du faisceau X par l'échantillon. Dans certains cas, des particules de taille importante (pouvant aller jusqu'à 50 μm) donneront des résultats satisfaisants en identification de phases. Un broyage trop poussé (cristallites de taille inférieure à environ 0,5 μm) peut toutefois entraîner un élargissement des raies et des altérations significatives de l'échantillon lui-même, par exemple :

– par contamination de l'échantillon par des particules arrachées aux instruments de broyage (mortier, broyeur, billes, etc.),
– par réduction du degré de cristallisation,
– par transition à l'état solide donnant un autre polymorphe,
– par décomposition chimique,
– par introduction de contraintes internes,
– par induction de réactions à l'état solide.

Il est donc recommandé de comparer le diffractogramme de l'échantillon non broyé à celui d'un échantillon contenant des particules de plus petite taille (par exemple, un échantillon broyé). Si le diffractogramme obtenu est de qualité adéquate pour l'usage visé, il peut être inutile de procéder à un broyage.

Il est à noter que, si un échantillon contient plusieurs phases et que l'on effectue un tamisage pour isoler des particules de taille spécifique, la composition initiale peut s'en trouver altérée.

### *MONTAGE*

**Effet de déplacement de l'échantillon**. Un désaxage $D$ de la surface de l'échantillon par rapport à l'axe de rotation du diffractomètre entraîne des erreurs systématiques qu'il est très difficile d'éviter totalement ; en mode réflexion, ceci se traduit par des décalages absolus $D \cdot \cos\theta$[(11)] aux positions $2\theta$ (typiquement de l'ordre de 0,01° aux angles faibles ($\cos\theta \simeq 1$) pour un déplacement $D$ = 15 μm) et un élargissement asymétrique du profil vers les valeurs $2\theta$ faibles. L'emploi d'un étalon interne approprié permet de détecter et corriger simultanément cet effet et l'effet de transparence de l'échantillon. Cette source d'erreur est de loin la plus importante lorsque le diffractomètre est correctement aligné.

**Effets d'épaisseur et de transparence de l'échantillon**. En diffractométrie X sur poudre en mode réflexion, il est souvent préférable de travailler sur des échantillons d'épaisseur « infinie ». Afin de minimiser l'effet de transparence, il est souhaitable d'utiliser un support non diffractant (à bruit de fond nul) tel qu'une plaque de silicium monocristallin coupée parallèlement aux plans réticulaires 510[(12)]. L'un des avantages d'opérer en mode transmission est la moindre importance des problèmes liés à l'épaisseur et à la transparence de l'échantillon. L'emploi d'un étalon interne approprié permet de détecter et corriger simultanément cet effet et l'effet de déplacement de l'échantillon.

## CONTRÔLE DE LA PERFORMANCE DE L'APPAREILLAGE

Les goniomètres et les éléments optiques qui agissent sur le faisceau X avant et après diffraction comportent de nombreuses parties mécaniques nécessitant un ajustement. Le degré d'alignement ou de mésalignement affecte directement la qualité des résultats de l'analyse diffractométrique. Il est donc essentiel de procéder à un ajustement soigneux des différents éléments composant le diffractomètre (systèmes optiques et mécaniques, etc.) afin de limiter les erreurs systématiques tout en optimisant les intensités reçues par le détecteur. La recherche de l'intensité

(10) De même, des modifications peuvent intervenir dans l'échantillon lors de la collecte des données si l'équilibre au sein de l'échantillon n'est pas assuré (température, humidité).
(11) Notons qu'un désalignement du zéro du goniomètre entraînerait un décalage constant à toutes les positions $2\theta$ observées, autrement dit une translation de l'ensemble du diffractogramme de Z° en $2\theta$.
(12) Dans le cas d'un échantillon mince à faible atténuation, une mesure exacte des positions de raies est possible en opérant avec un diffractomètre focalisant sous une géométrie de transmission ou de réflexion. Pour l'exactitude de la mesure des positions de raies sur des échantillons à faible atténuation, il est préférable d'utiliser des diffractomètres à optique de faisceau parallèle. Ceci permet de réduire l'effet d'épaisseur de l'échantillon.

maximale et celle de la résolution maximale, lors de l'alignement d'un diffractomètre, sont toujours antagonistes. Il faut donc rechercher un compromis optimal entre les deux. Il existe de nombreuses configurations possibles, et chaque appareil requiert des procédures d'alignement spécifiques.

Le bon fonctionnement global du diffractomètre doit ensuite être contrôlé et vérifié périodiquement au moyen de matériaux de référence certifiés appropriés. Selon le type d'analyse, un autre matériau de référence bien défini peut également être utilisé, bien que l'usage de matériaux de référence certifiés est préférable.

ANALYSE QUALITATIVE DES PHASES (IDENTIFICATION DES PHASES)

L'identification par diffractométrie X sur poudre des phases en présence, dans un échantillon inconnu, repose habituellement sur la comparaison, visuelle ou assistée par ordinateur, d'une portion du diffractogramme obtenu avec celui (expérimental ou calculé) d'un matériau de référence. Dans le cas idéal, il est souhaitable que ces diffractogrammes de référence soient obtenus à partir d'échantillons monophases bien caractérisés. Cette approche permet, dans la plupart des cas, d'identifier une substance cristalline à partir des angles de diffraction 2θ ou des distances inter-réticulaires, et des intensités relatives. La comparaison, assistée par ordinateur, du diffractogramme de l'échantillon inconnu avec les données de référence peut porter, soit sur un intervalle 2θ plus ou moins étendu du diffractogramme total, soit sur un corps de données réduites dérivées du diffractogramme. Par exemple, la liste des distances inter-réticulaires et des intensités normalisées $I_{norm}$, dite « liste ($d$, $I_{norm}$) », extraite du diffractogramme, constitue la signature cristallographique du produit et peut être comparée aux listes ($d$, $I_{norm}$) d'échantillons monophases enregistrées dans des bases de données.

Pour la plupart des cristaux organiques, lorsque le rayonnement $CuK_\alpha$ est utilisé, il est approprié d'enregistrer le diffractogramme sur un intervalle 2θ allant d'une valeur aussi voisine que possible de 0° jusqu'à 40°. Le degré de concordance, pour les angles de diffraction 2θ, entre l'échantillon et le matériau de référence est d'au maximum 0,2° pour la même forme cristalline, tandis qu'il peut exister d'importantes variations entre échantillon et matériau de référence quant aux intensités relatives, en raison des effets d'orientation préférentielle. De par leur nature, il est reconnu que les hydrates et les solvates variables peuvent présenter des dimensions de maille élémentaire différentes occasionnant une dérive dans la position des pics des diffractogrammes enregistrés pour ces substances. Pour ces substances particulières, il n'est pas exclu de rencontrer des variations supérieures à 0,2° pour les positions 2θ. Par conséquent, il est impossible de leur appliquer la limite de 0,2°. Pour d'autres types d'échantillons (par exemple les sels inorganiques), il peut être nécessaire d'étendre bien au-delà de 40° la région 2θ balayée. Il suffit généralement de couvrir les 10 principales réflexions identifiées dans la base de données de diffraction X sur poudre monophase.

Il est parfois difficile, voire impossible, d'identifier les phases en présence dans les cas suivants :

– substances non cristallisées ou amorphes,
– faible proportion en masse des composants à identifier par rapport aux quantités d'analytes (généralement moins de 10 pour cent *m/m*),
– effets prononcés d'orientation préférentielle,
– absence de la phase à identifier dans la base de données utilisée,
– formation de solutions solides,
– présence de désordres structurels affectant la maille élémentaire,
– existence d'un trop grand nombre de phases dans l'échantillon,
– présence de déformations du réseau cristallin,
– similarité structurelle de phases différentes.

ANALYSE QUANTITATIVE DES PHASES

Si l'échantillon étudié est un mélange d'au moins 2 phases connues, dont une au maximum est amorphe, il est souvent possible de déterminer le pourcentage (en volume ou en masse) de chaque phase cristalline et de la phase amorphe. L'analyse quantitative des phases peut reposer sur l'intégration des intensités, sur les hauteurs de pics de plusieurs raies de diffraction[(13)] ou sur l'ensemble du diffractogramme. Ces intensités intégrées, hauteurs de pics ou diffractogrammes sont comparés aux valeurs correspondantes de matériaux de référence. Ceux-ci peuvent être des substances monophases ou des mélanges de phases connues. Les difficultés rencontrées en analyse quantitative sont liées à la préparation de l'échantillon (l'exactitude et la fidélité des résultats exigent notamment l'homogénéité de toutes les phases et une distribution granulométrique appropriée au sein de chaque phase) et aux effets de matrice. Dans les meilleures conditions, il est possible de déterminer dans des matrices solides des quantités de phases cristallines n'excédant pas 10 pour cent.

*ÉCHANTILLONS POLYMORPHES*

Dans le cas d'un échantillon composé de 2 phases polymorphes $a$ et $b$, l'expression suivante peut être utilisée pour quantifier la fraction $F_a$ de la phase $a$ :

$$F_a = \frac{1}{1 + K\,(I_b/I_a)}$$

La fraction est obtenue en mesurant le rapport des intensités des 2 phases, la valeur de la constante $K$ étant connue. $K$ est le rapport $I_{oa}/I_{ob}$ des intensités absolues des 2 phases polymorphes pures. Sa valeur peut être déterminée par des mesures effectuées sur des échantillons de référence.

*MÉTHODES UTILISANT UN ÉTALON*

Les méthodes les plus couramment utilisées pour l'analyse quantitative sont :

– la méthode dite « de l'étalon externe »,
– la méthode dite « de l'étalon interne »,
– la méthode dite « des ajouts dosés ».

La méthode « de l'étalon externe » est la plus générale ; elle consiste à comparer le diffractogramme X du mélange, ou l'intensité des raies correspondantes, avec le diffractogramme ou les raies mesurées pour un mélange de référence, ou encore avec les intensités théoriques d'un modèle structurel totalement connu.

Pour limiter les erreurs dues aux effets de matrice, on peut utiliser un matériau de référence qui présente une taille de cristallites et un coefficient d'absorption des rayons X comparables à ceux des composants de l'échantillon, et dont le spectre de diffraction n'interfère en aucun point avec celui de la substance à analyser. Une quantité connue de ce matériau de référence est ajoutée à l'échantillon à examiner et à chaque préparation témoin. Dans ces conditions, il existe une relation linéaire entre l'intensité des raies et la concentration. Cette méthode « de l'étalon interne » exige une mesure fidèle des intensités diffractées.

Dans la méthode « des ajouts dosés », une quantité donnée de phase $a$ pure est ajoutée au mélange contenant $a$ à une concentration inconnue. Des ajouts multiples sont ainsi effectués pour établir une courbe de l'intensité en fonction de la concentration ; le point d'intersection (négatif) de cette courbe avec l'axe des $x$ représente la concentration de la phase $a$ dans l'échantillon d'origine.

(13) Si la structure cristalline de tous les composants est connue, leur quantification, avec une exactitude satisfaisante, est possible par la méthode de Rietveld. Si la structure cristalline des composants n'est pas connue, la méthode de Pawley ou la méthode des moindres carrés peuvent être utilisées.

ESTIMATION DES FRACTIONS AMORPHES ET CRISTALLINES

Dans un mélange de phases cristallines et amorphes, il existe plusieurs moyens d'estimer les fractions de chacune des phases. Le choix de la méthode dépend de la nature de l'échantillon :

– si l'échantillon se compose de fractions cristallines et d'une fraction amorphe de compositions chimiques différentes, la quantité de chacune des phases cristallines en présence peut être estimée au moyen de substances de référence appropriées, comme décrit précédemment ; la fraction amorphe est alors déduite par soustraction ;
– si l'échantillon se compose d'une fraction cristalline et d'une fraction amorphe, en mélange monophase ou biphase, de même composition élémentaire, la quantité de phase cristalline (ou « degré de cristallinité ») peut être estimée à partir de 3 surfaces mesurées sur le diffractogramme :

$A$ = surface totale des pics résultant de la diffraction due à la fraction cristalline de l'échantillon,

$B$ = surface totale sous la surface $A$,

$C$ = surface correspondant au fond (dû à la diffraction diffuse par l'air, à une émission de fluorescence, à l'équipement, etc).

Une fois la mesure de ces surfaces obtenue, une approximation du degré de cristallinité est donnée par la formule suivante :

$$\% \text{ cristallinité} = 100A/(A + B - C)$$

Il est à noter que cette méthode ne fournit pas des valeurs absolues du degré de cristallinité, et n'est donc généralement utilisée qu'à des fins comparatives.

Il existe par ailleurs des méthodes plus sophistiquées telles que la méthode de Ruland.

STRUCTURE DES MONOCRISTAUX

En règle générale, la détermination des structures cristallines s'effectue à partir des données de diffraction X obtenues sur des monocristaux. Toutefois, l'analyse structurelle de cristaux organiques est une entreprise ardue, car les paramètres de maille sont relativement larges, la symétrie faible et les propriétés de diffraction généralement très limitées.

Pour toute forme cristalline donnée d'une substance, la connaissance de la structure cristalline permet de calculer le diffractogramme X correspondant et d'établir ainsi un diffractogramme de référence « libre d'orientation préférentielle » qui peut alors être utilisé pour l'identification des phases.

**07/2010:20934**

# 2.9.34. MASSE VOLUMIQUE VRAC ET MASSE VOLUMIQUE APRÈS TASSEMENT

## Masse volumique vrac

La masse volumique (improprement appelée densité) vrac d'une poudre est le rapport de la masse d'un échantillon de cette poudre non tassée au volume qu'il occupe en comprenant la contribution des espaces interparticulaires. Par conséquent, la masse volumique vrac dépend à la fois de la masse volumique des particules de poudre et de l'arrangement spatial des particules dans le lit de poudre. Elle est exprimée en grammes par millilitre bien que l'Unité Internationale soit le kilogramme par mètre cube (1 g/mL = 1000 kg/m$^3$), puisque les mesures sont effectuées au moyen d'éprouvettes. Elle peut également être exprimée en grammes par centimètre cube.

Les propriétés de réarrangement d'une poudre dépendent de la préparation, du traitement et des conditions de conservation de l'échantillon, c'est-à-dire de la façon dont il a été manipulé.

La masse volumique vrac peut prendre des valeurs variables selon l'arrangement des particules, et peut même changer sous l'effet de la plus légère perturbation du lit de poudre. Par conséquent, il est souvent très difficile de mesurer avec une bonne reproductibilité la masse volumique vrac d'une poudre. Il est donc essentiel de préciser comment a été effectuée la détermination lors de l'expression des résultats.

La masse volumique vrac d'une poudre est déterminée soit par mesure du volume occupé par une masse connue de poudre versée dans une éprouvette graduée après tamisage éventuel (méthode 1), soit par mesure de la masse d'un volume connu de poudre versée dans un volumètre (méthode 2) ou dans un vase à peser (méthode 3).

*Les méthodes 1 et 3 sont à privilégier.*

MÉTHODE 1 : ÉPROUVETTE GRADUÉE

*Mode opératoire.* Prélevez une quantité de poudre suffisante pour effectuer l'essai et passez-la si nécessaire sur un tamis à ouverture de maille au moins égale à 1,0 mm pour désagréger les agglomérats pouvant s'être formés au repos ; cette opération doit être effectuée avec précaution afin de ne pas modifier la nature de la substance. Dans une éprouvette graduée sèche de 250 mL, permettant la lecture à 2 mL près, introduisez, avec précaution et sans tasser, une masse $m$ d'environ 100 g de cet échantillon, pesée à 0,1 pour cent près. Si nécessaire, nivelez la poudre avec précaution, sans la tasser, puis lisez le volume apparent non tassé $V_0$ à la plus proche graduation. Calculez la masse volumique vrac $m/V_0$ exprimée en grammes par millilitre. En règle générale, il est souhaitable de procéder à plusieurs répétitions pour déterminer la masse volumique vrac.

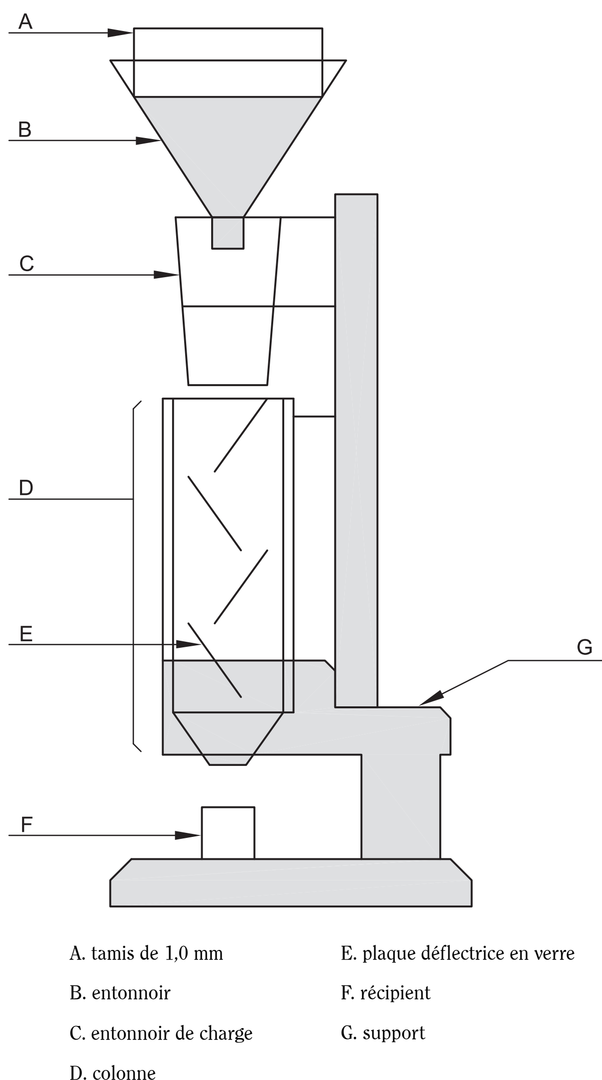
Si la masse volumique de la poudre est trop faible ou trop élevée, de telle sorte que l'échantillon a un volume apparent non tassé supérieur à 250 mL ou inférieur à 150 mL, il n'est pas possible d'utiliser un échantillon de 100 g. Par conséquent, un échantillon de masse différente doit être prélevé de telle sorte que son volume apparent non tassé soit compris entre 150 mL et 250 mL (volume apparent supérieur ou égal à 60 pour cent du volume total de l'éprouvette). La masse de l'échantillon est alors spécifiée dans l'expression des résultats.

Pour les prises d'essai de volume apparent compris entre 50 mL et 100 mL, une éprouvette de 100 mL permettant la lecture à 1 mL près peut être utilisée ; le volume de l'éprouvette est alors spécifié dans l'expression des résultats.

MÉTHODE 2 : VOLUMÈTRE

*Appareillage.* L'appareil de mesure (voir figure 2.9.34.-1) se compose d'un entonnoir, surmonté d'un tamis de 1,0 mm, placé au-dessus d'une colonne contenant 4 plaques déflectrices en verre sur lesquelles la poudre glisse et rebondit lors de sa chute. Dans sa partie inférieure, la colonne se prolonge par un autre entonnoir qui collecte la poudre et la déverse dans un petit récipient placé immédiatement au-dessous. Ce récipient peut être de forme cylindrique (volume 25,00 ± 0,05 mL, diamètre intérieur 30,00 ± 2,00 mm) ou cubique (volume 16,39 ± 0,20 mL, arête intérieure 25,4 ± 0,076 mm).

*Mode opératoire.* Introduisez dans l'appareil un excès de poudre et laissez-la s'écouler jusqu'à débordement du récipient collecteur ; utilisez au minimum 25 cm$^3$ de poudre pour le récipient cubique et 35 cm$^3$ pour le récipient cylindrique. Avec précaution, arasez l'excès de poudre en lissant sans à-coups la surface avec le tranchant de la lame d'une spatule tenue perpendiculairement à la surface ; il est important de bien garder la spatule perpendiculaire à la surface pour éviter de tasser la poudre ou d'en prélever. Eliminez les résidus éventuellement présents sur la surface extérieure du récipient et déterminez la masse $M$ de la poudre à 0,1 pour cent près. Calculez la masse volumique vrac $M/V_0$ exprimée en grammes par millilitre, $V_0$ étant le volume du récipient. Notez comme résultat la moyenne de 3 déterminations effectuées sur 3 échantillons différents de poudre.




A. tamis de 1,0 mm
B. entonnoir
C. entonnoir de charge
D. colonne
E. plaque déflectrice en verre
F. récipient
G. support

Figure 2.9.34.-1. – *Volumètre*

MÉTHODE 3 : VASE À PESER

*Appareillage.* L'appareil se compose d'un vase à peser cylindrique de 100 mL, en acier inoxydable, conforme aux spécifications dimensionnelles de la figure 2.9.34.-2.

*Mode opératoire.* Prélevez une quantité de poudre suffisante pour effectuer l'essai, et passez-la si nécessaire sur un tamis de 1,0 mm pour désagréger les agglomérats pouvant s'être formés au repos. Laissez l'échantillon ainsi obtenu s'écouler librement dans le vase à peser, jusqu'à débordement. Arasez avec précaution l'excès de poudre en procédant comme décrit dans la méthode 2. Pesez et calculez la masse $M_0$ de la poudre, à 0,1 pour cent près, en soustrayant la masse à vide, préalablement déterminée, du vase. Calculez la masse volumique vrac $M_0/100$ exprimée en grammes par millilitre. Notez comme résultat la moyenne de 3 déterminations effectuées sur 3 échantillons de poudre différents.

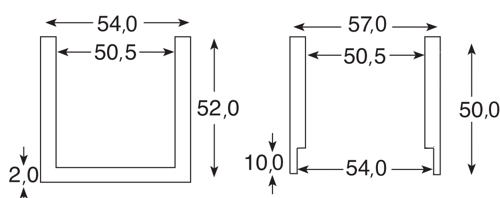



Figure 2.9.34.-2. – *Vase à peser (gauche) et extension (droite) Dimensions en millimètres*

## Masse volumique après tassement

La masse volumique après tassement est la valeur de masse volumique vrac accrue lorsque l'on provoque, par voie mécanique, le tassement de l'échantillon de poudre contenu dans un récipient.

On obtient la masse volumique après tassement en provoquant, par voie mécanique, le tassement d'un échantillon de poudre placé dans une éprouvette graduée ou un vase à peser. Après relevé du volume initial ou de la masse initiale de la poudre, le récipient est soumis à des chocs mécaniques et des lectures de volume ou de masse sont effectuées jusqu'à obtention de résultats sensiblement constants. Les chocs mécaniques sont produits en élevant le récipient puis en le laissant retomber d'une hauteur spécifiée, sous l'effet de son propre poids, suivant l'une des 3 méthodes décrites ci-après. L'emploi de dispositifs assurant la rotation du récipient au cours de la chute peut être souhaitable pour réduire les risques de division de la masse de poudre.

MÉTHODE 1

*Appareillage.* L'appareil (voir figure 2.9.34.-3) comporte :

– une éprouvette graduée de 250 mL (permettant la lecture à 2 mL près) ayant une masse de 220 ± 44 g,
– un appareil de tassement capable de produire, par minute, soit nominalement 250 ± 15 chutes d'une hauteur de 3 ± 0,2 mm, soit nominalement 300 ± 15 chutes d'une hauteur de 14 ± 2 mm. La masse du support de l'éprouvette, avec son dispositif de fixation, est de 450 ± 10 g.

*Mode opératoire.* Procédez comme décrit ci-dessus pour la détermination du volume apparent $V_0$. Fixez l'éprouvette sur son support. Effectuez, sur le même échantillon, 10 chutes, 500 chutes, puis 1250 chutes, et lisez à la plus proche graduation les volumes correspondants $V_{10}$, $V_{500}$ et $V_{1250}$. Si la différence entre $V_{500}$ et $V_{1250}$ est inférieure à 2 mL, $V_{1250}$ est le volume après tassement (ou volume tassé). Si la différence entre $V_{500}$ et $V_{1250}$ est supérieure à 2 mL, répétez le tassement par incréments de, par exemple, 1250 chutes jusqu'à obtention d'une différence inférieure à 2 mL entre 2 mesures successives. Un nombre moins élevé de chutes peut convenir pour certaines poudres, sous réserve de validation. Calculez la masse volumique après tassement $m/V_f$ exprimée en grammes par millilitre, $V_f$ étant le volume final après tassement. En règle générale, il est souhaitable de procéder à plusieurs répétitions pour déterminer la masse volumique après tassement. Spécifiez la hauteur de chute avec les résultats.

S'il n'est pas possible d'utiliser un échantillon de 100 g, réduisez la prise d'essai et utilisez une éprouvette appropriée de 100 mL, permettant la lecture à 1 mL près, pesant 130 ± 16 g et montée sur un support pesant 240 ± 12 g. Spécifiez les conditions d'essai modifiées avec les résultats.

MÉTHODE 2

*Mode opératoire.* Procédez comme indiqué pour la méthode 1, mais avec la variante de l'appareil permettant de produire, par minute, 250 chutes d'une hauteur constante de 3 ± 0,2 mm.

MÉTHODE 3

*Mode opératoire.* Procédez comme décrit dans la méthode 3 pour la détermination de la masse volumique vrac, mais en utilisant le vase à peser surmonté de l'extension représentée en figure 2.9.34.-2. Le vase muni de son extension est ensuite soumis à 50-60 chutes par minute au moyen d'un appareil approprié à la mesure de la masse volumique après tassement. Effectuez 200 chutes, puis enlevez l'extension et arasez avec précaution l'excès de poudre comme décrit dans la méthode 3 de mesure de la masse volumique vrac. Répétez ensuite l'ensemble de la procédure en effectuant 400 chutes. Si la différence entre les 2 masses obtenues après 200 et 400 chutes est supérieure à 2 pour cent, répétez la procédure en effectuant 200 chutes supplémentaires jusqu'à obtention d'une différence inférieure à 2 pour cent entre 2 pesées successives. Calculez la masse

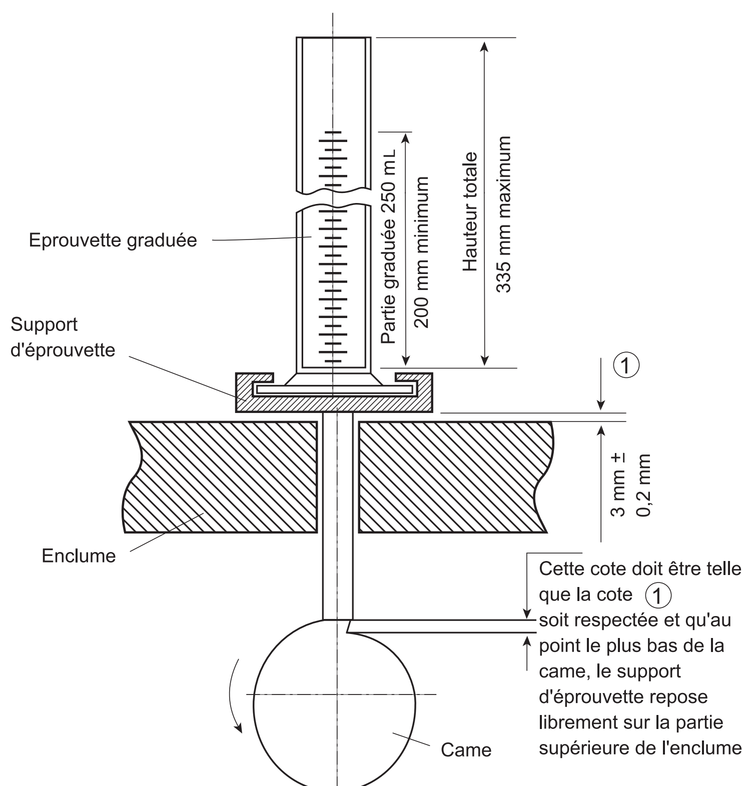



Figure 2.9.34.-3. – *Dispositif de tassement d'un échantillon de poudre*
*Dimensions en millimètres*

volumique après tassement $M_f/100$ exprimée en grammes par millilitre, $M_f$ étant la masse de poudre contenue dans le vase à peser. Notez comme résultat la moyenne de 3 déterminations effectuées sur 3 échantillons de poudre différents. Spécifiez les conditions d'essai avec les résultats, y compris la hauteur de chute.

## Indice de compressibilité

Les interactions interparticulaires qui affectent les propriétés de foisonnement d'une poudre conditionnent également ses propriétés d'écoulement, et on peut, en comparant les valeurs de la masse volumique avant et après tassement, évaluer l'importance relative de ces interactions dans une poudre donnée. Cette comparaison est souvent utilisée pour déterminer l'aptitude à l'écoulement (« coulabilité ») d'une poudre par le biais d'indicateurs tels que l'indice de compressibilité ou l'indice de Hausner défini ci-après.

L'indice de compressibilité et l'indice de Hausner mesurent tous deux l'aptitude d'une poudre à réduire de volume sous l'effet d'un tassement mécanique tel que décrit ci-dessus. De ce fait, ils constituent un outil de mesure de l'aptitude au tassement de la poudre et des indicateurs de l'importance relative des interactions interparticulaires. Dans une poudre fluide, ces interactions sont moins significatives et les masses volumiques avant et après tassement seront plus proches. Dans une poudre s'écoulant plus difficilement, les interactions interparticulaires sont souvent plus importantes et la différence entre les masses volumiques avant et après tassement sera plus marquée. L'indice de compressibilité et l'indice de Hausner reflètent tous deux ces différences.

Indice de compressibilité :

$$\frac{100\,(V_0 - V_f)}{V_0}$$

$V_0$ = volume apparent avant tassement,

$V_f$ = volume final après tassement.

Indice de Hausner :

$$\frac{V_0}{V_f}$$

Selon la substance, l'indice de compressibilité peut être déterminé en utilisant $V_{10}$ au lieu de $V_0$. Si $V_{10}$ est utilisé, spécifiez-le clairement avec les résultats.

**07/2008:20935**

# 2.9.35. FINESSE DES POUDRES

La distribution de taille des particules est estimée par tamisage analytique (*2.9.38*) ou, le cas échéant, par d'autres méthodes appropriées. Le présent chapitre établit une classification descriptive simple de la finesse des poudres. Pour des raisons pratiques, la finesse des poudres est souvent mesurée par tamisage. Cette méthode est surtout appropriée lorsque la majorité des particules sont de taille supérieure à environ 75 µm, bien qu'elle puisse également être utilisée, sous réserve de validation, pour certaines poudres constituées de particules plus petites. La diffraction de la lumière est également une technique fréquemment employée pour mesurer la taille des particules sur une gamme étendue.

Lorsque la distribution cumulée a été établie, soit par tamisage analytique soit par une autre méthode, la taille des particules peut être évaluée comme suit :

$x_{90}$ = taille particulaire correspondant à 90 pour cent de la distribution en passants cumulés,

$x_{50}$ = taille particulaire médiane (50 pour cent des particules sont de taille inférieure et 50 pour cent des particules sont de taille supérieure à cette valeur),

$x_{10}$ = taille particulaire correspondant à 10 pour cent de la distribution en passants cumulés.

Le symbole *d* est souvent utilisé également pour désigner ces valeurs. L'emploi des symboles $d_{90}$, $d_{50}$, $d_{10}$ est donc admis.

Les paramètres suivants peuvent être définis sur la base de la distribution cumulée.

$Q_r(x)$ = distribution cumulée des particules de dimension inférieure ou égale à $x$, l'indice $r$ représentant la grandeur à laquelle se réfère la distribution de densité.

| *r* | **Type de distribution** |
|---|---|
| 0 | Nombre |
| 1 | Longueur |
| 2 | Surface |
| 3 | Volume |

On a donc, par définition :

$Q_r(x) = 0{,}90$ si $x = x_{90}$

$Q_r(x) = 0{,}50$ si $x = x_{50}$

$Q_r(x) = 0{,}10$ si $x = x_{10}$

Une autre méthode possible, mais moins informative, d'expression de la finesse des poudres consiste à utiliser les termes descriptifs du tableau 2.9.35.-1.

Tableau 2.9.35.-1.

| **Classification des poudres selon leur finesse** | | |
|---|---|---|
| **Terme descriptif** | **$x_{50}$ (µm)** | **Distribution cumulative en volume $Q_3(x)$** |
| Grossière | > 355 | $Q_3(355) < 0{,}50$ |
| Modérément fine | 180 - 355 | $Q_3(180) < 0{,}50$ et $Q_3(355) \geq 0{,}50$ |
| Fine | 125 - 180 | $Q_3(125) < 0{,}50$ et $Q_3(180) \geq 0{,}50$ |
| Très fine | ≤ 125 | $Q_3(125) \geq 0{,}50$ |

**01/2010:20936**

# 2.9.36. APTITUDE À L'ÉCOULEMENT DES POUDRES(14)

L'utilisation très répandue des poudres dans l'industrie pharmaceutique a conduit au développement d'une grande diversité de méthodes visant à caractériser leur aptitude à l'écoulement. Il n'est donc pas étonnant qu'apparaissent dans la littérature pharmaceutique de multiples références à diverses mesures de l'aptitude à l'écoulement des poudres, associées à des tentatives de corrélation avec les propriétés affectant la fabrication. Cette diversité méthodologique est le résultat inévitable de la complexité du comportement des poudres qui fait intervenir de multiples variables rendant compliqué le travail de caractérisation de l'aptitude à l'écoulement.

L'objectif de ce chapitre est de passer en revue les méthodes de caractérisation les plus récurrentes dans la littérature pharmaceutique. En outre, malgré l'impossibilité manifeste d'identifier une méthode unique et simple permettant une caractérisation adéquate des propriétés d'écoulement des poudres pharmaceutiques, ce chapitre propose la standardisation de diverses méthodes pouvant s'avérer utiles dans le cadre du développement pharmaceutique.

4 méthodes sont fréquemment citées pour les essais d'écoulement des poudres :

- l'angle de repos,
- l'indice de compressibilité ou l'indice de Hausner,
- le débit d'écoulement à travers un orifice,
- la cellule de cisaillement.

Chacune de ces méthodes de base se prête par ailleurs à de nombreuses variantes. Cette multiplicité des méthodes et des variantes rend d'autant plus souhaitable une standardisation méthodologique lorsqu'elle est possible.

C'est dans cette perspective que ce chapitre discute des méthodes les plus usuelles, identifie leurs principaux aspects expérimentaux et présente des recommandations en matière de standardisation. En règle générale, une méthode de mesure de l'aptitude à l'écoulement des poudres se doit d'être pratique, utile, reproductible, sensible et de fournir des résultats pertinents. Il convient de répéter qu'aucune méthode de mesure simple ne permet de caractériser convenablement ou complètement les multiples propriétés liées à l'écoulement qui intéressent l'industrie pharmaceutique. Une stratégie appropriée peut être d'utiliser un ensemble de méthodes standardisées pour caractériser les différents aspects des propriétés d'écoulement des poudres, selon les besoins de l'application pharmaceutique visée.

ANGLE DE REPOS

L'angle de repos est utilisé dans différents domaines scientifiques pour caractériser les propriétés d'écoulement des solides. Il exprime les frictions interparticulaires ou la résistance au mouvement liée à l'interaction des particules. Les mesures de l'angle de repos sont très dépendantes de la méthode utilisée et posent des difficultés expérimentales liées à la ségrégation du matériel et à la consolidation ou à l'aération de la poudre lors de la formation du cône. Toutefois, en dépit de ces difficultés, cette méthode continue d'être utilisée dans l'industrie pharmaceutique et la littérature contient de nombreux exemples attestant de sa valeur en tant que moyen de prédiction de problèmes de fabrication.

L'angle de repos est l'angle solide constant que forme, par rapport à une base horizontale, un tas de poudre de forme conique que l'on peut obtenir par diverses méthodes, brièvement décrites ci-après.

**Méthodes fondamentales de détermination**

Diverses méthodes de mesure de l'angle de repos sont décrites dans la littérature. Les plus couramment utilisées, pour déterminer l'angle de repos statique, peuvent être classées par rapport à 2 variables expérimentales essentielles :

- la hauteur, par rapport à la base, de « l'entonnoir » à travers lequel s'écoule la poudre peut être fixe et définie, ou peut varier au fur et à mesure de la formation du tas,
- la base sur laquelle se forme le tas peut avoir un diamètre fixe, ou autoriser la variation du diamètre du cône de poudre au fur et à mesure de sa formation.

**Variantes méthodologiques**

Ces méthodes comportent en outre des variantes mentionnées à des degrés divers dans la littérature pharmaceutique :

- *angle de repos en déversement* : on le détermine en laissant « se déverser » d'un récipient un excès de matériel placé au-dessus d'une base de diamètre fixe ; la formation d'un cône de poudre sur cette base permet de déterminer l'angle de repos en déversement ;
- *angle de repos dynamique* : un récipient cylindrique (comportant à une extrémité un couvercle plat transparent) est rempli de poudre puis mis en rotation à une vitesse définie ; l'angle de repos dynamique est l'angle que forme l'avalanche de poudre avec l'horizontale. L'angle interne de friction cinétique est défini par le plan séparant les particules qui glissent sur la couche supérieure du tas de poudre des particules qui accompagnent la rotation du récipient (avec rugosité de surface).

**Echelle générale d'aptitude à l'écoulement basée sur l'angle de repos**

Malgré l'existence d'une certaine variabilité dans la description qualitative de l'écoulement des poudres selon l'angle de repos,

(14) Ce chapitre a fait l'objet du processus d'harmonisation des pharmacopées. Voir chapitre *5.8. Harmonisation des pharmacopées.*

la littérature pharmaceutique s'accorde largement avec la classification de Carr [(15)], présentée dans le tableau 2.9.36.-1. Elle mentionne des exemples de formulations qui, avec un angle de repos de l'ordre de 40-50 degrés, présentent un comportement en fabrication satisfaisant. Au-delà d'un angle de repos de 50 degrés, l'écoulement est rarement acceptable pour les besoins de la fabrication.

Tableau 2.9.36.-1. – *Echelle d'aptitude à l'écoulement basée sur l'angle de repos*[(15)]

| Aptitude à l'écoulement | Angle de repos (degrés) |
|---|---|
| Excellente | 25-30 |
| Bonne | 31-35 |
| Assez bonne (facilitation non nécessaire) | 36-40 |
| Passable (risque de blocage) | 41-45 |
| Médiocre (facilitation nécessaire par agitation ou vibration) | 46-55 |
| Très médiocre | 56-65 |
| Extrêmement médiocre | > 66 |

**Aspects expérimentaux**

L'angle de repos n'est pas une propriété intrinsèque de la poudre. Il est donc étroitement dépendant de la méthode utilisée pour former le cône. Sur ce point, plusieurs aspects importants ressortent de la littérature :

– le sommet du cône de poudre peut présenter des distorsions dues à l'impact de la chute de poudre ; il est possible de réduire ces distorsions d'impact en procédant à la construction du cône avec précaution ;

– la nature de la base sur laquelle se forme le cône affecte l'angle de repos. Il est recommandé de former le cône de poudre sur une « base commune », qui peut par exemple être constituée d'une couche de poudre. On peut utiliser à cet effet une base de diamètre fixe comportant un bord externe saillant qui permet de retenir une couche de poudre sur laquelle se formera le cône.

**Mode opératoire recommandé**

Mesurez l'angle de repos sur une base fixe qui comporte un rebord permettant la rétention d'une couche de poudre. La base doit être exempte de vibrations. Faites varier la hauteur de l'entonnoir pour former avec précaution un cône de poudre symétrique, en veillant à éviter toute vibration lors du déplacement de l'entonnoir. Pour limiter l'impact de la chute de poudre sur la pointe du cône, l'entonnoir doit être maintenu à une distance d'environ 2-4 cm du sommet du tas en formation. S'il s'avère impossible d'obtenir ou de reproduire ainsi un cône de poudre symétrique, la méthode n'est pas appropriée. Mesurez la hauteur du cône de poudre et calculez l'angle de repos $\alpha$ à l'aide de l'expression suivante :

$$\tan(\alpha) = \frac{\text{hauteur}}{0,5 \times \text{base}}$$

## INDICE DE COMPRESSIBILITÉ ET INDICE DE HAUSNER

Au cours des dernières années, la détermination de l'indice de compressibilité ou de son homologue l'indice de Hausner est devenue une méthode simple et rapide très populaire pour la prédiction des propriétés d'écoulement des poudres. L'indice de compressibilité a été proposé comme outil de mesure indirecte d'un ensemble de propriétés : densité vrac (non tassée), taille et morphologie, surface spécifique, humidité, cohésivité. Toutes ces propriétés exercent en effet une influence sur la valeur observée de l'indice de compressibilité. Celui-ci, de même que l'indice de Hausner, est déterminé par mesure successive du volume vrac puis du volume tassé de la poudre.

**Méthodes fondamentales de détermination**

Même s'il en existe des variantes, la méthode de base utilisée pour déterminer l'indice de compressibilité et l'indice de Hausner consiste à mesurer le volume apparent non tassé $V_0$ puis le volume final $V_f$ obtenu en provoquant le tassement de la poudre jusqu'à obtention d'un volume constant. L'indice de compressibilité et l'indice de Hausner sont définis par les expressions suivantes :

$$Indice\ de\ compressibilit\acute{e} = 100 \times \frac{V_0 - V_f}{V_0}$$

$$Indice\ de\ Hausner = \frac{V_0}{V_f}$$

Le calcul de l'indice de compressibilité et de l'indice de Hausner peut également être effectué à partir des valeurs mesurées de la masse volumique vrac ($\rho_{vrac}$) et de la masse volumique après tassement ($\rho_{tass\acute{e}e}$) :

$$Indice\ de\ compressibilit\acute{e} = 100 \times \frac{\rho_{tass\acute{e}e} - \rho_{vrac}}{\rho_{tass\acute{e}e}}$$

$$Indice\ de\ Hausner = \frac{\rho_{tass\acute{e}e}}{\rho_{vrac}}$$

Dans une variante de ces méthodes, la mesure du changement de volume résultant du tassement est parfois remplacée ou complétée par celle du taux de consolidation. L'échelle d'aptitude à l'écoulement généralement acceptée pour l'indice de compressibilité et l'indice de Hausner est présentée dans le tableau 2.9.36.-2.

Tableau 2.9.36.-2. – *Echelle d'aptitude à l'écoulement*[(15)]

| Indice de compressibilité (pour cent) | Aptitude à l'écoulement | Indice de Hausner |
|---|---|---|
| 1-10 | Excellente | 1,00-1,11 |
| 11-15 | Bonne | 1,12-1,18 |
| 16-20 | Assez bonne | 1,19-1,25 |
| 21-25 | Passable | 1.,26-1,34 |
| 26-31 | Médiocre | 1,35-1,45 |
| 32-37 | Très médiocre | 1,46-1,59 |
| > 38 | Extrêmement médiocre | > 1,60 |

**Aspects expérimentaux**

L'indice de compressibilité et l'indice de Hausner ne sont pas des propriétés intrinsèques de la poudre. Leur valeur dépend donc de la méthodologie utilisée. La littérature existante fait état de plusieurs paramètres importants susceptibles d'affecter la détermination du volume apparent non tassé $V_0$, du volume tassé final $V_f$, de la masse volumique vrac $\rho_{vrac}$ et de la masse volumique après tassement $\rho_{tass\acute{e}e}$ :

– le diamètre de l'éprouvette où le tassement est opéré,

– le nombre de chocs appliqués à la poudre pour atteindre la masse volumique après tassement,

– la masse de la prise d'essai,

– la mise en rotation ou non de l'échantillon lors du tassement.

**Mode opératoire recommandé**

Opérez avec une éprouvette graduée de 250 mL et un échantillon de poudre de 100 g. Des masses et volumes inférieurs peuvent être utilisés mais il faut alors décrire dans les résultats les variations méthodologiques introduites. Il est recommandé d'utiliser la moyenne de 3 déterminations.

## ÉCOULEMENT À TRAVERS UN ORIFICE

Le débit d'écoulement d'un matériau dépend de nombreux facteurs dont certains sont liés aux particules et d'autres au procédé utilisé. Le suivi du débit d'écoulement à travers un orifice a été proposé comme outil de mesure de l'aptitude à

(15) Carr RL. Evaluating flow properties of solids. *Chem. Eng* 1965 ; 72:163-168.

l'écoulement des poudres. Il peut être très utile d'effectuer ce suivi en continu car des écoulements pulsatiles sont observés même dans le cas de matériaux fluides. Des variations du débit lorsque le récipient se vide peuvent également être observées. Des équations empiriques ont été établies pour exprimer la relation entre débit d'écoulement et diamètre de l'orifice ainsi que taille et densité des particules. Toutefois, la détermination du débit d'écoulement à travers un orifice n'est pertinente que pour les matériaux fluides.

Le débit d'écoulement à travers un orifice est généralement mesuré en terme de masse écoulée par unité de temps à partir d'un certain type de récipient (bouteille cylindrique, entonnoir, trémie). La mesure peut être effectuée par incréments discrets ou en continu.

**Méthodes fondamentales de détermination**

Diverses méthodes de mesure du débit d'écoulement à travers un orifice sont décrites dans la littérature. Les plus couramment utilisées peuvent être classées par rapport à 3 variables expérimentales essentielles :

- le type de récipient utilisé comme contenant : les plus courants sont des bouteilles cylindriques et des entonnoirs ou des trémies issues des équipements de production ;
- le diamètre et la forme de l'orifice sont des facteurs critiques déterminant le débit d'écoulement ;
- la méthode de mesure utilisée : le débit d'écoulement de la poudre peut être mesuré en continu au moyen d'une balance électronique comportant un système d'enregistrement (enregistreur déroulant, ordinateur). Il peut aussi être mesuré par quantités discrètes (par exemple le temps mis par 100 g de poudre pour passer à travers l'orifice, au dixième de seconde près, ou la quantité de poudre qui passe à travers l'orifice en 10 s, au dixième de gramme près).

**Variantes méthodologiques**

On peut déterminer soit le débit-masse soit le débit-volume. La mesure du débit-masse est plus simple mais introduit dans les résultats un biais en faveur des matériaux de haute densité. Le remplissage des matrices étant volumétrique, il peut être préférable de déterminer le débit-volume. Un vibrateur est parfois utilisé pour faciliter l'écoulement hors du récipient mais cette pratique paraît compliquer l'interprétation des résultats. L'emploi d'un orifice mobile a été proposé pour mieux simuler les conditions de fabrication à l'aide d'une presse rotative. Le diamètre minimal de l'orifice d'écoulement peut également être identifié.

**Echelle générale de coulabilité basée sur le débit d'écoulement à travers un orifice**

Il n'existe pas d'échelle générale basée sur le débit d'écoulement à travers un orifice car celui-ci est extrêmement dépendant de la méthode de mesure utilisée. La comparaison des résultats publiés est difficile.

**Aspects expérimentaux**

Le débit d'écoulement à travers un orifice n'est pas une propriété intrinsèque de la poudre. Il est très étroitement dépendant de la méthodologie utilisée. La littérature existante fait état de plusieurs paramètres importants susceptibles d'affecter les mesures :

- le diamètre et la forme de l'orifice,
- la nature du matériau constituant le récipient (métal, verre, plastique),
- le diamètre et la hauteur du lit de poudre.

**Mode opératoire recommandé**

La mesure du débit d'écoulement à travers un orifice ne peut être utilisée que pour les produits possédant une certaine aptitude à l'écoulement. Elle est sans utilité pour les matériaux dits cohésifs. A condition que la hauteur du lit de poudre soit très supérieure au diamètre de l'orifice, le débit est virtuellement indépendant de cette hauteur. Il est préférable d'utiliser un récipient cylindrique car les parois du récipient ne doivent avoir que peu d'effet sur l'écoulement. Dans cette configuration, le débit est déterminé par le mouvement de type poudre-sur-poudre, plutôt que poudre-sur-paroi. Le débit d'écoulement augmente souvent lorsque la hauteur de la colonne de poudre représente moins de 2 fois son diamètre. L'orifice doit être circulaire et le récipient exempt de vibrations. Les principes généraux à respecter quant aux dimensions du cylindre sont les suivants :

- diamètre de l'ouverture supérieur à 6 fois le diamètre des particules,
- diamètre du cylindre supérieur à 2 fois le diamètre de l'ouverture.

L'emploi d'une trémie comme récipient peut également convenir car il est représentatif de l'écoulement dans les conditions de production. Il est déconseillé d'utiliser un entonnoir, notamment à tige, car le débit d'écoulement sera alors conditionné par le diamètre et la longueur de la tige ainsi que par les frictions tige-poudre. Un cône tronqué peut convenir mais le débit sera influencé par le coefficient de frottement poudre-sur-paroi. Le choix d'un matériau constitutif approprié est alors très important.

Pour l'orifice du cylindre, utilisez une surface de base plane, avec en option la possibilité de faire varier le diamètre de l'orifice pour autoriser le maximum de souplesse et assurer au mieux un mode d'écoulement poudre-sur-poudre. La mesure du débit peut être discrète ou continue. La mesure en continu au moyen d'une balance électronique permet une meilleure détection des variations momentanées de débit.

## CELLULE DE CISAILLEMENT

Pour tenter d'apporter une base plus fondamentale aux études d'écoulement des poudres et à la conception des trémies, divers dispositifs et méthodes d'essai de cisaillement permettant une évaluation plus complète et précise des propriétés d'écoulement des poudres ont été développés. La méthode dite de la cellule de cisaillement est largement utilisée pour l'étude des produits pharmaceutiques. Elle permet la détermination de multiples paramètres, notamment les critères de plasticité représentant la relation contrainte-déformation en cisaillement, l'angle de friction interne, la limite élastique en milieu non confiné, la résistance à la traction ainsi qu'une série de paramètres dérivés tels que le coefficient d'écoulement et d'autres indicateurs d'aptitude à l'écoulement. Autorisant un contrôle plus précis des paramètres expérimentaux, elle permet la détermination des propriétés d'écoulement en fonction de la charge de consolidation, du temps et d'autres conditions environnementales. Elle a été appliquée avec succès pour déterminer les paramètres critiques de conception des trémies et silos.

**Méthodes fondamentales de détermination**

Le 1$^{er}$ type de cellules de cisaillement est la cellule cylindrique. Elle comporte une division horizontale formant un plan de cisaillement entre la partie inférieure, stationnaire et la partie supérieure mobile de la cellule. Après consolidation du lit de poudre dans la cellule (par une procédure bien définie), on détermine la force requise pour le cisailler en mettant en mouvement la partie supérieure. Les cellules de cisaillement du 2$^{e}$ type, dites annulaires, présentent certains avantages sur les cellules cylindriques. Elles permettent notamment l'utilisation d'une plus faible quantité de matériel mais leur conception ne leur permet pas d'assurer une uniformité de cisaillement équivalente car les contraintes de cisaillement exercées sur le matériel sont plus élevées à l'extérieur de l'anneau que dans la région centrale. Un 3$^{e}$ type de cellule (type plan) se compose d'une fine couche de poudre prise en sandwich entre 2 surfaces rugueuses dont celle du dessus est mobile.

Chacune de ces méthodes comporte des avantages et des inconvénients dont l'analyse détaillée dépasse le cadre de ce chapitre. De même que pour les autres méthodes de caractérisation de l'écoulement des poudres, on trouve dans la littérature la description de nombreuses variantes. De façon générale, un avantage significatif de la cellule de cisaillement

est de permettre un meilleur contrôle expérimental. Il s'agit en revanche d'une méthode longue et nécessitant l'utilisation de quantités significatives de matériel ainsi qu'un opérateur qualifié.

**Recommandations**

La cellule de cisaillement, avec ses multiples configurations et procédures d'essai, fournit de nombreuses données et permet une caractérisation très efficace de l'écoulement des poudres. Elle est également utile pour optimiser la conception des trémies et silos. Du fait de la diversité des équipements et procédures expérimentales existants, il n'est pas présenté dans ce chapitre de recommandations méthodologiques. En revanche, il est recommandé d'inclure dans les résultats de caractérisation de l'écoulement une description complète des équipements et méthodes utilisés.

**01/2010:20937**

## 2.9.37. MICROSCOPIE OPTIQUE(16)

La microscopie optique est généralement applicable à la caractérisation des particules de taille supérieure ou égale à 1 µm. La limite inférieure est imposée par le pouvoir de résolution du microscope. La limite supérieure est moins bien définie et dépend de la plus grande difficulté associée à la caractérisation des particules de grande taille. Diverses techniques alternatives sont disponibles pour la caractérisation des particules exclues du domaine d'application de la microscopie optique. La microscopie optique est particulièrement utile pour la caractérisation des particules non sphériques. Elle peut également servir de base à l'étalonnage de méthodes plus rapides développées pour les analyses de routine.

**Appareillage**. Le microscope utilisé doit être stable et protégé des vibrations. Son grandissement (produit du grandissement de l'objectif par celui de l'oculaire et des autres composants optiques grossissants) doit être suffisant pour permettre une caractérisation adéquate des plus petites particules à classer dans l'échantillon. Il convient de rechercher l'ouverture numérique maximale de l'objectif pour chaque intervalle de grandissement. On peut utiliser des filtres polarisants en conjonction avec des analyseurs et des lames de phase appropriés. L'emploi de filtres de couleur à transmission spectrale relativement étroite est nécessaire avec les objectifs achromatiques et préférable avec les objectifs apochromatiques ; il est indispensable à un bon rendu des couleurs en photomicrographie. Des condenseurs corrigés au moins pour les aberrations de sphéricité doivent être utilisés sous la platine du microscope et avec la lampe. L'ouverture numérique du condenseur placé sous la platine doit coïncider avec celle de l'objectif dans les conditions d'emploi ; elle est conditionnée par l'ouverture effective du diaphragme du condenseur et la présence d'huile d'immersion.

**Ajustement**. L'alignement précis de tous les éléments du système optique est essentiel, de même qu'une focalisation correcte. La focalisation des éléments est à effectuer suivant les recommandations du fabricant du microscope. Un alignement axial critique est recommandé.

**Illumination**. L'une des conditions d'une bonne illumination est l'obtention d'une intensité lumineuse uniforme et ajustable sur l'ensemble du champ de vision ; il est préférable d'opérer sous illumination Köhler. Dans le cas de particules colorées, la couleur des filtres est choisie de façon à optimiser le contraste et les détails de l'image.

**Caractérisation visuelle**. Le grandissement et l'ouverture numérique doivent être suffisamment élevés pour permettre l'obtention d'une résolution adéquate des images des particules à caractériser. On détermine le grandissement effectif en étalonnant le micromètre de l'oculaire à l'aide d'un micromètre-objet étalonné. Il est possible de réduire les erreurs en adoptant un grandissement suffisant pour que l'image de la particule occupe au moins 10 divisions de l'oculaire. Chaque objectif doit être étalonné séparément.

Pour étalonner l'échelle de l'oculaire, il convient de l'aligner avec celle du micromètre-objet. On peut ainsi déterminer précisément la distance entre les divisions de l'échelle de l'oculaire. Il faut parfois opérer avec plusieurs grandissements différents pour caractériser des produits présentant une large distribution granulométrique.

**Caractérisation photographique**. Si la taille des particules doit être déterminée par des méthodes photographiques, il faut veiller à obtenir une focalisation précise de l'objet dans le plan de l'émulsion photographique. On détermine le grandissement effectif en photographiant un micromètre-objet étalonné, avec un film photographique possédant une vitesse, un pouvoir de résolution et un contraste suffisants. L'exposition et le traitement utilisés pour photographier l'échantillon et pour déterminer le grandissement doivent être identiques. La taille apparente d'une image photographique est fonction de l'exposition, du développement et de l'impression ainsi que du pouvoir de résolution du microscope.

**Montage de la préparation**. Le milieu de montage à utiliser dépend des propriétés physiques de l'échantillon. Pour permettre une observation satisfaisante des contours, le contraste entre échantillon et milieu doit être suffisant sans être trop élevé. Les particules doivent être réparties dans un seul plan et convenablement dispersées, afin qu'il soit possible de distinguer les particules élémentaires à caractériser. Elles doivent par ailleurs être représentatives de la distribution granulométrique du matériel, et n'avoir pas subi d'altération lors du montage. Il est important de veiller à ce que cette condition soit satisfaite. La solubilité des particules est également à prendre en compte dans le choix du milieu de montage.

**Caractérisation de la cristallinité**. On peut caractériser la cristallinité d'un produit pour vérifier qu'il est conforme à l'exigence de cristallinité spécifiée dans la monographie d'une substance pharmaceutique. Sauf indication contraire dans la monographie, montez quelques particules de l'échantillon dans une huile minérale, sur une lame de verre propre, puis examinez le mélange au microscope polarisant : en faisant pivoter la platine du microscope, on observe une biréfringence (couleurs d'interférence) ainsi que des positions d'extinction.

**Essai granulométrique limite par microscopie**. Pesez une quantité appropriée de la poudre à examiner (10-100 mg par exemple) et mettez-la en suspension dans 10 mL d'un milieu approprié, dans lequel la poudre ne se dissout pas, en ajoutant si nécessaire un agent mouillant. Il est possible de maintenir les particules en suspension homogène en utilisant un milieu de densité similaire ou adaptée et en assurant une agitation appropriée. Introduisez une portion de la suspension homogène dans une cellule de comptage appropriée et examinez au microscope une surface correspondant à au moins 10 µg de la poudre à examiner. Dénombrez toutes les particules dont la dimension maximale est supérieure à la taille limite spécifiée. La taille limite et le nombre admis de particules de taille supérieure à cette limite sont définis pour chaque substance.

**Caractérisation de la taille des particules**. La mesure de la taille des particules est de complexité variable selon leur forme et le nombre de particules caractérisées doit être suffisant pour assurer un niveau d'incertitude acceptable sur les paramètres mesurés. Des informations complémentaires sur la mesure de la taille des particules, la taille de l'échantillon et l'analyse des données figurent, par exemple, dans la norme ISO 9276. Pour les particules sphériques, la taille est définie par le diamètre. Pour les particules irrégulières, elle peut être définie de diverses façons. En règle générale, la caractérisation de la taille des particules de forme irrégulière doit comprendre des informations sur le type de diamètre mesuré, ainsi que sur la

(16) Ce chapitre a fait l'objet du processus d'harmonisation des pharmacopées. Voir chapitre *5.8. Harmonisation des pharmacopées.*

forme de la particule. Diverses mesures couramment utilisées sont représentées figure 2.9.37.-1 ; elles sont définies comme suit :

– le *diamètre de Feret* est la distance entre les parallèles imaginaires tangentes à une particule orientée de façon aléatoire et perpendiculaires à l'échelle de l'oculaire,
– le *diamètre de Martin* est le diamètre au point qui divise une particule orientée de façon aléatoire en 2 aires projetées égales,
– le *diamètre de l'aire projetée* est le diamètre d'un cercle de même aire projetée que la particule,
– la *longueur* est la plus grande dimension de bord à bord d'une particule orientée parallèlement à l'échelle de l'oculaire,
– la *largeur* de la particule est la plus grande dimension mesurée perpendiculairement à la longueur.

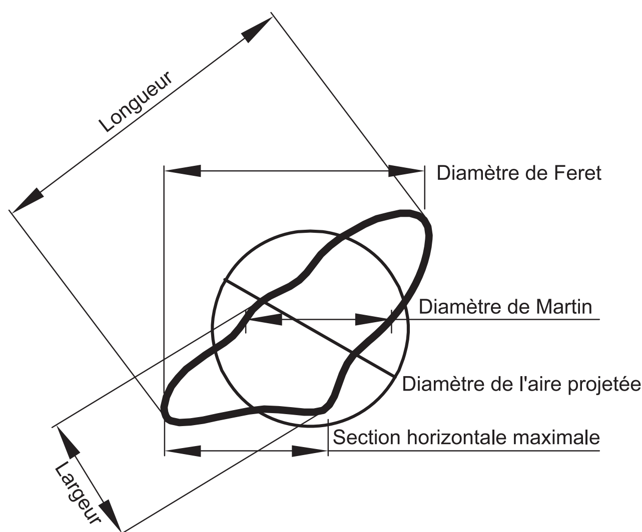



Figure 2.9.37.-1. – *Mesures courantes de la taille des particules*

**Caractérisation de la forme des particules**. Pour les particules de forme irrégulière, la caractérisation de taille doit également inclure des informations sur la forme de la particule. L'homogénéité de la poudre doit être vérifiée avec un grandissement approprié. Divers descripteurs de forme couramment utilisés sont décrits figure 2.9.37.-2 et définis comme suit :

– *aciculaire* : particule longue et fine, en forme d'aiguille, de largeur et d'épaisseur voisines,
– *columnaire* : particule longue et fine mais plus large et épaisse qu'une particule aciculaire,
– en *lamelle* ou *feuillet* : particule mince, aplatie, de longueur et de largeur voisines,
– en *lame* : particule aplatie de longueur et de largeur voisines, mais plus épaisse qu'une lamelle,
– *tabulaire* : particule principalement développée dans 2 directions,
– *isométrique* : particule de longueur, largeur et épaisseur voisines : les particules cubiques et sphériques en font partie.

**Observations générales**. La particule est généralement définie comme la plus petite unité discrète. Il peut s'agir d'une gouttelette liquide ou semi-solide, d'un monocristal ou d'une structure polycristalline, d'une particule amorphe ou d'un agglomérat. Les particules peuvent être associées, à des degrés divers décrits par les termes suivants :

– *lamellaire* : feuillets empilés,
– *agrégat* : masse de particules agrégées,
– *agglomérat* : particules fusionnées ou cimentées,
– *conglomérat* : mélange d'au moins 2 types de particules,
– *sphérulite* : amas à structure radiaire,
– *druse* : particules couvertes d'autres très petites particules.

Les termes suivants décrivent l'aspect et l'état des particules :

– *bords* : angulaires, arrondis, lisses, aigus, fracturés,
– *aspect* : couleur (avec filtres d'équilibrage appropriés), transparent, translucide, opaque,
– *défauts* : occlusions, inclusions.

La surface des particules peut être décrite comme :

– *craquelée* : partiellement fendue, brisée ou fissurée,
– *lisse* : exempte d'irrégularités, rugosités ou projections,
– *poreuse* : présentant des ouvertures ou des canalicules,
– *rugueuse* : accidentée, inégale, non lisse,
– *ponctuée* : présentant de petites indentations.

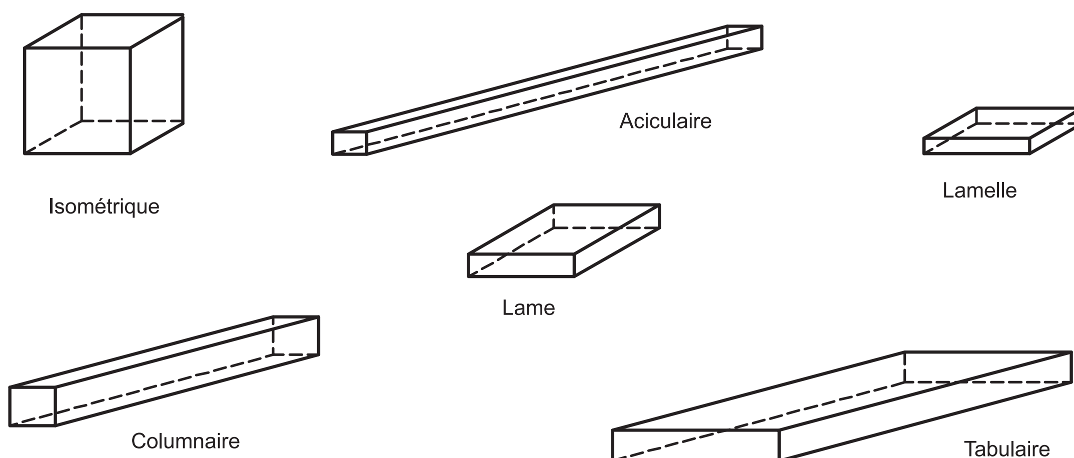



Figure 2.9.37.-2. – *Descripteurs morphologiques courants*

**01/2010:20938**

# 2.9.38. ESTIMATION DE LA DISTRIBUTION GRANULOMÉTRIQUE PAR TAMISAGE ANALYTIQUE[17]

Le tamisage est l'une des plus anciennes méthodes de classification des poudres et granulés en fonction de leur distribution granulométrique. Lorsque l'on utilise un tamis constitué d'une toile tissée, le tri des particules s'effectue essentiellement selon leur dimension intermédiaire (largeur ou épaisseur). Le tamisage mécanique est surtout adapté aux cas où la majorité des particules sont de taille supérieure à environ 75 µm. En dessous de cette taille, le poids trop faible des particules est insuffisant pour vaincre les forces superficielles de cohésion et d'adhésion qui poussent les particules à s'agglutiner et à adhérer au tamis, de sorte que des particules qui devraient normalement traverser le tamis se trouvent retenues. Dans ce cas, d'autres moyens d'agitation tels que le tamisage à jet d'air ou à ultrasons peuvent être plus appropriés. Néanmoins, le tamisage peut parfois, sous réserve de validation, être utilisé pour des poudres ou granulés ayant une granulométrie médiane inférieure à 75 µm. Dans le domaine pharmaceutique, le tamisage est la méthode de loin la plus utilisée pour la classification des qualités relativement grossières de poudres et granulés de composition homogène. Elle a pour avantage, notamment, d'opérer la classification des poudres et granulés sur la base de leur seule distribution granulométrique et de permettre dans la plupart des cas l'analyse à l'état sec.

Au nombre des limitations de la méthode comptent la nécessité d'utiliser une prise d'essai relativement importante (normalement au moins 25 g, selon la densité de la poudre ou du granulé et le diamètre des tamis) et la difficulté que pose le tamisage des poudres et granulés gras ou plus généralement cohésifs, qui tendent à colmater les mailles du tamis. La méthode apporte une estimation essentiellement bidimensionnelle car le passage à travers les mailles du tamis est souvent conditionné davantage par la largeur et l'épaisseur maximales des particules que par leur longueur.

La méthode décrite est destinée à l'estimation de la distribution granulométrique totale d'un produit de composition homogène. Elle n'est pas destinée à la détermination de la proportion de particules retenues (le « refus ») ou non retenues (le « passant ») sur 1 ou 2 tamis.

Sauf indication contraire dans la monographie, procédez à l'estimation de la distribution granulométrique selon le procédé de tamisage à sec. Lorsqu'il s'avère difficile d'atteindre le point final (si le produit ne passe pas facilement à travers le tamis) ou qu'il est nécessaire d'opérer avec les tamis les plus fins de la gamme (au-dessous de 75 µm), il convient d'envisager sérieusement le recours éventuel à une autre méthode de granulométrie.

Le tamisage doit être conduit dans des conditions n'entraînant ni absorption ni déperdition d'humidité par l'échantillon. L'humidité relative de l'environnement de mesure doit être contrôlée de façon à prévenir toute absorption ou déperdition d'humidité par l'échantillon. Sauf indication contraire, le tamisage analytique est normalement effectué à humidité ambiante. Toute condition spéciale applicable à un produit particulier doit être précisée dans la monographie correspondante.

**Principe du tamisage analytique**. Les tamis analytiques sont constitués d'une toile tissée à ouvertures (mailles) de forme sensiblement carrée. Cette toile est fixée à la base d'un cadre cylindrique ouvert. Le principe de la méthode est le suivant. Des tamis sont empilés les uns sur les autres par ordre décroissant de finesse, puis la poudre à analyser est placée sur le tamis supérieur. Après agitation de la colonne de tamis pendant une durée normalisée, on pèse exactement la quantité de produit retenue sur chaque tamis. L'essai donne le pourcentage en masse de particules comprises dans chaque intervalle granulométrique.

Cette méthode d'estimation de la distribution granulométrique d'une poudre pharmaceutique de composition homogène est généralement bien adaptée aux produits comportant au moins 80 pour cent de particules de taille supérieure à 75 µm. Le paramètre dimensionnel intervenant dans la détermination de la distribution granulométrique est la longueur du côté de la plus petite des ouvertures carrées qui laisse passer la particule.

## TAMIS ANALYTIQUES

Les tamis analytiques appropriés aux essais de pharmacopée sont conformes à la série de tamis normalisés parmi ceux spécifiés dans l'édition la plus récente de la norme *ISO 3310-1 : Tamis de contrôle - Exigences techniques et vérifications - Partie 1 : tamis de contrôle en tissus métalliques* (voir tableau 2.9.38.-1). Sauf indication contraire dans la monographie, utilisez les tamis ISO figurant dans la colonne « Tailles principales » du tableau 2.9.38.-1 qui sont recommandés dans la région considérée.

Les tamis sont choisis de façon à couvrir l'ensemble de l'étendue granulométrique de l'échantillon analysé. Il est recommandé d'utiliser une série de tamis présentant une progression de $\sqrt{2}$ pour la surface de l'ouverture de maille. Ils sont assemblés par ordre de finesse croissante du haut vers le bas. La dimension des ouvertures (mailles) est exprimée en millimètres ou micromètres.

Les tamis sont en acier inoxydable, ou à défaut, en laiton ou tout autre matériau inerte approprié.

Tableau 2.9.38.-1

| **Ouverture nominale ISO** | | | **Tamis US N°** | **Tamis USP recommandés (µm)** | **Tamis européen N°** | **Tamis japonais N°** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tailles principales R 20/3** | **Tailles supplémentaires R 20** | **R 40/3** | | | | |
| 11,20 mm | 11,20 mm | 11,20 mm | | | 11 200 | |
| | 10,00 mm | | | | | |
| | | 9,50 mm | | | | |
| | 9,00 mm | | | | | |
| 8,00 mm | 8,00 mm | 8,00 mm | | | | |
| | 7,10 mm | | | | | |
| | | 6,70 mm | | | | |
| | 6,30 mm | | | | | |
| 5,60 mm | 5,60 mm | 5,60 mm | | | 5600 | 3,5 |
| | 5,00 mm | | | | | |
| | | 4,75 mm | | | | 4 |
| | 4,50 mm | | | | | |
| 4,00 mm | 4,00 mm | 4,00 mm | 5 | 4000 | 4000 | 4,7 |
| | 3,55 mm | | | | | |
| | | 3,35 mm | 6 | | | 5,5 |
| | 3,15 mm | | | | | |
| 2,80 mm | 2,80 mm | 2,80 mm | 7 | 2800 | 2800 | 6,5 |
| | 2,50 mm | | | | | |
| | | 2,36 mm | 8 | | | 7,5 |

(17) Ce chapitre a fait l'objet du processus d'harmonisation des pharmacopées. Voir chapitre *5.8. Harmonisation des pharmacopées.*

| Ouverture nominale ISO | | | Tamis US N° | Tamis USP recommandés (μm) | Tamis européen N° | Tamis japonais N° |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Tailles principales | Tailles supplémentaires | | | | | |
| R 20/3 | R 20 | R 40/3 | | | | |
| | 2,24 mm | | | | | |
| 2,00 mm | 2,00 mm | 2,00 mm | 10 | 2000 | 2000 | 8,6 |
| | 1,80 mm | | | | | |
| | | 1,70 mm | 12 | | | 10 |
| | 1,60 mm | | | | | |
| 1,40 mm | 1,40 mm | 1,40 mm | 14 | 1400 | 1400 | 12 |
| | 1,25 mm | | | | | |
| | | 1,18 mm | 16 | | | 14 |
| | 1,12 mm | | | | | |
| 1,00 mm | 1,00 mm | 1,00 mm | 18 | 1000 | 1000 | 16 |
| | 900 μm | | | | | |
| | | 850 μm | 20 | | | 18 |
| | 800 μm | | | | | |
| 710 μm | 710 μm | 710 μm | 25 | 710 | 710 | 22 |
| | 630 μm | | | | | |
| | | 600 μm | 30 | | | 26 |
| | 560 μm | | | | | |
| 500 μm | 500 μm | 500 μm | 35 | 500 | 500 | 30 |
| | 450 μm | | | | | |
| | | 425 μm | 40 | | | 36 |
| | 400 μm | | | | | |
| 355 μm | 355 μm | 355 μm | 45 | 355 | 355 | 42 |
| | 315 μm | | | | | |
| | | 300 μm | 50 | | | 50 |
| | 280 μm | | | | | |
| 250 μm | 250 μm | 250 μm | 60 | 250 | 250 | 60 |
| | 224 μm | | | | | |
| | | 212 μm | 70 | | | 70 |
| | 200 μm | | | | | |
| 180 μm | 180 μm | 180 μm | 80 | 180 | 180 | 83 |
| | 160 μm | | | | | |
| | | 150 μm | 100 | | | 100 |
| | 140 μm | | | | | |
| 125 μm | 125 μm | 125 μm | 120 | 125 | 125 | 119 |
| | 112 μm | | | | | |
| | | 106 μm | 140 | | | 140 |
| | 100 μm | | | | | |
| 90 μm | 90 μm | 90 μm | 170 | 90 | 90 | 166 |
| | 80 μm | | | | | |
| | | 75 μm | 200 | | | 200 |
| | 71 μm | | | | | |
| 63 μm | 63 μm | 63 μm | 230 | 63 | 63 | 235 |
| | 56 μm | | | | | |
| | | 53 μm | 270 | | | 282 |
| | 50 μm | | | | | |
| 45 μm | 45 μm | 45 μm | 325 | 45 | 45 | 330 |
| | 40 μm | | | | | |
| | | 38 μm | | | 38 | 391 |

L'étalonnage et le ré-étalonnage des tamis analytiques sont effectués conformément aux spécifications de l'édition la plus récente de la norme ISO 3310-1. Avant utilisation, il convient de procéder à un examen visuel soigneux des tamis pour détecter d'éventuelles déformations ou ruptures, notamment au niveau de la jonction entre le cadre et la toile. Les tamis peuvent être étalonnés par des procédés optiques visant à estimer la taille moyenne et la variabilité des ouvertures. On peut également utiliser, pour évaluer la maille effective des tamis dans le domaine 212-850 μm des sphères étalons en verre. Sauf indication contraire dans la monographie, l'analyse par tamisage est effectuée à température ambiante contrôlée et dans les conditions ambiantes d'humidité relative.

*Nettoyage des tamis.* Il est recommandé, pour nettoyer les tamis, d'utiliser exclusivement un jet d'air à basse pression ou un courant liquide. Si après ce nettoyage certaines des ouvertures sont encore obstruées par des particules, on peut en dernier ressort procéder avec précaution à un brossage doux.

**Prise d'essai**. Si la masse de la prise d'essai n'est pas indiquée dans la monographie de la substance considérée, utilisez, pour des tamis de 200 mm de diamètre, un échantillon de 25-100 g selon la masse volumique vrac du produit. Pour les tamis de 76 mm de diamètre, la masse de la prise d'essai sera de l'ordre de 1/7 de celle qui conviendrait sur un tamis de 200 mm. Déterminez la masse optimale pour le produit considéré en procédant au tamisage sur agitateur mécanique de plusieurs prises d'essai exactement pesées (par exemple 25 g, 50 g et 100 g), pendant la même durée (notez que si les résultats obtenus sont voisins pour les prises d'essai de 25 g et de 50 g mais que pour celle de 100 g un moindre pourcentage de matière passe à travers le tamis le plus fin, alors cette prise d'essai de 100 g est trop importante). Lorsque l'on ne dispose que d'un échantillon de 10-25 g, on peut utiliser des tamis de diamètre inférieur mais de même maille ; il faudra alors toutefois redéterminer le point final. L'emploi d'échantillons de masse inférieure (par exemple jusqu'à 5 g) peut être nécessaire. Pour les produits de faible densité particulaire apparente ou principalement constitués de particules de forme nettement isodiamétrique, il peut être nécessaire d'utiliser des prises d'essai inférieures à 5 g pour un diamètre de tamis de 200 mm afin d'éviter un colmatage excessif du tamis. Le problème du colmatage des ouvertures du tamis est normalement l'un des aspects à considérer lors de la validation d'une procédure particulière d'analyse par tamisage.

Si le produit à analyser est sensible aux fluctuations d'humidité et tend à absorber ou perdre d'importantes quantités d'eau, l'essai doit être conduit sous un environnement convenablement contrôlé. De même, si le produit a tendance à produire de l'électricité statique, il faut suivre attentivement le déroulement de l'essai pour s'assurer que l'analyse n'en est pas affectée. Ce dernier effet peut être combattu par addition d'un agent antistatique (tel que le dioxyde de silicium colloïdal et/ou l'oxyde d'aluminium) à teneur de 0,5 pour cent *m/m*. S'il s'avère impossible d'éliminer ces effets indésirables, il conviendra de recourir à une autre méthode d'analyse granulométrique.

**Méthodes d'agitation**. Il existe dans le commerce différents systèmes d'agitation des tamis et de la poudre pouvant être utilisés pour le tamisage analytique. Néanmoins, les diverses méthodes d'agitation peuvent conduire à des résultats différents dans les analyses par tamisage et déterminations du

point final car le type et l'amplitude des forces qui s'exercent sur les particules individuelles ne sont pas les mêmes. Il existe des méthodes utilisant une agitation mécanique ou électromagnétique qui peuvent induire un mouvement d'oscillation vertical ou un mouvement circulaire horizontal, ou l'application de chocs mécaniques qui peuvent être combinés à un mouvement circulaire horizontal. L'entraînement des particules dans un courant d'air est également possible. Il est nécessaire d'indiquer dans les résultats la méthode d'agitation employée ainsi que les paramètres appliqués (s'ils sont variables) car l'analyse granulométrique et la détermination du point final donneront des résultats différents selon les conditions d'agitation et ces différences peuvent être suffisamment importantes pour entraîner l'obtention d'un résultat inacceptable dans certaines circonstances.

**Détermination du point final**. Le point final de l'analyse par tamisage est atteint lorsque la masse retenue sur chacun des tamis (refus) devient constante à 5 pour cent ou 0,1 g près (10 pour cent pour les tamis de 76 mm) par rapport à la valeur précédemment mesurée sur ce tamis. Si sur un tamis donné le refus représente moins de 5 pour cent de la masse totale de la prise d'essai, le point final pour ce tamis correspondra à une variation de masse inférieure ou égale à 20 pour cent de la masse précédemment mesurée.

Si sur un tamis donné le refus représente plus de 50 pour cent de la masse totale de la prise d'essai, sans que cela soit indiqué dans la monographie, il convient de répéter l'essai en ajoutant à la colonne un tamis de maille intermédiaire comprise entre celles du tamis en cause et du tamis immédiatement supérieur de la série initiale, c'est-à-dire le tamis de la série ISO qui ne figurait pas initialement dans la colonne.

MODE OPÉRATOIRE

**Agitation mécanique (tamisage à sec)**. Pesez chacun des tamis à 0,1 g près. Déposez la prise d'essai exactement pesée dans le tamis du haut (le plus grossier) et replacez le couvercle. Agitez la colonne de tamis pendant 5 min, puis séparez avec précaution chacun des tamis, sans perdre de matière. Pesez à nouveau et déterminez la masse du refus de chaque tamis. Déterminez de même la masse de produit collectée dans la base. Réassemblez la colonne de tamis et agitez pendant 5 min, puis séparez et pesez chaque tamis comme décrit précédemment. Répétez cette opération autant de fois que nécessaire pour atteindre le point final (voir la section Détermination du point final sous Tamis analytiques). L'analyse une fois terminée, additionnez les masses obtenues. La perte totale de matière ne doit pas être supérieure à 5 pour cent de la masse de la prise d'essai initiale.

Répétez l'analyse sur un nouvel échantillon, mais en opérant en une seule fois pendant une durée égale à la durée cumulée des phases d'agitation précédentes. Vérifiez que cette durée de tamisage permet de satisfaire aux critères spécifiés pour la détermination du point final. Lorsque ce point final a été validé pour un produit spécifique, les analyses ultérieures peuvent être effectuées en un seul temps avec une durée d'agitation fixe, sous réserve que la distribution granulométrique se situe dans les limites de variation normale.

S'il apparaît que les particules retenues sur un ou plusieurs des tamis sont des agrégats plutôt que des particules élémentaires, il est peu probable que le tamisage mécanique à sec permette d'obtenir une bonne reproductibilité. Il convient alors de recourir à une autre méthode d'analyse de la distribution granulométrique.

**Méthodes d'entraînement par l'air (tamiseurs à jet d'air et à ultrasons)**. Il existe dans le commerce différents types de tamiseurs utilisant un balayage d'air. L'un de ces systèmes, qui fonctionne avec un seul tamis à la fois, est appelé tamiseur à jet d'air (*air jet*). Il utilise la même méthodologie générale que celle décrite pour le tamisage à sec mais le système d'agitation mécanique est remplacé par un jet d'air normalisé. La détermination de la distribution granulométrique nécessite plusieurs analyses séquentielles sur des tamis différents, en commençant par le tamis le plus fin. Le tamiseur à jet d'air met souvent en oeuvre des tamis plus fins que ceux utilisés pour le tamisage à sec classique. Cette technique est plutôt appropriée aux cas où l'on souhaite uniquement déterminer la fraction de taille supérieure ou inférieure à une valeur donnée.

Une méthode apparentée (*sonic sifting*) utilise un empilement de tamis où la prise d'essai est « portée » par une colonne d'air soumise à des oscillations verticales, qui soulève l'échantillon puis le ramène sur les mailles du tamis à une fréquence donnée. Lorsque cette méthode est utilisée, il peut être nécessaire de ramener la taille de l'échantillon à 5 g.

Ces 2 méthodes peuvent être utiles pour l'analyse des poudres ou granulés lorsque les techniques de tamisage mécanique s'avèrent incapables de fournir des résultats pertinents.

Elles sont toutefois étroitement conditionnées par la bonne dispersion de la poudre dans le flux d'air. Cette condition peut être difficile à réaliser si l'on opère dans la partie inférieure de la gamme des tamis (au-dessous de 75 µm) où les particules tendent à être plus cohésives et surtout si la substance a tendance à produire de l'électricité statique. Pour ces différentes raisons, la détermination du point final est particulièrement critique et il est très important de vérifier que la fraction la plus grossière est constituée de particules élémentaires et non d'agrégats.

INTERPRÉTATION

Les données brutes consignées doivent comprendre la masse de la prise d'essai, le temps total de tamisage, une description précise de la méthodologie utilisée et les valeurs assignées à tous les paramètres variables, ainsi que la masse recueillie sur les différents tamis et dans la base.

Il peut être commode de convertir ces données brutes en distribution (en masse) cumulée et, si l'on souhaite les exprimer sous forme de distribution dite en passants cumulés (cumul en masse des particules de taille inférieure à la valeur considérée), il faut intégrer à la gamme un tamis laissant passer toutes les particules. S'il apparaît que le refus obtenu sur l'un des tamis se compose d'agrégats constitués au cours du processus de tamisage, l'analyse n'est pas valable.

**04/2008:20940**

# 2.9.40. UNIFORMITÉ DES PRÉPARATIONS UNIDOSES

Pour que l'uniformité des préparations unidoses soit assurée, chaque unité d'un lot doit présenter une teneur en substance active comprise dans un intervalle étroit autour de la valeur indiquée sur l'étiquette. Les préparations unidoses sont définies comme des formes pharmaceutiques contenant, par unité, une dose unique ou une fraction de dose d'une substance active. Sauf indication contraire, les spécifications d'uniformité des préparations unidoses ne s'appliquent pas aux suspensions, émulsions ou gels, conditionnés en récipients unidoses, qui sont destinés à une administration par voie cutanée. L'essai n'est pas exigé pour les préparations de polyvitamines et d'oligo-éléments.

L'uniformité d'une préparation unidose est définie comme le degré d'uniformité, sur l'ensemble des unités, de la quantité de substance active. Par conséquent, sauf indication contraire dans la Pharmacopée, les exigences du présent chapitre s'appliquent individuellement à chacune des substances actives contenues dans la préparation unidose, lorsque celle-ci en contient plusieurs.

L'uniformité des préparations unidoses peut être démontrée par 2 méthodes : l'uniformité de teneur et la variation de masse (voir tableau 2.9.40.-1).

L'essai d'uniformité de teneur des préparations unidoses repose sur le dosage individuel de la (des) substance(s) active(s) dans un certain nombre d'unités, afin de déterminer si ces teneurs individuelles sont comprises dans les limites établies. Cette méthode peut être appliquée dans tous les cas.

Table 2.9.40.-1. – *Application aux différentes formes pharmaceutiques des essais d'uniformité de teneur (UT) et de variation de masse (VM)*

| Forme pharmaceutique | Type | Sous-type | Quantité et proportion de substance active | |
|---|---|---|---|---|
| | | | ≥ 25 mg et ≥ 25 pour cent | < 25 mg ou < 25 pour cent |
| Comprimés | non enrobés | | VM | UT |
| | enrobés | pelliculés | VM | UT |
| | | autres | UT | UT |
| Capsules | enveloppe dure | | VM | UT |
| | enveloppe molle | suspensions, émulsions, gels | UT | UT |
| | | solutions | VM | VM |
| Préparations solides en récipients unidoses | mono-composant | | VM | VM |
| | multi-composants | solutions cryodesséchées dans le récipient final | VM | VM |
| | | autres | UT | UT |
| Solutions contenues dans des récipients unidoses | | | VM | VM |
| Autres | | | UT | UT |

L'essai de variation de masse est applicable aux formes pharmaceutiques suivantes :

(1) les solutions contenues dans des récipients unidoses ou des capsules à enveloppe molle ;

(2) les préparations solides (y compris poudres, granulés et préparations solides stériles) conditionnées en récipients unidoses et ne contenant pas de substances actives ou inactives ajoutées ;

(3) les préparations solides (y compris stériles) conditionnées en récipients unidoses et contenant ou non des substances actives ou inactives ajoutées, qui ont été préparées à partir de solutions vraies puis cryodesséchées dans le récipient final et dont l'étiquette spécifie qu'elles ont été ainsi préparées ;

(4) les capsules à enveloppe dure (gélules), les comprimés non enrobés et les comprimés pelliculés qui contiennent au moins 25 mg d'une substance active représentant au moins 25 pour cent en masse de la préparation unidose ou, dans le cas des gélules, du contenu de la gélule ; toutefois, l'uniformité des autres substances actives présentes en moindre proportion est démontrée par rapport aux exigences d'uniformité de teneur.

L'application de l'essai d'uniformité de teneur est exigée pour toutes les formes pharmaceutiques ne répondant pas aux conditions d'application de l'essai de variation de masse spécifiées ci-dessus. Cependant, pour les produits se situant au-dessous du seuil de 25 mg/25 pour cent, la vérification de l'uniformité peut être effectuée par l'essai de variation de masse plutôt que d'uniformité de teneur à la condition suivante : l'écart type relatif (ETR) de la concentration de la substance active dans la préparation unidose finale n'est pas supérieur à 2 pour cent, d'après les données obtenues lors de la validation du procédé et du développement, et sous réserve d'approbation de ce changement par l'autorité compétente. L'ETR de la concentration est l'ETR de la concentration par unité de prise ($m/m$ ou $m/V$), qui est égale au résultat du dosage effectué sur chaque unité rapporté à la masse individuelle de l'unité. Voir la formule de calcul de l'ETR dans le tableau 2.9.40.-2.

## UNIFORMITÉ DE TENEUR

Prélevez au minimum 30 unités et procédez comme indiqué ci-après pour la forme pharmaceutique considérée. Si une procédure différente est utilisée pour le dosage de la préparation et l'essai d'uniformité de teneur, il peut être nécessaire d'établir un facteur de correction à appliquer aux résultats de ce dernier.

**Formes solides**. Dosez individuellement 10 unités par une méthode d'analyse appropriée. Calculez la valeur d'acceptation (voir tableau 2.9.40.-2).

**Formes liquides**. Dosez individuellement 10 unités par une méthode d'analyse appropriée. Effectuez le dosage sur la quantité de produit, bien mélangé, qui est extraite d'un récipient individuel dans les conditions normales d'utilisation. Exprimez les résultats en termes de dose délivrée. Calculez la valeur d'acceptation (voir tableau 2.9.40.-2).

### Calcul de la valeur d'acceptation

Calculez la valeur d'acceptation (*VA*) à l'aide de la formule :

$$\left|M - \overline{X}\right| + ks$$

dont les termes sont définis dans le tableau 2.9.40.-2.

## VARIATION DE MASSE

Effectuez un dosage de la (des) substance(s) active(s) sur un échantillon représentatif du lot, par une méthode d'analyse appropriée. La valeur obtenue constitue le résultat $A$, exprimé en pourcentage de la valeur indiquée sur l'étiquette (voir Calcul de la valeur d'acceptation). La concentration (masse de substance active rapportée à la masse de l'unité) est supposée uniforme. Prélevez au minimum 30 unités de la préparation unidose et procédez comme indiqué ci-après pour la forme pharmaceutique considérée.

**Comprimés non enrobés ou pelliculés**. Pesez individuellement 10 comprimés, de façon exacte. Calculez la teneur en substance active de chaque comprimé, exprimée en pourcentage de la valeur indiquée sur l'étiquette, à partir de la masse individuelle des comprimés et du résultat du dosage. Calculez la valeur d'acceptation.

**Capsules à enveloppe dure (gélules)**. Pesez individuellement 10 capsules, de façon exacte, en veillant à préserver l'identité de chaque capsule. Videz chaque capsule de son contenu par un moyen approprié. Pesez individuellement les enveloppes vides, de façon exacte et calculez la masse nette du contenu de chaque capsule en soustrayant la masse de l'enveloppe de la masse brute de la capsule. Calculez la teneur en substance active du contenu de chaque capsule à partir de la masse individuelle du contenu des capsules et du résultat du dosage. Calculez la valeur d'acceptation.

**Capsules à enveloppe molle**. Pesez individuellement 10 capsules intactes, de façon exacte, en veillant à préserver l'identité de chaque capsule. Ouvrez ensuite les capsules avec un instrument approprié, propre et sec, de type ciseaux ou lame de rasoir, et videz-les de leur contenu en lavant avec un solvant approprié. Laissez le solvant retenu dans les enveloppes s'évaporer à température ambiante, pendant environ 30 min, en prenant les précautions nécessaires pour éviter toute perte ou absorption d'humidité. Pesez individuellement les enveloppes

Tableau 2.9.40.-2.

| Variable | Définition | Conditions | Valeur |
|---|---|---|---|
| $\overline{X}$ | Moyenne des teneurs individuelles ($x_1$, $x_2$, ..., $x_n$), exprimée en pourcentage de la valeur indiquée sur l'étiquette | | |
| $x_1$, $x_2$, ..., $x_n$ | Teneur individuelle des unités examinées, exprimée en pourcentage de la valeur indiquée sur l'étiquette | | |
| $n$ | Effectif de l'échantillon (nombre d'unités le constituant) | | |
| $k$ | Constante d'acceptabilité | Si $n$ = 10, alors | 2,4 |
| | | Si $n$ = 30, alors | 2,0 |
| $s$ | Ecart type de l'échantillon | | $\left[\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i-\overline{X})^2}{n-1}\right]^{1/2}$ |
| *ETR* | Ecart type relatif | | $\frac{100s}{\overline{X}}$ |
| $M$ (cas 1)<br>A appliquer lorsque $T \leq 101{,}5$ | Valeur de référence | Si 98,5 pour cent ≤ $\overline{X}$ ≤ 101,5 pour cent, alors | $M = \overline{X}$<br>($VA = ks$) |
| | | Si $\overline{X}$ < 98,5 pour cent, alors | $M$ = 98,5 pour cent<br>($VA = 98{,}5 - \overline{X} + ks$) |
| | | Si $\overline{X}$ > 101,5 pour cent, alors | $M$ = 101,5 pour cent<br>($VA = \overline{X} - 101{,}5 + ks$) |
| $M$ (cas 2)<br>A appliquer lorsque $T > 101{,}5$ | Valeur de référence | Si 98,5 pour cent ≤ $\overline{X}$ ≤ $T$, alors | $M = \overline{X}$<br>($VA = ks$) |
| | | Si $\overline{X}$ < 98,5 pour cent, alors | $M$ = 98,5 pour cent<br>($VA = 98{,}5 - \overline{X} + ks$) |
| | | Si $\overline{X}$ > $T$, alors | $M$ = $T$ pour cent<br>($VA = \overline{X} - T + ks$) |
| Valeur d'acceptation ($VA$) | | | Formule générale :<br>$\lvert M - \overline{X}\rvert + ks$<br>Le mode de calcul est spécifié ci-dessus pour les différents cas. |
| $L1$ | Valeur d'acceptation maximale autorisée | | $L1$ = 15,0 sauf indication contraire |
| $L2$ | Intervalle maximal autorisé pour l'écart des unités individuelles examinées par rapport à la valeur calculée de $M$ | A la borne inférieure, aucun résultat individuel inférieur à 0,75 $M$ ; à la borne supérieure, aucun résultat individuel supérieur à 1,25 $M$ (sur la base d'une valeur de 25,0 pour $L2$) | $L2$ = 25,0 sauf indication contraire |
| $T$ | Teneur cible par unité de prise lors de la fabrication, exprimée en pourcentage de la valeur indiquée sur l'étiquette. $T$ est égal à 100 pour cent, sauf dans le cas de surdosage pour des raisons de stabilité, où $T$ est supérieur à 100 pour cent | | |

et calculez la masse nette du contenu. Calculez la teneur en substance active du contenu de chaque capsule à partir de la masse individuelle du contenu des capsules et du résultat du dosage. Calculez la valeur d'acceptation.

**Formes solides autres que les comprimés et capsules**. Procédez comme indiqué pour les capsules à enveloppe dure, en traitant chaque unité comme décrit. Calculez la valeur d'acceptation.

**Formes liquides**. Pesez individuellement, de façon exacte, la quantité de liquide extraite de 10 récipients dans les conditions normales d'utilisation. Si nécessaire, calculez le volume équivalent après avoir déterminé la masse volumique. Calculez la teneur en substance active du contenu de chaque récipient à partir de la masse individuelle du contenu des récipients et du résultat du dosage. Calculez la valeur d'acceptation.

**Calcul de la valeur d'acceptation**. Calculez la valeur d'acceptation (*VA*) comme indiqué dans l'essai d'uniformité de teneur, mais en remplaçant les teneurs individuelles des unités par les teneurs individuelles estimées, définies ci-après :

$x_1, x_2, ..., x_n$ = teneur individuelle estimée des unités examinées,

où

$$x_i = w_i \times \frac{A}{\overline{W}}$$

$w_1, w_2, ..., w_n$ = masse individuelle des unités examinées,

$A$ = teneur en substance active, en pourcentage de la valeur indiquée sur l'étiquette, obtenue par une méthode d'analyse appropriée (dosage),

$\overline{W}$ = moyenne des masses individuelles des unités utilisées dans le dosage.

CRITÈRES

Sauf indication contraire, appliquez les critères suivants.

**Formes solides et formes liquides**. Les exigences d'uniformité sont satisfaites si la valeur d'acceptation des 10 premières unités examinées est inférieure ou égale à $L1$. Si elle est supérieure à $L1$, effectuez l'essai sur les 20 unités suivantes et calculez la valeur d'acceptation. Les exigences d'uniformité sont satisfaites si la valeur d'acceptation finale des 30 unités est inférieure ou égale à $L1$ et si aucune teneur individuelle par unité n'est inférieure à $(1 - L2 \times 0{,}01)M$ ou supérieure à $(1 + L2 \times 0{,}01)M$ dans le calcul de la valeur d'acceptation dans l'essai d'uniformité de teneur ou de variation de masse. Sauf indication contraire, $L1$ est égal à 15,0 et $L2$ à 25,0.

**01/2008:20941**

# 2.9.41. FRIABILITÉ DES GRANULÉS ET DES SPHÉROÏDES

*Ce chapitre décrit 2 méthodes de détermination de la friabilité des granulés et des sphéroïdes utilisables au cours des études de développement. Il est cependant reconnu que plusieurs autres méthodes équivalentes peuvent être utilisées.*

Cet essai est destiné à déterminer, dans des conditions définies, la friabilité des granulés et des sphéroïdes. La friabilité est définie comme une réduction de la masse des granulés ou des sphéroïdes ou la formation de fragments de granulés ou de sphéroïdes, survenant lorsque les granulés ou les sphéroïdes sont soumis à des sollicitations mécaniques durant la manipulation (chute, vibration, fluidisation, etc.). L'abrasion, la rupture ou la déformation sont des exemples de changements présentés par les granulés ou les sphéroïdes.

PROCÉDÉ A

**Appareillage (appareil à lit fluidisé)**. L'appareil (voir figure 2.9.41.-1) se compose d'un tube de verre (A) de forme cylindrique, puis conique dans sa partie inférieure. Il est fermé à son extrémité supérieure par un tamis d'ouverture de maille de 500 µm ou tout autre tamis approprié servant de couvercle (B). L'extrémité conique est raccordée à un tube de verre en U (C), qu'il est possible de détacher pour sortir les granulés ou les sphéroïdes. Le tube en U est connecté à un raccord en T (D), dont l'une des entrées est reliée par un tube de silicone à un manomètre permettant de régler le débit de l'air comprimé (utilisez de l'air comprimé conforme aux exigences de teneur en eau de la monographie *Air médicinal (1238)*), et dont l'autre entrée est raccordée via un tube de silicone à un débitmètre à dérivation (E) (0,10-1,00 $m^3 \cdot h^{-1}$).

**Mode opératoire**. *Le mode opératoire suivant convient généralement.* Eliminez les particules fines par tamisage (tamis ayant une ouverture de maille de 710 µm ou tout autre tamis approprié). Introduisez environ 8,0 g ($m_1$) de granulés ou de sphéroïdes dans le tube A. Fermez avec le couvercle B. Ajustez le débit d'air comprimé à 0,45 $m^3 \cdot h^{-1}$. Au bout de 15 min, sortez les granulés ou les sphéroïdes de l'appareil en déconnectant le tube en U et pesez-les à nouveau ($m_2$). Examinez 3 échantillons et calculez la moyenne des valeurs obtenues. Il est recommandé de pulvériser un agent antistatique sur la paroi interne de l'appareil, toutes les 3 déterminations, afin d'empêcher la formation d'électricité statique.

*Perte à la dessiccation*. Sauf indication contraire, séchez à l'étuve à 105 °C. D'autres conditions de dessiccation décrites dans la méthode générale *2.2.32* peuvent également être utilisées.

**Calcul**

$$F = \frac{m_1\,(100 - T_1) - m_2\,(100 - T_2)}{m_1} \times 100$$

$F$ = friabilité,

$T_1$ = perte à la dessiccation avant l'essai, en pourcentage (moyenne de 2 déterminations),

$T_2$ = perte à la dessiccation après l'essai, en pourcentage (moyenne de 2 déterminations),

$m_1$ = masse des granulés ou des sphéroïdes avant l'essai, en grammes,

$m_2$ = masse des granulés ou des sphéroïdes après l'essai, en grammes.

PROCÉDÉ B

**Appareillage (appareil à oscillation)**. L'appareil (voir figure 2.9.41.-2) se compose d'un récipient de verre de 105 mL, dans lequel sont placés les granulés ou les sphéroïdes à examiner. Le récipient est soumis à des oscillations horizontales, dont la fréquence et la durée peuvent varier en continu. La fréquence peut être ajustée sur une échelle de 0-400 oscillations/min. La durée peut être réglée sur une valeur de 0-9999 s.

**Mode opératoire**. *Le mode opératoire suivant convient généralement.* Eliminez les particules fines par tamisage (tamis ayant une ouverture de maille de 355 µm ou tout autre tamis approprié). Dans le récipient de verre, pesez environ 10,00 g ($m_1$) de granulés ou de sphéroïdes. Installez le récipient dans l'appareil. Agitez pendant 240 s à la fréquence maximale pour les granulés ou les sphéroïdes durs, ou pendant 120 s à une fréquence plus faible (par exemple 140 oscillations/min) pour les granulés ou les sphéroïdes mous. Tamisez (355 µm, ou le même tamis que précédemment) et pesez à nouveau les granulés ou les sphéroïdes ($m_2$). Examinez 3 échantillons et calculez la moyenne des valeurs obtenues.

*Perte à la dessiccation*. Sauf indication contraire, séchez à l'étuve à 105 °C. D'autres conditions de dessiccation décrites dans la méthode générale *2.2.32* peuvent également être utilisées.

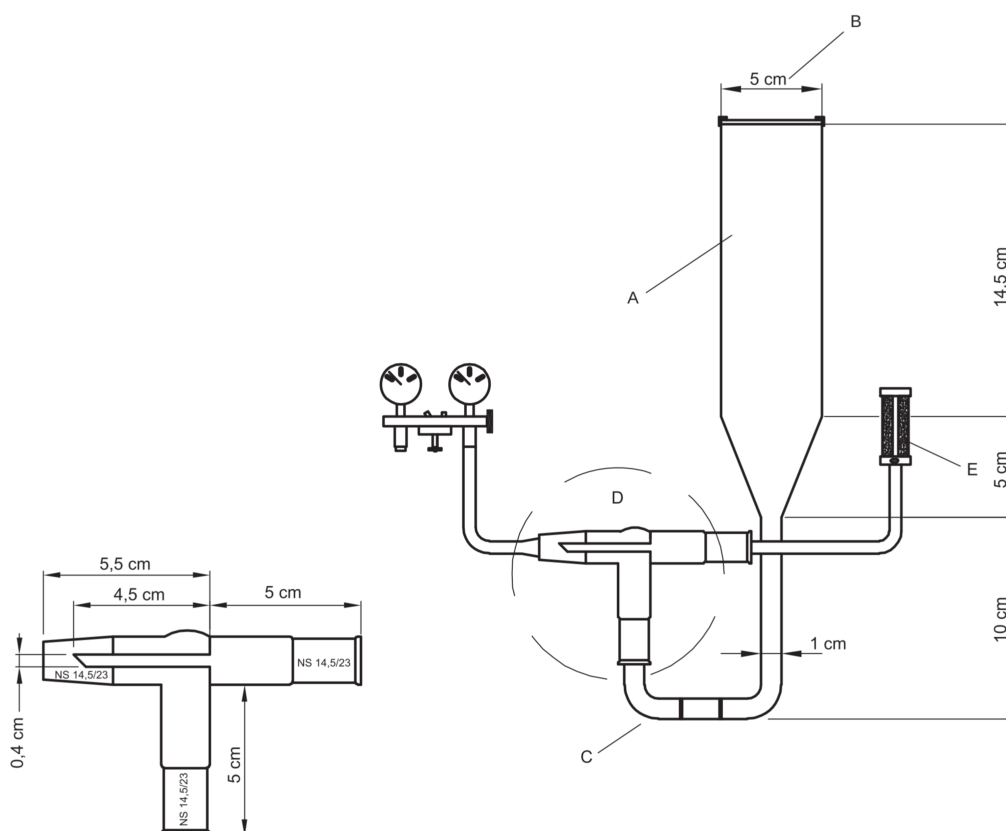
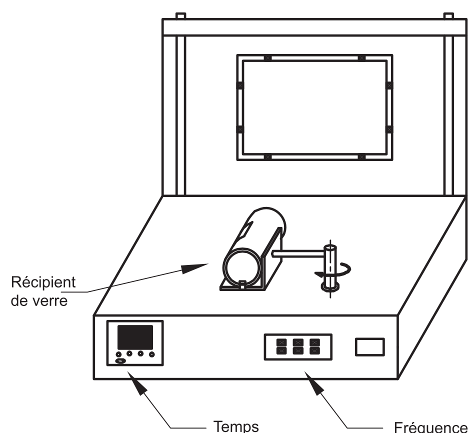



Figure 2.9.41.-1. – *Appareil à lit fluidisé*



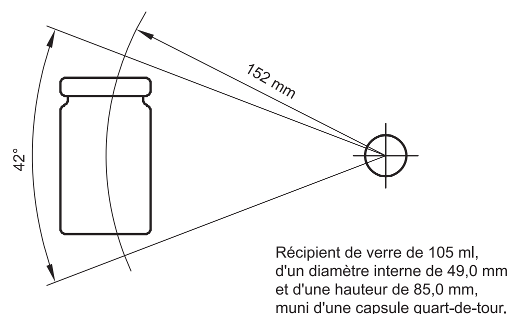




Figure 2.9.41.-2. – *Appareil à oscillation*

**Calcul**

$$F = \frac{m_1 (100 - T_1) - m_2 (100 - T_2)}{m_1} \times 100$$

$F$ = friabilité,

$T_1$ = perte à la dessiccation avant l'essai, en pourcentage (moyenne de 2 déterminations),

$T_2$ = perte à la dessiccation après l'essai, en pourcentage (moyenne de 2 déterminations),

$m_1$ = masse des granulés ou des sphéroïdes avant l'essai, en grammes,

$m_2$ = masse des granulés ou des sphéroïdes après l'essai, en grammes.

**01/2008:20942**

# 2.9.42. ESSAI DE DISSOLUTION DES FORMES SOLIDES LIPOPHILES

APPAREILLAGE

L'appareil (voir figure 2.9.42.-1) est constitué par :

– Un réservoir pour le milieu de dissolution.
– Une pompe qui fait remonter le milieu de dissolution à travers la cellule à flux continu.
– Une cellule à flux continu (figure 2.9.42.-2), plus spécialement destinée aux formes solides lipophiles telles que suppositoires, capsules molles. Elle se compose de 3 unités transparentes s'adaptant les unes aux autres. L'unité inférieure (1) est constituée de 2 chambres adjacentes communiquant par un système de trop plein.

Le milieu de dissolution traverse la chambre A en flux ascendant puis la chambre B en flux descendant. Le flux sort de la chambre B par un orifice de petit diamètre et remonte vers l'ensemble de filtration. L'unité médiane (2) forme une cavité destinée à retenir les excipients lipophiles qui surnagent à la surface du milieu de dissolution. Une grille métallique fait office de filtre grossier. L'unité supérieure (3) comporte un support pouvant recevoir des filtres de papier, de fibre de verre ou de cellulose.

– Un bain d'eau thermostaté qui permet de maintenir la température du milieu de dissolution constante à 37 ± 0,5 °C.

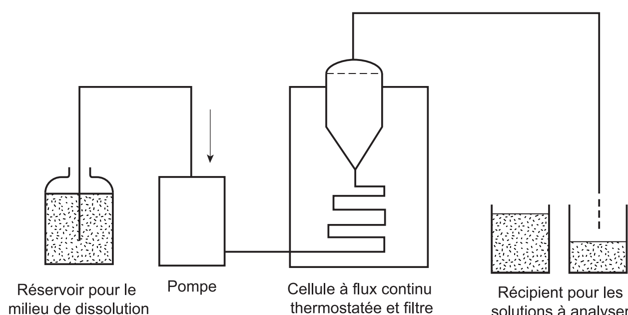



Figure 2.9.42.-1. – *Appareil à flux continu*

**Milieu de dissolution**. Si le milieu de dissolution est tamponné, ajustez son pH à ± 0,05 unité près de la valeur prescrite. Si des gaz sont dissous dans le milieu, ils peuvent former des bulles susceptibles de fausser les résultats ; éliminez-les avant l'essai.

MODE OPÉRATOIRE

Placez 1 unité de prise dans la chambre A. Fermez la cellule au moyen de l'ensemble de filtration, préalablement assemblé. Avant le début de l'essai, la chambre A doit être vidée de l'air par l'intermédiaire d'un petit orifice communiquant avec l'ensemble de filtration. Chauffez le milieu de dissolution à une température appropriée en tenant compte du point de fusion de la préparation. Au moyen d'une pompe adéquate, introduisez le milieu de dissolution chauffé par la partie inférieure de la cellule afin d'obtenir un flux continu approprié, en circuit ouvert ou fermé, dont le débit est contrôlé avec une précision de ± 5 pour cent. Lorsque le milieu de dissolution atteint le trop-plein, l'air contenu dans la chambre B est refoulé dans le tube capillaire et remplacé par le milieu de dissolution. La préparation se répartit dans le milieu de dissolution en fonction de ses propriétés physicochimiques.

Dans des cas exceptionnels et justifiés, pour les suppositoires de grand volume, l'essai peut être effectué sur un fragment représentatif.

ÉCHANTILLONNAGE ET ÉVALUATION

Le prélèvement se fait toujours à la sortie de la cellule que le circuit soit ouvert ou fermé.

Filtrez les prélèvements et procédez à l'analyse selon les indications données. Le filtre, d'une porosité appropriée, est inerte, ne retient pas de manière significative la substance active contenue dans la solution et ne contient aucune substance extractible par le milieu de dissolution qui influencerait les méthodes analytiques prescrites.

La quantité de substance active dissoute dans un temps prescrit est exprimée en pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

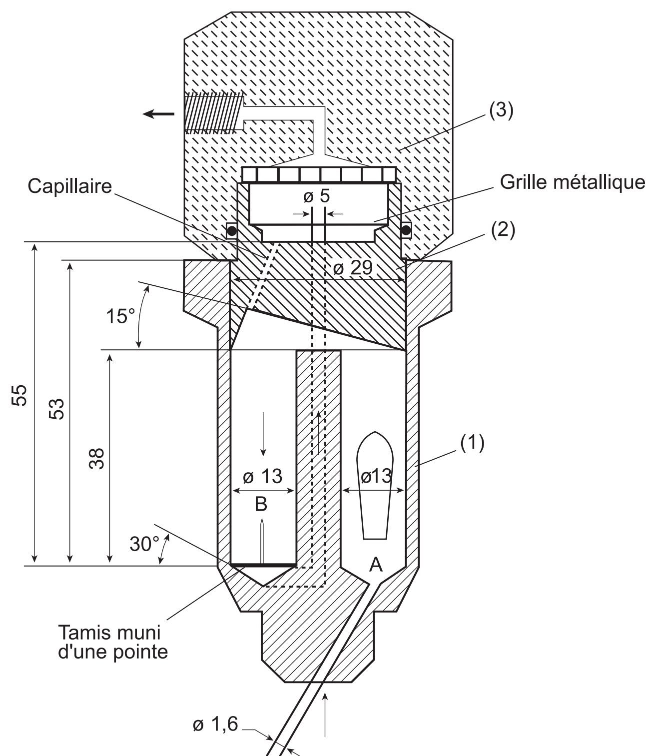



Figure 2.9.42.-2. – *Cellule à flux continu*

*Dimensions en millimètres*

**01/2008:20943**
**corrigé 6.1**

# 2.9.43. DISSOLUTION APPARENTE

Cette méthode est généralement utilisée pour déterminer la vitesse de dissolution apparente des substances solides pures. Elle peut également être utilisée pour la détermination de la vitesse de dissolution de substances actives dans des préparations présentées sous la forme de poudres ou de granulés.

## APPAREILLAGE

Toutes les parties de l'appareil qui peuvent entrer en contact avec l'échantillon ou avec le milieu de dissolution sont chimiquement inertes, n'adsorbent pas la substance à examiner, ne réagissent pas en sa présence et n'influencent pas son comportement. Aucun élément de l'appareil ni de l'assemblage dans lequel il est placé n'exerce de mouvement d'agitation ou de vibration important autre que celui du système à flux continu.

Il est préférable d'utiliser un appareil qui permette l'observation de l'échantillon.

L'appareil (voir figure 2.9.43.-1) est constitué par :

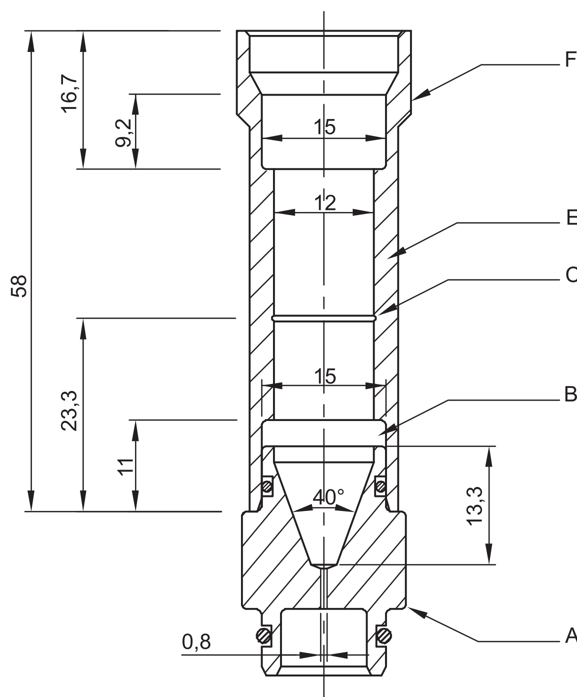
– un réservoir pour le milieu de dissolution ;

– une pompe qui fait remonter le milieu de dissolution à travers la cellule à flux continu ;

– une cellule à flux continu, en matériau de préférence transparent, montée verticalement et munie d'un dispositif de filtration pour la rétention des particules non dissoutes ;

– un bain d'eau thermostaté qui permet de maintenir le milieu de dissolution à la température choisie (généralement à 37 ± 0,5 °C).

La cellule à flux continu (voir figure 2.9.43.-2) se compose de 3 unités s'adaptant les unes aux autres. L'unité inférieure est surmontée par un système de grilles et de filtres sur lequel l'échantillon est déposé. L'unité médiane qui s'assemble sur l'unité inférieure comprend un insert qui permet le tamisage de l'échantillon lors du passage du milieu de dissolution. Cet insert est composé de 2 parties : un tamis de forme conique qui est déposé sur l'échantillon et un clip placé au milieu de l'unité médiane destiné à retenir le tamis lors de l'arrivée du milieu de dissolution. Un 2nd ensemble de filtration (grille et filtre) est placé en haut de l'unité médiane avant de placer l'unité supérieure par laquelle le milieu de dissolution sort de la cellule.




A. unité inférieure — B. tamis — C. clip — D. insert — E. unité médiane — F. unité supérieure

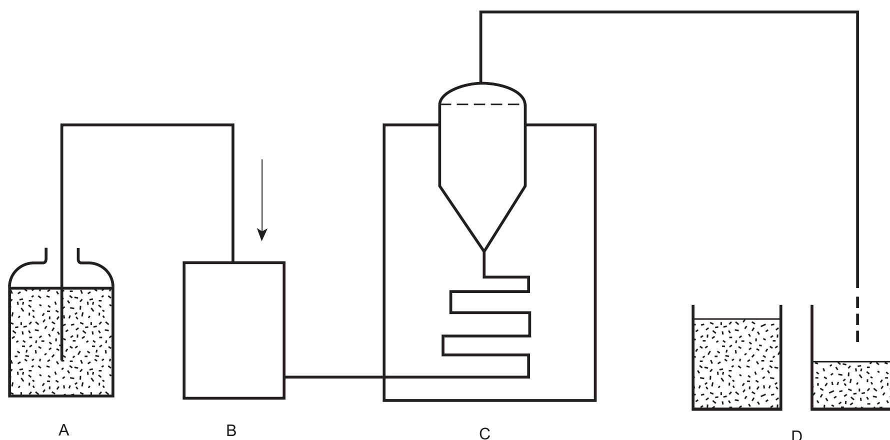
Figure 2.9.43.-2. – *Cellule à flux continu*
*Dimensions en millimètres*

## MILIEU DE DISSOLUTION

Si le milieu de dissolution est tamponné, ajustez son pH à ± 0,05 unité près. Si des gaz sont dissous dans le milieu, ils peuvent former des bulles susceptibles de fausser significativement les résultats ; éliminez-les avant l'essai.

## MODE OPÉRATOIRE

Placez une bille d'un diamètre de 5 ± 0,5 mm au fond du cône de l'unité inférieure et ensuite, des billes de verre de taille appropriée, de préférence d'un diamètre de 1 ± 0,1 mm. Placez alors un tamis (ouverture de maille 0,2 mm), un filtre approprié et un 2nd tamis sur l'unité inférieure. Pesez l'ensemble. Assemblez l'unité médiane sur l'unité inférieure. Placez l'échantillon sur le dispositif de filtration et pesez-le dans la cellule. Placez le tamis de l'insert, cône vers le haut, sur l'échantillon, puis positionnez le clip au milieu de la partie médiane. Placez de nouveau un tamis (ouverture de maille 0,2 mm) et un filtre approprié en haut de la partie médiane. Assemblez la partie supérieure. Chauffez le milieu de dissolution à la température choisie. Au moyen d'une pompe




A. réservoir pour le milieu de dissolution — B. pompe — C. cellule à flux continu thermostatée et filtre — D. récipient pour les solutions à analyser

Figure 2.9.43.-1. – *Appareil à flux continu*

adéquate, introduisez le milieu de dissolution, chauffé par la partie inférieure de la cellule afin d'obtenir un flux continu approprié, en circuit ouvert ou fermé, dont le débit est contrôlé avec une précision de ± 5 pour cent.

ÉCHANTILLONNAGE

Le prélèvement de milieu de dissolution se fait toujours à la sortie de la cellule que le circuit soit ouvert ou fermé.

Filtrez immédiatement les prélèvements. Le filtre, d'une porosité appropriée, est inerte, ne retient pas de manière significative les substances contenues dans la solution et ne contient aucune substance extractible par le milieu de dissolution qui influencerait les méthodes analytiques prescrites. Procédez à l'analyse du filtrat selon les indications données.

ÉVALUATION DES RÉSULTATS

Quand l'essai est réalisé en vue de la libération d'un lot, un nombre approprié d'essais est effectué.

Les résultats sont exprimés comme étant :

– la quantité de substance dissoute par unité de temps (si la dissolution se fait de manière linéaire),

**07/2009:20945**

## 2.9.45. MOUILLABILITÉ DES SOLIDES POREUX, NOTAMMENT DES POUDRES

INTRODUCTION

La mouillabilité des solides est généralement caractérisée par mesure (directe ou indirecte) de l'angle de contact. L'angle de contact solide/liquide θ est l'angle naturellement formé lorsqu'une goutte de liquide est placée sur une surface solide. Ce phénomène est représenté dans la figure 2.9.45.-1. Pour un liquide donné, les solides mouillables présentent un angle de contact faible, les solides non mouillables un angle de contact égal ou supérieur à 90°.

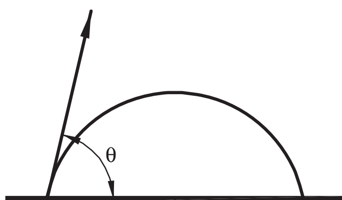



Figure 2.9.45.-1. – *Angle de contact θ d'une goutte posée sur une surface non poreuse*

Ce chapitre décrit 2 méthodes de détermination de la mouillabilité. Ces méthodes permettent de mesurer la mouillabilité de solides poreux tels que les poudres ou les granulés. Toutes deux utilisent, pour exprimer la mouillabilité, la mesure de l'angle de contact entre le solide poreux et un liquide donné.

La méthode de la goutte posée est basée sur la mesure directe de l'angle de contact entre un disque de poudre compactée et une goutte déposée sur ce disque.

La méthode de Washburn consiste en une mesure indirecte de l'angle de contact à partir de l'effet capillaire exercé par les pores de la poudre. Cet effet, qui se traduit par un gain de masse, est enregistré par une balance électronique spéciale à partir de l'instant où l'échantillon de poudre entre en contact avec la surface du liquide dans lequel l'échantillon ne se dissout de préférence pas ou faiblement. La mesure n'exerce qu'un effet minime ou nul sur l'état de l'échantillon.

La nécessité de soumettre l'échantillon à examiner à un prétraitement constitue un inconvénient, car ses propriétés peuvent se trouver significativement altérées. La compaction d'une poudre sous forme de disque, par exemple, réduit l'énergie libre de surface lorsque l'état cristallin de la poudre est modifié (par ex. formes métastables), ou peut au contraire accroître l'énergie libre de surface en créant des défauts cristallins (inconvénient de la méthode de la goutte posée puisque des disques de poudre compactée sont testés).

Ces méthodes sont généralement utilisées pour étudier des paramètres tels que :

– la reproductibilité d'échantillons d'un lot à l'autre, en termes de mouillabilité,
– l'effet de la viscosité d'un liquide sur la mouillabilité,
– l'effet de la tension superficielle d'un liquide sur la mouillabilité,
– la modification des propriétés de surface des échantillons.

MÉTHODE DE LA GOUTTE POSÉE

Cette méthode peut servir à caractériser directement la mouillabilité des enrobages et des formulations compactées telles que les comprimés. Par ailleurs, la même instrumentation peut parfois permettre des mesures dynamiques (angle de contact dynamique, voir figure 2.9.45.-2) sur des systèmes solide poreux/liquide lorsque l'angle de contact décroit. Il est possible, en prenant plusieurs mesures de l'angle de contact en fonction du temps, d'étudier la vitesse d'étalement qui accompagne la pénétration d'une gouttelette liquide dans un solide légèrement poreux.

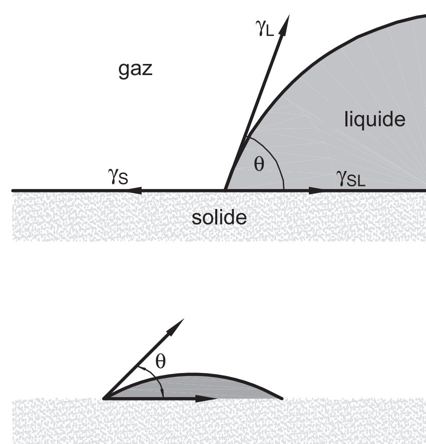



Figure 2.9.45.-2. – *Méthode de la goutte posée avec examen visuel de la goutte*

Dans des conditions d'équilibre, l'angle de contact d'une goutte posée dépend des 3 tensions superficielles impliquées et est déterminée par l'équation de Young (voir figure 2.9.45.-2, première partie).

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos\theta$$

$\gamma_S$ = tension superficielle solide/air,

$\gamma_{SL}$ = tension interfaciale solide/liquide,

$\gamma_L$ = tension superficielle liquide/air.

*MODE OPÉRATOIRE*

Les poudres étant incapables de former une surface totalement plane, il est habituel de les compacter sous forme de disque afin d'obtenir une surface plus lisse. Après dépôt d'une goutte de volume donné sur le disque (voir figure 2.9.45.-2), la mesure directe de l'angle de contact est possible à l'aide d'un goniomètre à rapporteur d'angle oculaire, ou par construction géométrique sur une microphotographie. D'autres procédés physiques et mathématiques d'analyse des données peuvent également convenir. Le volume de la goutte peut influer sur le résultat. Plusieurs déterminations de l'angle de contact θ (n = 6) sont généralement effectuées et la moyenne est calculée.

MÉTHODE DE WASHBURN

La méthode de Washburn permet de mesurer l'angle de contact de solides poreux lorsqu'il est compris entre 0° et 90°.

Le matériau examiné est la combinaison de l'échantillon, du porte-échantillon et de l'élément filtrant. Il est donc impossible d'obtenir une estimation ou détermination de la valeur vraie, et seules des valeurs apparentes de l'angle de contact peuvent être obtenues. Néanmoins, l'angle de contact de l'échantillon est la propriété fonctionnelle avec laquelle le résultat obtenu présente une corrélation significative. Le résultat de l'essai est une liste ordonnée de valeurs de mouillabilité obtenues pour différentes substances ou formulations à partir des angles de contact apparents.

*PRINCIPE*

Si un solide poreux est amené au contact d'un liquide, de telle sorte que le solide ne soit pas submergé par le liquide mais effleure juste sa surface, l'ascension du liquide dans les pores du solide par effet capillaire sera régie par les équations suivantes :

$$m^2 = \frac{t}{A} \quad (1)$$

$m$ = masse de liquide aspirée dans le solide,

$t$ = temps écoulé à partir de l'entrée en contact du solide avec le liquide,

$A$ = constante, fonction des propriétés du liquide et du solide à examiner, calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$A = \frac{\eta}{c \times \rho^2 \times \gamma \times \cos\theta} \quad (2)$$

$\eta$ = viscosité du liquide,

$\rho$ = masse volumique du liquide,

$\gamma$ = tension superficielle du liquide,

$\theta$ = angle de contact entre le solide et le liquide,

$c$ = constante du matériau, qui dépend de la texture poreuse du solide.

Les équations (1) et (2) conduisent à l'équation (3) :

$$\cos\theta = \frac{m^2}{t} \times \frac{\eta}{c \times \rho^2 \times \gamma} \quad (3)$$

La mise au point d'une détermination de Washburn nécessite d'utiliser un liquide de masse volumique $\rho$ , viscosité $\eta$ et tension superficielle $\gamma$ connues. Dans ces conditions, lorsque la masse de liquide qui monte dans le solide poreux est mesurée comme une fonction du temps (par exemple en prenant comme donnée expérimentale la vitesse de pénétration capillaire $\frac{m^2}{t}$), il subsiste 2 inconnues d'après l'équation (3) : l'angle de contact $\theta$ entre le liquide et le solide et la constante $c$ du solide.

**Détermination de la constante *c* du matériau**. La valeur de cette constante, pour un solide poreux et en considérant des pores cylindriques, est déterminée par l'équation suivante :

$$c = \frac{\pi^2 \times r^5 \times N^2}{2} \quad (4)$$

$r$ = rayon capillaire moyen au sein du solide poreux,

$N$ = nombre de capillaires par unité de volume.

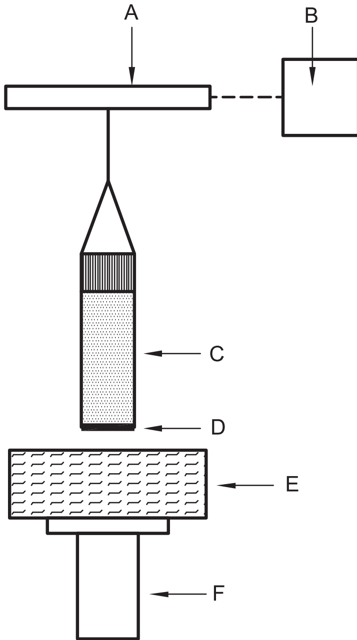
Si une détermination de Washburn est effectuée avec un liquide considéré comme formant avec le solide un angle de contact de 0° (cos 0° = 1), il ne reste plus dans l'équation (3) qu'une seule inconnue, la constante *c*, qu'il devient possible de déterminer. Le *n*-heptane est le liquide le mieux adapté à cette détermination, du fait de sa faible tension superficielle (20,14 $mN{\cdot}m^{-1}$ à 25 °C). Le *n*-hexane peut également être utilisé (18,43 $mN{\cdot}m^{-1}$ à 25 °C), mais il est plus volatil. Si la poudre se dissout trop rapidement dans ces liquides, ils peuvent être remplacés par de l'hexaméthyldisiloxane (15,9 $mN{\cdot}m^{-1}$ à 25 °C). Des déterminations répétées (n = 6) sont effectuées et la moyenne est calculée.

Une fois la constante *c* du solide déterminée, il est possible de soumettre un échantillon du solide à l'essai de mouillabilité avec un autre liquide. La valeur de *c* déterminée avec le *n*-heptane est introduite dans l'équation de Washburn en combinaison avec les données de vitesse de pénétration capillaire $\frac{m^2}{t}$ obtenues lors de l'essai effectué avec le liquide prescrit. Le calcul de l'angle de contact est alors possible.

NOTE : si l'on effectue des essais, sur un solide donné, avec une série de liquides (comportant au moins 2 liquides en plus de celui qui sert à déterminer la constante du matériau), les données d'angle de contact résultantes peuvent être utilisées pour calculer l'énergie de surface du solide poreux.

*APPAREILLAGE*

La figure 2.9.45.-3 représente le schéma de l'appareil. L'élément principal est une balance électronique associée à un processeur approprié qui assure l'obtention d'une résolution convenable à la fois pour les mesures de force et pour l'élévation du liquide d'essai vers l'échantillon.




A. balance électronique — B. ordinateur — C. porte-échantillon — D. filtre — E. liquide d'immersion — F. mécanisme élévateur

Figure 2.9.45.-3. – *Appareil de mesure de l'angle de contact par la méthode de Washburn*

Le tableau 2.9.45.-1 indique les valeurs généralement jugées appropriées pour les paramètres techniques de la balance.

Tableau 2.9.45.-1. – *Paramètres techniques de la balance électronique*

| | Elévation | Mesures de masse |
|---|---|---|
| Intervalle | > 110 mm | 0 - 210 g |
| Résolution | 0,1 µm | 10 µg |
| Vitesse | 0,099 - 500 mm/min | - |

**Porte-échantillon**. Le porte-échantillon peut être un petit cylindre de verre comportant à une extrémité un filtre de verre fritté.

Il peut également s'agir d'un cylindre en aluminium (voir figure 2.9.45.-4), moins fragile que le verre, percé à la base de petits orifices et donc plus facile à nettoyer que le filtre de verre fritté. Le couvercle de la cellule comporte 2 filetages, dont l'un sert à l'assembler à la chambre contenant l'échantillon et l'autre permet à l'utilisateur d'abaisser un piston pour compacter

l'échantillon. En-dehors du porte-échantillon, l'appareil est semblable à un tensiomètre automatique.

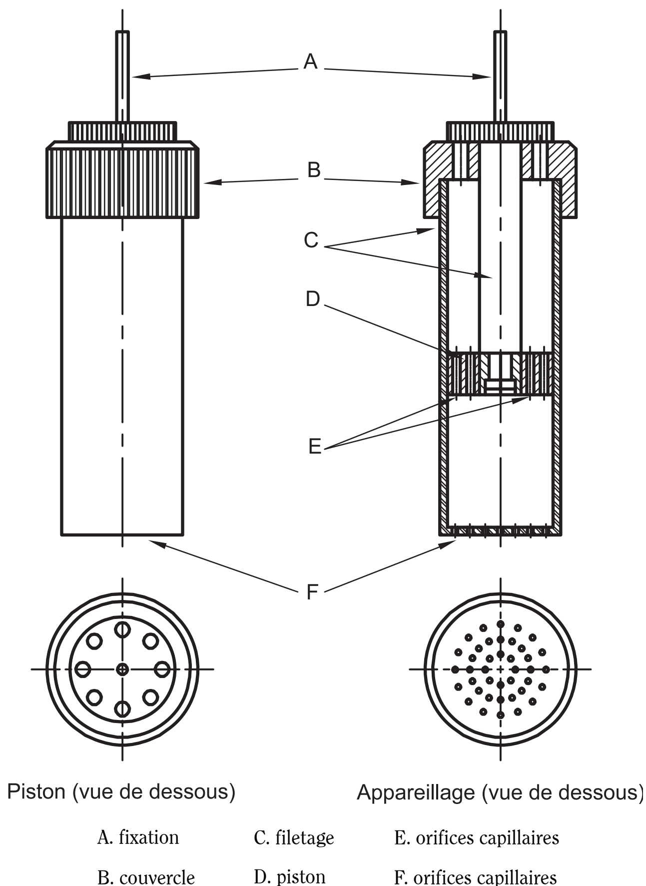



Figure 2.9.45.-4. – *Exemple de porte-échantillon avec piston pour la compaction des poudres*

*MODE OPÉRATOIRE*

**Remplissage du porte-échantillon**. Un disque de papier filtre est placé au fond du porte-échantillon de verre ou d'aluminium. Le filtre empêche la poudre de fuir par la base de la cellule. Il n'est pas obligatoirement en papier, mais doit être constitué d'un matériau facilement mouillable par le liquide d'essai. Les filtres utilisés pour l'osmose inverse sont recommandés du fait de leur porosité élevée et de leur très faible résistance à l'écoulement.

Une quantité connue de poudre est introduite dans la cellule. Lorsqu'une quantité de poudre suffisante et ajustée est compactée de façon uniforme (c'est-à-dire par tassement/compaction), la reproductibilité de la constante du matériau et de l'angle de contact dépend de l'aptitude à peser la même quantité de poudre pour chaque détermination.

Pour la plupart des poudres, une quantité de l'ordre de quelques grammes convient, ce qui représente normalement les 2/3 de la contenance du porte-échantillon. Un second disque de papier filtre est placé sur la poudre contenue dans la cellule. Il empêche la poudre de s'échapper par les orifices du piston au cours de la compaction et/ou de la détermination.

**Tassement/compaction de la poudre**. Etant très poreux, un lit de poudre en vrac est sensible à des influences même faibles, qui peuvent facilement modifier la porosité et par conséquent la constante *c*. Il peut donc être avantageux d'opérer sur de la poudre tassée, ce qui assure une meilleure reproductibilité des résultats. Il faut préalablement évaluer le nombre de chocs à appliquer (50-100 chocs conviennent en général).

Si l'on utilise le porte-échantillon en aluminium, il peut être monté dans le cylindre d'un volumètre destiné à la mesure de la masse volumique tassée, qui appliquera le nombre de chocs souhaité.

S'il n'est pas approprié de procéder par tassement, on peut compacter le lit de poudre en vissant le piston du porte-échantillon en aluminium et en appliquant une pression spécifique.

Il est également possible d'opérer par centrifugation dans des conditions définies ou encore, dans des cas appropriés, de monter l'échantillon de poudre directement sur la balance électronique sous la forme d'un disque compacté, sans porte-échantillon.

Après avoir connecté la balance, le solide poreux est placé dans le porte-échantillon et suspendu un peu au-dessus de la surface du liquide (voir figure 2.9.45.-3), à l'aide du mécanisme élévateur.

Le liquide est encore élevé jusqu'à ce qu'il entre juste en contact avec la base de l'échantillon poreux. On mesure alors la prise de masse, en fonction du temps, qui accompagne la montée du liquide dans le solide. Les données collectées peuvent être présentées sous la forme d'un graphique ou d'un tableau. L'appareil peut réaliser l'ensemble de la détermination de façon automatique.

*PARAMÈTRES CRITIQUES*

Une attention particulière doit être portée aux aspects suivants.

*Propriétés de l'échantillon* :

– teneur en eau,
– propriétés à l'état cristallin ou à l'état solide de l'échantillon (polymorphisme, type de solvate).

*Préparation de l'échantillon* :

– pour les mélanges, homogénéité du mélange,
– distribution granulométrique ; avant de procéder à l'essai, il est parfois recommandé de tamiser l'échantillon (par ex. sur un tamis de 250 µm),
– paramètres de compaction optimaux (quantité d'échantillon, nombre de chocs ou masse du piston),
– uniformité de l'état de compaction des différents échantillons de poudre,
– propreté du porte-échantillon ou, le cas échéant, du verre fritté (à nettoyer soigneusement),
– amélioration possible de l'uniformité des résultats grâce à l'utilisation d'un porte-échantillon en aluminium.

*Liquide d'immersion* :

– indication des spécifications du liquide d'immersion.

# 3. MATÉRIAUX UTILISÉS DANS LA FABRICATION DES RÉCIPIENTS ET RÉCIPIENTS

# 3.1. MATÉRIAUX UTILISÉS DANS LA FABRICATION DES RÉCIPIENTS

**01/2008:30100**

# 3.1. MATÉRIAUX UTILISÉS DANS LA FABRICATION DES RÉCIPIENTS

Les matériaux décrits dans ce chapitre sont utilisés pour fabriquer les récipients à usage pharmaceutique. Leur utilisation peut être recommandée pour la fabrication de tout ou partie d'objets destinés à un usage médico-chirurgical.

D'autres matériaux et polymères que ceux décrits par la Pharmacopée peuvent être employés, sous réserve de l'approbation, dans chaque cas, de l'autorité compétente responsable de la mise sur le marché de la préparation contenue dans le récipient.

**01/2008:30101**

## 3.1.1. MATÉRIAUX POUR RÉCIPIENTS DESTINÉS À CONTENIR LE SANG HUMAIN ET LES PRODUITS DU SANG

*NOTE : pour les matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) plastifié pour récipients destinés à contenir les solutions aqueuses pour perfusion intraveineuse, voir texte 3.1.14.*

Les récipients (ou poches) en matière plastique pour le prélèvement, la conservation, le traitement et l'administration du sang et de ses composants, peuvent être fabriqués à partir d'un ou de plusieurs polymères avec, le cas échéant, certains additifs.

Quand la composition des matériaux constituant tout ou partie de ces récipients correspond à celle d'un texte de la Pharmacopée, elle est contrôlée par les méthodes indiquées dans ces textes (voir *3.1.1.1. Matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) plastifié pour récipients destinés à contenir le sang humain*).

Dans les conditions normales d'utilisation, les matériaux et les récipients fabriqués avec ces matériaux ne cèdent pas de monomères ou autres substances en quantités susceptibles d'être nuisibles, ni n'entraînent de modifications anormales du sang ou des produits du sang.

**01/2008:90001**
**corrigé 7.0**

## 3.1.1.1. MATÉRIAUX À BASE DE POLY(CHLORURE DE VINYLE) PLASTIFIÉ POUR RÉCIPIENTS DESTINÉS À CONTENIR LE SANG HUMAIN ET LES PRODUITS DU SANG

DÉFINITION

Les matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) plastifié renferment au minimum 55 pour cent de poly(chlorure de vinyle) et des additifs variés, en plus du polymère de masse moléculaire élevée obtenu par polymérisation du chlorure de vinyle.

Les matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) plastifié pour récipients destinés à contenir le sang humain et les produits du sang sont définis par la nature et la proportion des composants entrant dans leur fabrication.

PRODUCTION

Les matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) plastifié sont produits par des méthodes de polymérisation permettant de garantir une teneur en chlorure de vinyle résiduel inférieure à 1 ppm. Le procédé de fabrication est validé de façon à démontrer que le produit satisfait à l'essai suivant.

**Chlorure de vinyle**. Chromatographie en phase gazeuse à espace de tête (*2.2.28*).

*Solution d'étalon interne*. Au moyen d'une microseringue, injectez 10 μL d'*éther R* dans 20,0 mL de *diméthylacétamide R* en plongeant l'extrémité de l'aiguille dans le solvant. Immédiatement avant l'emploi, diluez la solution à 1000 fois son volume avec du *diméthylacétamide R*.

*Solution à examiner*. Dans un flacon de 50 mL, introduisez 1,000 g du matériau à examiner et 10,0 mL de solution d'étalon interne. Bouchez et sertissez. Agitez la solution en évitant que le liquide entre en contact avec le bouchon et placez le flacon dans un bain-marie à 60 ± 1 °C pendant 2 h.

*Solution mère de chlorure de vinyle*. Préparez sous hotte ventilée. Dans un flacon de 50 mL, introduisez 50,0 mL de *diméthylacétamide R*, bouchez et sertissez, puis pesez l'ensemble à 0,1 mg près. Remplissez une seringue de 50 mL en polyéthylène ou polypropylène avec du *chlorure de vinyle R* gazeux ; laissez le gaz en contact avec la seringue pendant environ 3 min ; videz la seringue, puis remplissez-la à nouveau avec 50 mL de *chlorure de vinyle R* gazeux. Adaptez à la seringue une aiguille hypodermique et ramenez le volume de gaz contenu dans la seringue de 50 mL à 25 mL ; injectez lentement les 25 mL restant de chlorure de vinyle dans le flacon en agitant légèrement et en évitant tout contact entre l'aiguille et le liquide. Pesez à nouveau le flacon : l'augmentation de masse est d'environ 60 mg (1 μL de la solution ainsi obtenue contient une quantité de chlorure de vinyle d'environ 1,2 μg). Laissez reposer pendant 2 h. Conservez la solution mère au réfrigérateur.

*Solution étalon de chlorure de vinyle* : solution mère de chlorure de vinyle, *diméthylacétamide R* (1:3 *V/V*).

*Solutions de référence*. Introduisez 10,0 mL de solution d'étalon interne dans 6 flacons de 50 mL. Bouchez et sertissez. Dans 5 de ces flacons, injectez respectivement 1 μL, 2 μL, 3 μL, 5 μL et 10 μL de solution étalon de chlorure de vinyle. Les quantités de chlorure de vinyle contenues dans chacun des 6 flacons sont voisines respectivement de 0 μg, 0,3 μg, 0,6 μg, 0,9 μg, 1,5 μg et 3 μg. Agitez les solutions en évitant que le liquide entre en contact avec le bouchon et placez les flacons dans un bain-marie à 60 ± 1 °C pendant 2 h.

*Colonne* :
- *matériau* : acier inoxydable,
- *dimensions* : *l* = 3 m, Ø = 3 mm,
- *phase stationnaire* : *terre d'infusoires silanisée pour chromatographie en phase gazeuse R* imprégnée de 5 pour cent *m/m* de *diméthylstéarylamide R* et de 5 pour cent *m/m* de *macrogol 400 R*.

*Gaz vecteur* : *azote pour chromatographie R*.

*Débit* : 30 mL/min.

*Température* :
- *colonne* : 45 °C,
- *chambre à injection* : 100 °C,
- *détecteur* : 150 °C.

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 mL de l'espace de tête.

*Limite* :
- *chlorure de vinyle* : au maximum 1 ppm.

**Additifs**

Un certain nombre d'additifs sont ajoutés aux polymères de base afin d'optimiser leurs propriétés chimiques, physiques et mécaniques et ainsi de les adapter au mieux à l'usage qui en sera fait. Tous les additifs sont choisis dans la liste suivante, qui spécifie pour chaque produit la teneur maximale admise :
- phtalate de di(2-éthylhexyle) (additif pour plastique 01) : au maximum 40 pour cent,
- octanoate de zinc (2-éthylhexanoate de zinc) (additif pour plastique 02) : au maximum 1 pour cent,

– stéarate de calcium ou stéarate de zinc : au maximum 1 pour cent ou 1 pour cent de leur mélange,
– *N,N'*-diacyléthylènediamines (additif pour plastique 03) : au maximum 1 pour cent,
– une des 2 huiles époxydées suivantes : au maximum 10 pour cent ou 10 pour cent de leur mélange :
  – huile de soja époxydée (additif pour plastique 04) dont la teneur en oxygène oxirane est de 6 pour cent à 8 pour cent et dont l'indice d'iode est au maximum de 6,
  – huile de lin époxydée (additif pour plastique 05) dont la teneur en oxygène oxirane est au maximum de 10 pour cent et dont l'indice d'iode est au maximum de 7.

De très faibles quantités d'antioxydants ajoutés au monomère (chlorure de vinyle) peuvent être détectées dans le polymère.

Aucun additif antioxydant ne peut être ajouté au polymère.

Lorsqu'une substance colorante est ajoutée, seul le bleu outremer est accepté.

Le fournisseur du matériau doit pouvoir démontrer que la composition qualitative et quantitative retenue pour l'échantillon type est satisfaisante pour chaque lot de production.

## CARACTÈRES

Poudre, billes, granulés ou, après transformation, feuilles translucides d'épaisseur variable ou récipients, incolores ou jaune pâle, d'odeur faible. A la combustion, ils dégagent une épaisse fumée noire.

## IDENTIFICATION

*Découpez préalablement, si nécessaire, les échantillons de matériau à examiner en morceaux de 1 cm de côté au maximum.*

Chauffez à reflux 2,0 g de matériau à examiner avec 200 mL d'*éther exempt de peroxyde R* pendant 8 h. Séparez par filtration le résidu B et la solution A.

Evaporez à siccité la solution A sous pression réduite dans un bain-marie à 30 °C. Dissolvez le résidu dans 10 mL de *toluène R* (solution A1). Dissolvez le résidu B dans 60 mL de *chlorure d'éthylène R* en chauffant au bain-marie à reflux. Filtrez. Versez la solution obtenue, goutte à goutte et en agitant vigoureusement, dans 600 mL d'*heptane R* chauffé à une température voisine de son point d'ébullition. Séparez par filtration à chaud le coagulum B1 de la solution organique. Laissez refroidir cette dernière. Recueillez le précipité B2 qui se forme, sur un filtre de verre fritté (40) (*2.1.2*) préalablement taré.

A. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*).

   *Préparation*. Dissolvez le coagulum B1 dans 30 mL de *tétrahydrofurane R*, puis ajoutez par petits volumes et en agitant 40 mL d'*éthanol anhydre R*. Séparez le précipité B3 en filtrant et séchez sous vide sur du *pentoxyde de diphosphore R* à une température ne dépassant pas 50 °C. Dissolvez quelques milligrammes du précipité B3 dans 1 mL de *tétrahydrofurane R*. Déposez quelques gouttes de la solution sur une lame de chlorure de sodium et évaporez à siccité à l'étuve à 100-105 °C.

   *Comparaison* : *poly(chlorure de vinyle) SCR*.

B. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*).

   Examinez le résidu C obtenu dans l'essai des additifs pour plastique 01, 04 et 05.

   *Comparaison* : *additif pour plastique 01 SCR*.

## ESSAI

*Découpez préalablement, si nécessaire, les échantillons de matériau à examiner en morceaux de 1 cm de côté au maximum.*

**Solution S1**. Dans un matras à minéralisation, introduisez 5,0 g du matériau à examiner. Ajoutez 30 mL d'*acide sulfurique R* et chauffez jusqu'à obtention d'une masse sirupeuse noire. Refroidissez et ajoutez avec précaution 10 mL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R*. Chauffez modérément, laissez refroidir et ajoutez 1 mL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R*. Répétez en alternant l'évaporation et l'addition de solution de peroxyde d'hydrogène jusqu'à obtention d'un liquide incolore. Réduisez le volume à environ 10 mL, refroidissez et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution S2**. Dans un ballon de verre borosilicaté, introduisez 25 g du matériau à examiner. Ajoutez 500 mL d'*eau pour préparations injectables R* et recouvrez le col du ballon d'un vase de verre borosilicaté. Chauffez à l'autoclave à 121 ± 2 °C pendant 20 min. Laissez refroidir et prélevez la solution. Complétez le volume à 500 mL.

**Aspect de la solution S2**. La solution S2 est limpide (*2.2.1*) et incolore (*2.2.2, Procédé II*).

**Acidité ou alcalinité**. A 100 mL de solution S2, ajoutez 0,15 mL de *solution d'indicateurs BRP R*. Le virage de l'indicateur au bleu ne nécessite pas plus de 1,5 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*. A 100 mL de solution S2, ajoutez 0,2 mL de *solution de méthylorange R*. Le début du virage de l'indicateur du jaune à l'orange ne nécessite pas plus de 1,0 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M*.

**Absorbance** (*2.2.25*). Evaporez à siccité 100,0 mL de solution S2. Dissolvez le résidu dans 5,0 mL d'*hexane R*. De 250 nm à 310 nm, l'absorbance est au maximum de 0,25.

**Substances réductrices**. *Effectuez l'essai dans les 4 h qui suivent la préparation de la solution S2.* A 20,0 mL de solution S2, ajoutez 1 mL d'*acide sulfurique dilué R* et 20,0 mL de *permanganate de potassium 0,002 M*. Chauffez à reflux pendant 3 min et refroidissez immédiatement. Ajoutez 1 g d'*iodure de potassium R* et titrez immédiatement par le *thiosulfate de sodium 0,01 M* en présence de 0,25 mL de *solution d'amidon R*. Effectuez un titrage à blanc avec 20 mL d'*eau pour préparations injectables R*. La différence entre les volumes utilisés dans les 2 titrages est au maximum de 2,0 mL.

**Amines primaires aromatiques** : au maximum 20 ppm.

A 2,5 mL de solution A1 obtenue au cours de l'identification, ajoutez 6 mL d'*eau R* et 4 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M*. Agitez énergiquement et rejetez la phase supérieure. A la phase aqueuse, ajoutez 0,4 mL d'une solution récemment préparée de *nitrite de sodium R* à 10 g/L, mélangez et laissez reposer pendant 1 min. Ajoutez 0,8 mL d'une solution de *sulfamate d'ammonium R* à 25 g/L et laissez reposer pendant 1 min. Ajoutez 2 mL d'une solution de *dichlorhydrate de naphtyléthylènediamine R* à 5 g/L. Préparez un témoin dans les mêmes conditions en remplaçant la phase aqueuse par un mélange de 1 mL d'une solution de *naphtylamine R* à 0,01 g/L dans l'*acide chlorhydrique 0,1 M*, de 5 mL d'*eau R* et de 4 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M*. Après 30 min, si la solution présente une coloration, celle-ci n'est pas plus intense que celle du témoin.

**Additifs pour plastique 01, 04 et 05**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution témoins*. Préparez des solutions contenant 0,1 mg/mL respectivement d'*additif pour plastique 01 SCR*, d'*additif pour plastique 04 SCR* et d'*additif pour plastique 05 SCR* dans le *toluène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice* $GF_{254}$ *pour CCM R*.

*Phase mobile* : *toluène R*.

*Dépôt* : 0,5 mL de la solution A1 obtenue au cours de l'identification, en bande de 30 mm sur 3 mm et 5 µL de chaque solution témoin.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm. Repérez la bande correspondant à l'additif pour plastique 01 ($R_F$ = environ 0,4). Prélevez la bande de gel de silice correspondant à l'additif pour plastique 01 et agitez le prélèvement avec 40 mL d'*éther R* pendant 1 min. Filtrez, rincez 2 fois la silice avec 10 mL d'*éther R*, ajoutez au filtrat et évaporez à siccité. La masse du résidu C est au maximum de 40 mg.

*Détection B* : exposez la plaque aux vapeurs d'iode pendant 5 min.

Examinez le chromatogramme et repérez les bandes correspondant aux additifs pour plastique 04 et 05 ($R_F$ = 0). Prélevez la bande de gel de silice correspondante. Prélevez parallèlement une portion équivalente de gel de silice qui servira de blanc. Agitez séparément les 2 prélèvements avec 40 mL de *méthanol R* pendant 15 min. Filtrez, rincez 2 fois la silice avec 10 mL de *méthanol R*, joignez aux filtrats et évaporez à siccité. La différence de masse entre les 2 résidus est au maximum de 10 mg.

**Additif pour plastique 03**.

Lavez avec de l'*éthanol anhydre R* le précipité B2 obtenu au cours de l'identification et contenu dans le filtre de verre fritté (40) (*2.1.2*) préalablement taré. Séchez sur du *pentoxyde de diphosphore R* jusqu'à masse constante, puis pesez le filtre. La masse du résidu est au maximum de 20 mg.

Spectrophotométrie dans l'infrarouge (*2.2.24*).

*Préparation* : le résidu obtenu ci-dessus.

*Comparaison* : *additif pour plastique 03 SCR*.

**Baryum** : au maximum 5 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner*. Dans un creuset de silice, calcinez 1,0 g du matériau à examiner. Reprenez le résidu par 10 mL d'*acide chlorhydrique R* et évaporez au bain-marie à siccité. Reprenez le résidu par 20 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Solution témoin*. Solution à 0,25 ppm de baryum préparée par dilution de la *solution à 50 ppm de baryum (Ba) R* avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation du baryum située à 455,40 nm, le fond spectral étant évalué à 455,30 nm.

Vérifiez l'absence de baryum dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Cadmium** : au maximum 0,6 ppm.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner*. Evaporez à siccité 10 mL de solution S1. Reprenez le résidu par 5 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 1 pour cent *V/V*, filtrez et complétez à 10,0 mL avec la même solution d'acide.

*Solutions témoins*. Préparez les solutions témoins à partir de la *solution à 0,1 pour cent de cadmium (Cd) R* diluée avec une solution d'*acide chlorhydrique R* à 1 pour cent *V/V*.

*Source* : lampe à cathode creuse au cadmium.

*Longueur d'onde* : 228,8 nm.

*Dispositif d'atomisation* : flamme air-acétylène.

Vérifiez l'absence de cadmium dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Calcium** : au maximum 0,07 pour cent.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner*. Utilisez la solution à examiner préparée dans l'essai du baryum.

*Solution témoin*. Solution à 50,0 ppm de calcium préparée par dilution de la *solution à 400 ppm de calcium (Ca) R* avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation du calcium située à 315,89 nm, le fond spectral étant évalué à 315,60 nm.

Vérifiez l'absence de calcium dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Etain** : au maximum 20 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner*. Diluez 10 fois la solution S1 avec de l'*eau R*, immédiatement avant l'emploi.

*Solution témoin*. Dans une fiole jaugée de 50 mL contenant 5 mL d'une solution d'*acide sulfurique R* à 20 pour cent *V/V*, introduisez 2 mL de *solution à 5 ppm d'étain (Sn) R* et complétez à 50 mL avec de l'*eau R*, immédiatement avant l'emploi.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation de l'étain située à 189,99 nm, le fond spectral étant évalué à 190,10 nm.

Vérifiez l'absence d'étain dans l'acide sulfurique utilisé.

**Zinc** : au maximum 0,2 pour cent.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner*. Diluez 100 fois la solution S1 avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Solutions témoins*. Préparez les solutions témoins à partir de la *solution à 100 ppm de zinc (Zn) R* diluée avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Source* : lampe à cathode creuse au zinc.

*Longueur d'onde* : 213,9 nm.

*Dispositif d'atomisation* : flamme air-acétylène.

Vérifiez l'absence de zinc dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Métaux lourds** (*2.4.8*) : au maximum 50 ppm.

A 10 mL de solution S1, ajoutez 0,5 mL de *solution de phénolphtaléine R*, puis de la *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R* jusqu'à faible coloration rose. Complétez à 25 mL avec de l'*eau R*. 12 mL de solution satisfont à l'essai A. Préparez la solution témoin avec la *solution à 2 ppm de plomb (Pb) R*.

**Substances extractibles à l'eau** : au maximum 0,3 pour cent.

Evaporez au bain-marie à siccité 50 mL de solution S2. Desséchez à l'étuve 100-105 °C jusqu'à masse constante. Effectuez un essai à blanc avec 50,0 mL d'*eau pour préparations injectables R*. La masse du résidu est au maximum de 7,5 mg, en tenant compte de l'essai à blanc.

DOSAGE

Sur 50,0 mg du matériau à examiner, effectuez la combustion dans l'oxygène (*2.5.10*). Faites absorber les produits de combustion par 20 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M*. A la solution obtenue, ajoutez 1 mL de *phtalate de dibutyle R*, 2,5 mL d'*acide nitrique R*, 5 mL de *solution de sulfate ferrique et d'ammonium R2*, et 10,0 mL de *nitrate d'argent 0,1 M*. Titrez par le *thiocyanate d'ammonium 0,05 M* jusqu'à coloration jaune-rouge. Effectuez un titrage à blanc.

1 mL de *nitrate d'argent 0,1 M* correspond à 6,25 mg de poly(chlorure de vinyle).

*Les essais supplémentaires suivants sont effectués sur les récipients stériles et vides.*

**Solution S3**. Si le récipient à examiner contient une solution anticoagulante, rejetez la solution et lavez le récipient avec 250 mL d'*eau pour préparations injectables R* à 20 ± 1 °C et rejetez les produits de lavage avant préparation de la solution S3. Introduisez dans le récipient un volume d'*eau pour préparations injectables R* correspondant au volume de solution. Fermez le récipient et chauffez à l'autoclave de façon que la température du liquide soit maintenue à 110 °C pendant 30 min. Après refroidissement, remplissez le récipient d'*eau pour préparations injectables R* jusqu'à sa capacité nominale et homogénéisez.

**Solution de référence**. Dans un ballon de verre borosilicaté chauffez de l'*eau pour préparations injectables R* à l'autoclave à 110 °C pendant 30 min.

**Substances réductrices**. Immédiatement après la préparation de la solution S3, prélevez un volume correspondant à 8 pour cent du volume nominal du récipient et introduisez-le dans un ballon de verre borosilicaté. Préparez simultanément l'essai à blanc avec un volume égal de solution de référence récemment préparée dans un autre ballon de verre borosilicaté. A chacune des 2 solutions, ajoutez 20,0 mL de *permanganate de potassium 0,002 M* et 1 mL d'*acide sulfurique dilué R* et laissez reposer à l'abri de la lumière pendant 15 min. Ajoutez à chacune des 2 solutions 0,1 g d'*iodure de potassium R*. Laissez reposer à l'abri de la lumière pendant 5 min et titrez immédiatement par le *thiosulfate de sodium 0,01 M* en présence de 0,25 mL de *solution d'amidon R*. La différence entre les 2 titrages est au maximum de 2,0 mL.

**Acidité ou alcalinité**. Prélevez un volume de solution S3 correspondant à 4 pour cent de la capacité nominale du récipient. Ajoutez 0,1 mL de *solution de phénolphtaléine R*. La solution reste incolore. Ajoutez 0,4 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*. La solution est rose. Ajoutez 0,8 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M* et 0,1 mL de *solution de rouge de méthyle R*. La solution est rouge-orange ou rouge.

**Chlorures** (*2.4.4*) : au maximum 0,4 ppm, déterminé avec la solution S3. Préparez le témoin avec un mélange de 1,2 mL de *solution à 5 ppm de chlorure (Cl) R* et de 13,8 mL d'*eau R*.

**Ammonium** (*2.4.1, Procédé A*) : au maximum 2 ppm.

Prélevez 5 mL de solution S3 et complétez à 14 mL avec de l'*eau R*.

**Substances extractibles à l'eau**. Evaporez au bain-marie à siccité 100 mL de solution S3. Desséchez à l'étuve 100-105 °C jusqu'à masse constante. Effectuez un essai à blanc avec 100 mL de solution de référence. La masse du résidu de la solution S3 est au maximum de 3 mg, en tenant compte de l'essai à blanc.

**Absorbance** (*2.2.25*) : au maximum 0,30, déterminé sur toutes les longueurs d'onde entre 230 nm et 250 nm avec la solution S3 ; au maximum 0,10, déterminé à toutes les longueurs d'onde entre 251 nm et 360 nm avec la solution S3. Utilisez la solution de référence comme liquide de compensation.

**Additif pour plastique 01 extractible**. Utilisez comme solvant d'extraction de l'*éthanol à 96 pour cent R* dilué avec de l'*eau R* de façon à obtenir une densité (*2.2.5*) mesurée à l'aide d'un densimètre, de 0,9389 à 0,9395.

*Solution mère*. Dissolvez 0,100 g d'*additif pour plastique 01 SCR* dans le solvant d'extraction et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Solutions de référence*. Dans 5 fioles jaugées de 100 mL, introduisez respectivement 1,0 mL, 2,0 mL, 5,0 mL, 10,0 mL et 20,0 mL de solution mère et complétez à 100,0 mL avec le solvant d'extraction.

Mesurez les absorbances (*2.2.25*) des solutions de référence au maximum d'absorption à 272 nm, en utilisant le solvant d'extraction comme liquide de compensation et construisez la courbe des absorbances par rapport aux concentrations en additif pour plastique 01.

*Extraction*. Par la tubulure, et l'aiguille ou l'adaptateur, introduisez dans le récipient vide un volume égal à la moitié du volume nominal, de solvant d'extraction préalablement chauffé à 37 °C dans un ballon bien fermé. Chassez tout l'air du récipient et scellez la tubulure. Immergez le récipient ainsi rempli, en position horizontale, dans un bain-marie maintenu à 37 ± 1 °C pendant 60 ± 1 min sans agiter. Retirez le récipient du bain, retournez le doucement une dizaine de fois, puis transvasez le contenu dans une fiole de verre. Mesurez immédiatement l'absorbance au maximum d'absorption à 272 nm, en utilisant comme liquide de compensation le solvant d'extraction.

Déterminez, à l'aide de la courbe d'étalonnage, la concentration en additif pour plastique 01 en milligrammes par 100 mL d'extrait. La concentration est au maximum de :

– 10 mg par 100 mL pour les récipients d'un volume nominal supérieur à 300 mL mais inférieur à 500 mL,

– 13 mg par 100 mL pour les récipients d'un volume nominal supérieur à 150 mL mais inférieur à 300 mL,

– 14 mg par 100 mL pour les récipients d'un volume nominal maximal de 150 mL.

*Dans les cas où les récipients renferment une solution anticoagulante, cette solution est conforme à la monographie Solutions anticoagulantes et de conservation du sang humain (0209) et à l'essai suivant.*

**Absorbance** (*2.2.25*) : au maximum 0,5, en mesurant au maximum d'absorption à 280 nm.

Mesurez l'absorbance de la solution anticoagulante, extraite du récipient, de 250 nm à 350 nm en utilisant comme liquide de compensation une solution anticoagulante de même composition qui n'a pas été en contact avec une matière plastique.

**01/2008:90002**
**corrigé 7.0**

## 3.1.1.2. MATÉRIAUX À BASE DE POLY(CHLORURE DE VINYLE) PLASTIFIÉ POUR TUBULURES UTILISÉES DANS LES NÉCESSAIRES POUR TRANSFUSION DU SANG ET DES COMPOSANTS SANGUINS

DÉFINITION

*Teneur* : au minimum 55 pour cent de poly(chlorure de vinyle).

Le plastifiant utilisé est le phtalate de di(2-éthylhexyle) (additif pour plastique 01).

PRODUCTION

Les matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) plastifié sont produits par des méthodes de polymérisation permettant de garantir une teneur en chlorure de vinyle résiduel inférieure à 1 ppm. Le procédé de fabrication est validé de façon à démontrer que le produit satisfait à l'essai suivant.

**Chlorure de vinyle**. Chromatographie en phase gazeuse à espace de tête (*2.2.28*).

*Solution d'étalon interne*. Au moyen d'une microseringue, injectez 10 µL d'*éther R* dans 20,0 mL de *diméthylacétamide R* en plongeant l'extrémité de l'aiguille dans le solvant. Immédiatement avant l'emploi, diluez la solution à 1000 fois son volume avec du *diméthylacétamide R*.

*Solution à examiner*. Dans un flacon de 50 mL, introduisez 1,000 g du matériau à examiner et 10,0 mL de solution d'étalon interne. Bouchez et sertissez. Agitez la solution en évitant que le liquide n'entre en contact avec le bouchon et placez le flacon dans un bain-marie à 60 ± 1 °C pendant 2 h.

*Solution mère de chlorure de vinyle. Préparez sous hotte ventilée.* Dans un flacon de 50 mL, introduisez 50,0 mL de *diméthylacétamide R*, bouchez et sertissez, puis pesez l'ensemble à 0,1 mg près. Remplissez une seringue de 50 mL en polyéthylène ou polypropylène avec du *chlorure de vinyle R* gazeux ; laissez le gaz en contact avec la seringue pendant environ 3 min ; videz la seringue, puis remplissez-la à nouveau avec 50 mL de *chlorure de vinyle R* gazeux. Adaptez une aiguille hypodermique à la seringue et ramenez le volume de gaz contenu dans la seringue de 50 mL à 25 mL ; injectez lentement les 25 mL restant de chlorure de vinyle dans le flacon en agitant légèrement et en évitant le contact entre l'aiguille et le liquide. Pesez à nouveau le flacon : l'augmentation de masse est d'environ 60 mg (1 µL de la solution ainsi obtenue contient une quantité de chlorure de vinyle d'environ 1,2 µg). Laissez reposer pendant 2 h. Conservez la solution mère au réfrigérateur.

*Solution étalon de chlorure de vinyle* : solution mère de chlorure de vinyle, *diméthylacétamide R* (1:3 *V/V*).

*Solutions de référence*. Dans 6 flacons de 50 mL, introduisez 10,0 mL de solution d'étalon interne. Bouchez et sertissez. Dans 5 de ces flacons, injectez respectivement 1 µL, 2 µL, 3 µL, 5 µL et 10 µL de solution étalon de chlorure de vinyle. Les quantités de chlorure de vinyle contenues dans chacun des 6 flacons sont voisines respectivement de 0 µg, 0,3 µg, 0,6 µg, 0,9 µg, 1,5 µg et 3 µg. Agitez les solutions en évitant que le liquide n'entre en contact avec le bouchon et placez les flacons dans un bain-marie à 60 ± 1 °C pendant 2 h.

*Colonne* :
– *matériau* : acier inoxydable,
– *dimensions* : *l* = 3 m, Ø = 3 mm,
– *phase stationnaire* : *terre d'infusoires silanisée pour chromatographie en phase gazeuse R* imprégnée de 5 pour cent *m/m* de *diméthylstéarylamide R* et de 5 pour cent *m/m* de *macrogol 400 R*.

*Gaz vecteur* : *azote pour chromatographie R*.

*Débit* : 30 mL/min.

*Température* :
– *colonne* : 45 °C,
– *chambre à injection* : 100 °C,
– *détecteur* : 150 °C.

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 mL de l'espace de tête.

*Limite* :
– *chlorure de vinyle* : au maximum 1 ppm.

Le fournisseur du matériau doit pouvoir démontrer que la composition qualitative et quantitative retenue pour l'échantillon type est satisfaisante pour chaque lot de production.

CARACTÈRES

Poudre, billes, granulés ou, après transformation, tubes, pratiquement incolores à jaune pâle, d'odeur faible.

A la combustion, ils dégagent une épaisse fumée noire.

IDENTIFICATION

*Découpez préalablement, si nécessaire, les échantillons du matériau à examiner en morceaux de 1 cm de côté au maximum.*

A. A 0,5 g du matériau à examiner, ajoutez 30 mL de *tétrahydrofurane R*. Chauffez au bain-marie en agitant sous une hotte pendant 10 min. Le matériau se dissout complètement. Ajoutez du *méthanol R*, goutte à goutte, en agitant. Il se forme un précipité granuleux. Filtrez le précipité et séchez-le à 60 °C. Examinez le précipité par spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*). Dissolvez 50 mg de précipité dans 2 mL de *tétrahydrofurane R* et versez la solution sur une lame de verre de microscope. Faites sécher à l'étuve à 80 °C, séparez la pellicule de la lame et montez-la sur un support approprié. Examinez par spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*), en comparant avec le spectre obtenu avec le *poly(chlorure de vinyle) SCR*.

B. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*). Examinez le résidu obtenu dans l'essai de l'additif pour plastique 01.

*Comparaison* : *additif pour plastique 01 SCR*.

ESSAI

*Découpez préalablement, si nécessaire, les échantillons de matériau à examiner en morceaux de 1 cm de côté au maximum.*

**Solution S1**. Dans un matras à minéralisation, introduisez 5,0 g du matériau à examiner. Ajoutez 30 mL d'*acide sulfurique R* et chauffez jusqu'à obtention d'une masse sirupeuse noire. Refroidissez et ajoutez avec précaution 10 mL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R*. Chauffez modérément, laissez refroidir et ajoutez à nouveau 1 mL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R*. Répétez en alternant l'évaporation et l'addition de peroxyde d'hydrogène jusqu'à obtention d'un liquide incolore. Réduisez le volume à environ 10 mL, refroidissez et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution S2**. Dans un ballon de verre borosilicaté, introduisez 25 g du matériau à examiner. Ajoutez 500 mL d'*eau R* et recouvrez le col du ballon d'un vase de verre borosilicaté. Chauffez à l'autoclave à 121 ± 2 °C pendant 20 min. Laissez refroidir puis décantez la solution et complétez à 500 mL.

**Aspect de la solution S2**. La solution S2 est limpide (*2.2.1*) et incolore (*2.2.2, Procédé II*).

**Additif pour plastique 01**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Chauffez à reflux 2,0 g de matériau à examiner avec 200 mL d'*éther exempt de peroxyde R* pendant 8 h. Séparez par filtration le résidu et la solution et évaporez à siccité la solution sous pression réduite dans un bain-marie à 30 °C. Dissolvez le résidu dans 10 mL de *toluène R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 0,8 g d'*additif pour plastique 01 SCR* dans du *toluène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R*.

*Phase mobile* : *toluène R*.

*Dépôt* : 0,5 mL de solution à examiner et 5 μL de solution témoin, en bande de 30 mm sur 3 mm.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Limite* : repérez la bande correspondant à l'additif pour plastique 01. Prélevez la silice correspondant à cette bande et agitez avec 40 mL d'*éther R*. Filtrez sans perte et évaporez à siccité. La masse du résidu est au maximum de 40 mg.

**Baryum** : au maximum 5 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner*. Dans un creuset de silice, calcinez 1,0 g du matériau à examiner. Reprenez le résidu par 10 mL d'*acide chlorhydrique R* et évaporez au bain-marie à siccité. Reprenez le résidu par 20 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Solution témoin*. Solution à 0,25 ppm de baryum préparée par dilution de la *solution à 50 ppm de baryum (Ba) R* avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation du baryum située à 455,40 nm, le fond spectral étant évalué à 455,30 nm.

Vérifiez l'absence de baryum dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Cadmium** : au maximum 0,6 ppm.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner*. Evaporez à siccité 10,0 mL de solution S1. Reprenez le résidu par 5 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 1 pour cent *V/V*, filtrez et complétez à 10,0 mL avec la même solution acide.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 0,1 pour cent de cadmium (Cd) R* diluée avec une solution d'*acide chlorhydrique R* à 1 pour cent *V/V*.

*Source* : lampe à cathode creuse au cadmium.

*Longueur d'onde* : 228,8 nm.

*Dispositif d'atomisation* : flamme air-acétylène.

Vérifiez l'absence de cadmium dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Etain** : au maximum 20 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner*. Diluez 10 fois la solution S1 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

*Solution témoin*. Dans un fiole jaugée de 50 mL contenant 5 mL d'une solution d'*acide sulfurique R* à 20 pour cent *V/V*, introduisez 2 mL de *solution à 5 ppm d'étain (Sn) R* et complétez à 50 mL avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation de l'étain située à 189,99 nm, le fond spectral étant évalué à 190,10 nm.

Vérifiez l'absence d'étain dans l'acide sulfurique utilisé.

**Métaux lourds** (*2.4.8*) : au maximum 50 ppm.

A 10 mL de solution S1, ajoutez 0,5 mL de *solution de phénolphtaléine R*, puis de la *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R* jusqu'à faible coloration rose. Complétez à 25 mL avec de l'*eau R*. 12 mL de solution satisfont à l'essai A. Préparez la solution témoin avec la *solution à 2 ppm de plomb (Pb) R*.

DOSAGE

A 0,500 g du matériau à examiner, ajoutez 30 mL de *tétrahydrofurane R*. Chauffez au bain-marie en agitant sous une hotte pendant 10 min. Le matériau se dissout complètement. Ajoutez 60 mL de *méthanol R*, goutte à goutte, en agitant. Il se forme un précipité granuleux de poly(chlorure de vinyle). Laissez reposer pendant quelques minutes. Continuez l'addition de *méthanol R* jusqu'à précipitation complète. Transvasez sur un filtre en verre fritté (40) (*2.1.2*) en utilisant 3 petites quantités de *méthanol R* pour aider le transfert et pour laver le précipité. Desséchez le filtre et le précipité jusqu'à masse constante à 60 °C, puis pesez.

*Effectuez les essais supplémentaires suivants sur les nécessaires stérilisés.*

**Solution S3**. Réalisez un système de circulation en circuit fermé avec 3 nécessaires et un récipient de verre borosilicaté de 300 mL. Maintenez la température du liquide dans le récipient à 37 ± 1 °C à l'aide d'un dispositif approprié. Faites circuler 250 mL d'*eau pour préparations injectables R* dans le sens utilisé pour la transfusion à un débit de 1 L/h pendant 2 h (par exemple, au moyen d'une pompe péristaltique munie d'une tubulure de silicone-élastomère appropriée dont la longueur est la plus courte possible). Recueillez la totalité de la solution et laissez refroidir.

**Aspect de la solution**. La solution S3 est limpide (*2.2.1*) et incolore (*2.2.2, Procédé II*).

**Acidité ou alcalinité**. A 25 mL de solution S3, ajoutez 0,15 mL de *solution d'indicateurs BRP R* ; le virage de l'indicateur au bleu ne nécessite pas plus de 0,5 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*. A 25 mL de solution S3, ajoutez 0,2 mL de *solution de méthylorange R*. Le début de virage de l'indicateur du jaune à l'orange ne nécessite pas plus de 0,5 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M*.

**Absorbance** (*2.2.25*) : au maximum 0,30, déterminé à toutes les longueurs d'onde entre 230 nm et 250 nm avec la solution S3 ; au maximum 0,15, déterminé à toutes les longueurs d'onde entre 251 nm et 360 nm avec la solution S3.

**Substances réductrices**. Effectuez l'essai dans les 4 h qui suivent la préparation de la solution S3. A 20,0 mL de solution S3, ajoutez 1 mL d'*acide sulfurique dilué R* et 20,0 mL de *permanganate de potassium 0,002 M*. Portez à ébullition pendant 3 min et refroidissez immédiatement. Ajoutez 1 g d'*iodure de potassium R* et titrez par le *thiosulfate de sodium 0,01 M* en présence de 0,25 mL de *solution d'amidon R*. Effectuez un essai à blanc avec 20 mL d'*eau pour préparations injectables R*. La différence entre les volumes utilisés dans les 2 titrages est au maximum de 2,0 mL.

**Substances extractibles à l'eau**. Evaporez à siccité au bain-marie 50,0 mL de solution S3 et desséchez à l'étuve à 100-105 °C jusqu'à masse constante. Effectuez un essai à blanc avec 50,0 mL d'*eau pour préparations injectables R*. La masse du résidu de la solution S3 est au maximum de 1,5 mg compte tenu de l'essai à blanc.

**01/2008:30103**
**corrigé 7.0**

# 3.1.3. POLYOLÉFINES

DÉFINITION

Les polyoléfines sont obtenues par polymérisation de l'éthylène ou du propylène ou par copolymérisation de ces derniers avec au maximum 25 pour cent d'homologues supérieurs ($C_4$ à $C_{10}$), d'acides carboxyliques ou d'esters. Certains matériaux peuvent être des mélanges de polyoléfines.

PRODUCTION

Un certain nombre d'additifs sont ajoutés aux polymères de base afin d'optimiser leurs propriétés chimiques, physiques et mécaniques et ainsi de les adapter au mieux à l'usage qui en sera fait. Tous ces additifs sont choisis dans la liste ci-après, qui spécifie pour chaque produit la teneur maximale admise.

Les polyoléfines peuvent renfermer au plus 3 antioxydants, 1 ou plusieurs lubrifiants ou antibloquants ainsi que du dioxyde de titane comme opacifiant lorsque le matériau doit exercer un effet protecteur vis-à-vis de la lumière.

– butylhydroxytoluène (additif pour plastique 07) : au maximum 0,125 pour cent,
– tétrakis[3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphényl)propionate] de pentaérythrityle (additif pour plastique 09) : au maximum 0,3 pour cent,
– 1,3,5-tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl)-*S*-triazine-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-trione (additif pour plastique 13) : au maximum 0,3 pour cent,
– 3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphényl)propionate d'octadécyle (additif pour plastique 11) : au maximum 0,3 pour cent,
– bis[3,3-bis[3-(1,1-diméthyléthyl)-4-hydroxyphényl]butanoate] d'éthylène (additif pour plastique 08) : au maximum 0,3 pour cent,
– disulfure de dioctadécyle (additif pour plastique 15) : au maximum 0,3 pour cent,
– 4,4′,4″-(2,4,6-triméthylbenzène-1,3,5-triyltrisméthylène)tris[2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)phénol] (additif pour plastique 10) : au maximum 0,3 pour cent,
– 2,2′-bis(octadécyloxy)-5,5′-spirobi[1,3,2-dioxaphosphinane] (additif pour plastique 14) : au maximum 0,3 pour cent,
– 3,3′-thiodipropanoate de didodécyle (additif pour plastique 16) : au maximum 0,3 pour cent,
– 3,3′-thiodipropanoate de dioctadécyle (additif pour plastique 17) : au maximum 0,3 pour cent,
– phosphite de tris[2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)phényle] (additif pour plastique 12) : au maximum 0,3 pour cent,
– additif pour plastique 18 : au maximum 0,1 pour cent,
– copolymère de succinate de diméthyle et de (4-hydroxy-2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)éthanol (additif pour plastique 22) : au maximum 0,3 pour cent.

Le total des additifs antioxydants cités ci-dessus est au maximum de 0,3 pour cent.

– hydrotalcite : au maximum 0,5 pour cent,
– alcanamides : au maximum 0,5 pour cent,
– alcènamides : au maximum 0,5 pour cent,
– silicoaluminate de sodium : au maximum 0,5 pour cent,
– silice : au maximum 0,5 pour cent,
– benzoate de sodium : au maximum 0,5 pour cent,
– sels ou esters d'acides gras : au maximum 0,5 pour cent,
– phosphate trisodique : au maximum 0,5 pour cent,
– paraffine liquide : au maximum 0,5 pour cent,
– oxyde de zinc : au maximum 0,5 pour cent,
– talc : au maximum 0,5 pour cent,
– oxyde de magnésium : au maximum 0,2 pour cent,
– stéarate de calcium ou de zinc ou un mélange des deux : au maximum 0,5 pour cent,
– dioxyde de titane : au maximum 4 pour cent.

Le fournisseur du matériau devra pouvoir démontrer que la composition qualitative et quantitative retenue pour l'échantillon type est satisfaisante pour chaque lot de production.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre, billes, granulés ou, après transformation, feuilles d'épaisseur variable ou récipients.

*Solubilité* : pratiquement insolubles dans l'eau, solubles dans les hydrocarbures aromatiques chauds, pratiquement insolubles dans l'éthanol anhydre, dans l'hexane et dans le méthanol.

Elles se ramollissent à une température comprise entre 65 °C et 165 °C. Elles brûlent avec une flamme bleue.

IDENTIFICATION

*Découpez préalablement, si nécessaire, les échantillons du matériau à examiner en morceaux d'au maximum 1 cm de côté.*

A. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*).

*Préparation* : à 0,25 g du matériau à examiner, ajoutez 10 mL de *toluène R* et chauffez à reflux pendant environ 15 min. Déposez quelques gouttes de la solution obtenue sur une lame de chlorure de sodium et évaporez le solvant à l'étuve à 80 °C.

*Maximums d'absorption* : à 2920 $cm^{-1}$, 2850 $cm^{-1}$, 1475 $cm^{-1}$, 1465 $cm^{-1}$, 1380 $cm^{-1}$, 1170 $cm^{-1}$, 735 $cm^{-1}$ et 720 $cm^{-1}$.

Le spectre obtenu est identique au spectre obtenu avec le matériau sélectionné pour l'échantillon type. Lorsque le matériau à examiner est présenté en feuilles, l'identification peut être effectuée directement sur un fragment de dimensions convenables.

B. Le matériau à examiner satisfait aux essais complémentaires spécifiés pour la recherche des additifs présents.

C. Dans un creuset de platine, mélangez environ 20 mg du matériau à examiner et 1 g d'*hydrogénosulfate de potassium R*, puis chauffez jusqu'à fusion complète. Laissez refroidir. Ajoutez 20 mL d'*acide sulfurique dilué R*. Chauffez doucement. Filtrez la solution obtenue. Ajoutez au filtrat 1 mL d'*acide phosphorique R* et 1 mL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R*. Si le matériau est opacifié par le dioxyde de titane, il se développe une coloration jaune orange.

ESSAI

*Découpez préalablement, si nécessaire, les échantillons du matériau à examiner en morceaux d'au maximum 1 cm de côté.*

**Solution S1**. *Utilisez la solution S1 dans les 4 h qui suivent sa préparation.* Dans un ballon de verre borosilicaté à col rodé, introduisez 25 g du matériau à examiner. Ajoutez 500 mL d'*eau pour préparations injectables R* et chauffez à reflux pendant 5 h. Laissez refroidir et décantez la solution. Prélevez une partie de la solution pour l'essai de l'aspect de la solution S1. Filtrez le reste de la solution sur un filtre de verre fritté (16) (*2.1.2*).

**Solution S2**. Dans une fiole conique de verre borosilicaté à col rodé, introduisez 2,0 g du matériau à examiner. Ajoutez 80 mL de *toluène R* et chauffez à reflux en maintenant sous agitation constante pendant 90 min. Laissez refroidir à 60 °C et ajoutez, en maintenant l'agitation, 120 mL de *méthanol R*. Filtrez la solution sur un filtre de verre fritté (16) (*2.1.2*). Rincez la fiole et le filtre avec 25 mL d'un mélange de 40 mL de *toluène R* et de 60 mL de *méthanol R*, ajoutez les liquides de rinçage au filtrat et complétez à 250 mL avec le même mélange de solvants. Préparez une solution à blanc.

**Solution S3**. Dans une fiole conique de verre borosilicaté à col rodé, introduisez 100 g du matériau à examiner. Ajoutez 250 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* et chauffez à reflux pendant 1 h en maintenant sous agitation constante. Laissez refroidir et décanter la solution.

**Aspect de la solution S1**. La solution S1 est limpide (*2.2.1*) et incolore (*2.2.2, Procédé II*).

**Acidité ou alcalinité**. A 100 mL de solution S1, ajoutez 0,15 mL de *solution d'indicateurs BRP R*. Le virage de l'indicateur au bleu ne nécessite pas plus de 1,5 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*. A 100 mL de solution S1, ajoutez 0,2 mL de *solution de méthylorange R*. Le début de virage de l'indicateur du jaune à l'orange ne nécessite pas plus de 1 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M*.

**Absorbance** (*2.2.25*) : au maximum 0,2, déterminé à toutes les longueurs d'onde entre 220 nm et 340 nm avec la solution S1.

**Substances réductrices**. A 20 mL de solution S1, ajoutez 1 mL d'*acide sulfurique dilué R* et 20 mL de *permanganate de potassium 0,002 M*. Chauffez à reflux pendant 3 min et refroidissez immédiatement. Ajoutez 1 g d'*iodure de potassium R* et titrez immédiatement par le *thiosulfate de sodium 0,01 M* en présence de 0,25 mL de *solution d'amidon R*. Effectuez un titrage à blanc. La différence entre les volumes utilisés dans les 2 titrages est au maximum de 3,0 mL.

**Substances solubles dans l'hexane**. Dans une fiole conique de verre borosilicaté à col rodé de 250 mL, introduisez 10 g du matériau à examiner. Ajoutez 100 mL d'*hexane R* et chauffez à reflux en maintenant sous agitation constante pendant 4 h. Refroidissez dans l'eau glacée et filtrez rapidement (le temps de filtration doit rester inférieur à 5 min ; si nécessaire, augmentez la pression sur la solution pour accélérer la filtration) sur un filtre de verre fritté (16) (*2.1.2*) en maintenant la solution à environ 0 °C. Dans une capsule de verre borosilicaté tarée, évaporez au bain-marie 20 mL du filtrat. Desséchez le résidu à l'étuve à 100-105 °C pendant 1 h. La masse du résidu obtenu est égale, à 10 pour cent près, à la masse du résidu obtenu avec l'échantillon type et elle est au maximum de 5 pour cent.

**Aluminium extractible** : au maximum 1 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner*. Utilisez la solution S3.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 200 ppm d'aluminium (Al) R*, en la diluant avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation de l'aluminium située à 396,15 nm, le fond spectral étant évalué à 396,25 nm.

Vérifiez l'absence d'aluminium dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Titane extractible** : au maximum 1 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner*. Utilisez la solution S3.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 100 ppm de titane (Ti) R*, en la diluant avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation du titane située à 336,12 nm, le fond spectral étant évalué à 336,16 nm.

Vérifiez l'absence de titane dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Zinc extractible** : au maximum 1 ppm.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner*. Utilisez la solution S3.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 10 ppm de zinc (Zn) R*, en la diluant avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Source* : lampe à cathode creuse au zinc.

*Longueur d'onde* : 213,9 nm.

*Dispositif d'atomisation* : flamme air-acétylène.

Vérifiez l'absence de zinc dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Métaux lourds extractibles** (*2.4.8*) : au maximum 2,5 ppm.

Concentrez au bain-marie 50 mL de solution S3 et réduisez le volume à environ 5 mL. Complétez à 20,0 mL avec de l'*eau R*. 12 mL de solution satisfont à l'essai A. Préparez la solution témoin avec 2,5 mL de *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R*.

**Cendres sulfuriques** (*2.4.14*) : au maximum 1,0 pour cent, déterminé sur 5,0 g du matériau à examiner. Cette limite ne s'applique pas aux matériaux opacifiés avec du dioxyde de titane.

ESSAIS COMPLÉMENTAIRES

*Ces essais sont à effectuer, en totalité ou en partie, en tenant compte de la composition annoncée ou de l'utilisation du matériau.*

**Antioxydants phénoliques**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Mélange de solvants* : *acétonitrile R, tétrahydrofurane R* (50:50 *V/V*).

*Solution à examiner S21.* Evaporez à siccité 50 mL de solution S2, sous vide à 45 °C. Dissolvez le résidu d'évaporation dans 5,0 mL du mélange de solvants. Préparez une solution à blanc à partir de la solution à blanc correspondant à la solution S2.

*Solution à examiner S22.* Evaporez à siccité 50 mL de solution S2, sous vide à 45 °C. Dissolvez le résidu d'évaporation dans 5,0 mL de *chlorure de méthylène R*. Préparez une solution à blanc à partir de la solution à blanc correspondant à la solution S2.

*Solution à examiner S23.* Evaporez à siccité 50 mL de solution S2, sous vide à 45 °C. Dissolvez le résidu d'évaporation dans 5,0 mL d'un mélange à volumes égaux d'*acétonitrile R* et d'une solution de *tert-butylhydroperoxyde R* à 10 g/L dans du *tétrahydrofurane R*. Laissez reposer la solution dans un flacon scellé pendant 1 h. Préparez une solution à blanc à partir de la solution à blanc correspondant à la solution S2.

*Parmi les solutions témoins suivantes, préparez uniquement celles qui sont nécessaires à l'analyse des antioxydants phénoliques annoncés dans la composition du matériau à examiner.*

*Solution témoin (a).* Dissolvez 25,0 mg de *butylhydroxytoluène SCR* (additif pour plastique 07) et 60,0 mg d'*additif pour plastique 08 SCR* dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 09 SCR* et 60,0 mg d'*additif pour plastique 10 SCR* dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (c).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 11 SCR* et 60,0 mg d'*additif pour plastique 12 SCR* dans 10,0 mL de *chlorure de méthylène R*. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec du *chlorure de méthylène R*.

*Solution témoin (d).* Dissolvez 25,0 mg d'*additif pour plastique 07 SCR* dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (e).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 08 SCR* dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (f).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 13 SCR* dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (g).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 09 SCR* dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (h).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 10 SCR* dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (i).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 11 SCR* dans 10,0 mL de *chlorure de méthylène R*. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec du *chlorure de méthylène R*.

*Solution témoin (j).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 12 SCR* dans 10,0 mL de *chlorure de méthylène R*. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec du *chlorure de méthylène R*.

*Solution témoin (k).* Dissolvez 20,0 mg d'*additif pour plastique 18 SCR* dans 10,0 mL d'un mélange à volumes égaux d'*acétonitrile R* et d'une solution de *tert-butylhydroperoxyde R* à 10 g/L dans du *tétrahydrofurane R*. Laissez reposer la solution dans un flacon fermé pendant 1 h. Prélevez 2,0 mL de solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

A. Si le matériau à examiner contient l'additif pour plastique 07 et/ou l'additif pour plastique 08, procédez comme suit.

   *Colonne* :
   - *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
   - *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),

   *Phase mobile* : *eau R, acétonitrile R* (30:70 *V/V*).

   *Débit* : 2 mL/min.

   *Détection* : spectrophotomètre à 280 nm.

   *Injection* : 20 µL de solution à examiner S21, de solution à blanc correspondante, de solution témoin (a) et soit de solution témoin (d) ou (e), soit des solutions témoins (d) et (e).

   *Enregistrement* : 30 min.

   *Conformité du système* :
   - *résolution* : au minimum 8,0 entre les pics dus à l'additif pour plastique 07 et à l'additif pour plastique 08 dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),
   - le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S21 ne présente que les pics correspondant aux antioxydants annoncés dans la composition, ainsi que des pics mineurs décelés également dans le chromatogramme de la solution à blanc.

   *Limite* : la surface des pics du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S21 est inférieure à la surface des pics correspondants dans les chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins (d) et/ou (e).

B. Si le matériau à examiner contient un ou plusieurs des antioxydants suivants :
   - additif pour plastique 09,
   - additif pour plastique 10,
   - additif pour plastique 11,
   - additif pour plastique 12,
   - additif pour plastique 13,

   procédez comme décrit précédemment avec les modifications suivantes.

   *Phase mobile* : *eau R, tétrahydrofurane R, acétonitrile R* (10:30:60 *V/V/V*).

   *Débit* : 1,5 mL/min.

   *Injection* : 20 µL de solution à examiner S21, de solution à blanc correspondante, de solution témoin (b) et des solutions témoins des antioxydants de la liste ci-dessus annoncés dans la composition.

   *Conformité du système* :
   - *résolution* : au minimum 2,0 entre les pics dus à l'additif pour plastique 09 et à l'additif pour plastique 10 dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b),
   - le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S21 ne présente que les pics correspondant aux antioxydants annoncés dans la composition, ainsi que des pics mineurs décelés également dans le chromatogramme de la solution à blanc.

   *Limite* : la surface des pics du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S21 est inférieure à la surface des pics correspondants dans les chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins des antioxydants de la liste ci-dessus annoncés dans la composition.

C. Si le matériau à examiner contient l'additif pour plastique 11 et/ou l'additif pour plastique 12, procédez comme décrit pour les matériaux contenant l'additif pour plastique 07 et/ou l'additif pour plastique 08 avec les modifications suivantes.

*Phase mobile* : *eau R, 2-propanol R, méthanol R* (5:45:50 *V/V/V*).

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Injection* : 20 μL de solution à examiner S22, de solution à blanc correspondante, de solution témoin (c) et soit de solution témoin (i) ou (j), soit des solutions témoins (i) et (j).

*Conformité du système* :

– *résolution* : au minimum 2,0 entre les pics dus à l'additif pour plastique 11 et à l'additif pour plastique 12 dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c),
– le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S22 ne présente que les pics correspondant aux antioxydants annoncés dans la composition, ainsi que des pics mineurs décelés également dans le chromatogramme de la solution à blanc.

*Limite* : la surface des pics du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S22 est inférieure à la surface des pics correspondants dans les chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins (i) et/ou (j).

D. Si le matériau à examiner contient l'additif pour plastique 18, procédez comme décrit pour les matériaux contenant l'additif pour plastique 07 et/ou l'additif pour plastique 08 avec les modifications suivantes.

*Phase mobile* : *tétrahydrofurane R, acétonitrile R* (20:80 *V/V*).

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 270 nm.

*Injection* : 20 μL de solution à examiner S23, de solution à blanc correspondante et de solution témoin (k).

*Conformité du système* :

– *résolution* : au minimum 6,0 entre les 2 pics principaux (temps de rétention approximatifs de 3,5 et 5,8) dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (k),
– le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S23 ne présente que les pics correspondant aux antioxydants annoncés dans la composition, ainsi que des pics mineurs décelés également dans le chromatogramme de la solution à blanc.

*Limite* : la surface des pics du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S23 est inférieure à la surface des pics correspondants dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin (k).

**Antioxydants non phénoliques**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner S24.* Evaporez à siccité 100 mL de la solution S2, sous vide à 45 °C. Dissolvez le résidu d'évaporation dans 2 mL de *chlorure de méthylène acidifié R*.

*Solution témoin (l).* Dissolvez 60 mg d'*additif pour plastique 14 SCR* dans 10 mL de *chlorure de méthylène R*. Prélevez 2 mL de cette solution et complétez à 10 mL avec du *chlorure de méthylène acidifié R*.

*Solution témoin (m).* Dissolvez 60 mg d'*additif pour plastique 15 SCR* dans 10 mL de *chlorure de méthylène R*. Prélevez 2 mL de cette solution et complétez à 10 mL avec du *chlorure de méthylène acidifié R*.

*Solution témoin (n).* Dissolvez 60 mg d'*additif pour plastique 16 SCR* dans 10 mL de *chlorure de méthylène R*. Prélevez 2 mL de cette solution et complétez à 10 mL avec du *chlorure de méthylène acidifié R*.

*Solution témoin (o).* Dissolvez 60 mg d'*additif pour plastique 17 SCR* dans 10 mL de *chlorure de méthylène R*. Prélevez 2 mL de cette solution et complétez à 10 mL avec du *chlorure de méthylène acidifié R*.

*Solution témoin (p).* Dissolvez 60 mg d'*additif pour plastique 16 SCR* et 60 mg d'*additif pour plastique 17 SCR* dans 10 mL de *chlorure de méthylène R*. Prélevez 2 mL de cette solution et complétez à 10 mL avec du *chlorure de méthylène acidifié R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $GF_{254}$ pour CCM R*.

*Phase mobile A* : *hexane R*.

*Phase mobile B* : *chlorure de méthylène R*.

*Dépôt* : 20 μL de solution à examiner S24, de solution témoin (p) et des solutions témoins correspondant à tous les antioxydants phénoliques ou non phénoliques annoncés dans la composition type du matériau examiné.

*Développement* : sur un parcours de 18 cm avec la phase mobile A.

*Séchage A* : à l'air.

*Développement B* : sur un parcours de 17 cm avec la phase mobile B.

*Séchage B* : à l'air.

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm ; pulvérisez de la *solution alcoolique d'iode R* et examinez en lumière ultraviolette à 254 nm après 10-15 min.

*Conformité du système* : solution témoin (p) :

– le chromatogramme présente 2 taches nettement séparées.

*Limite* : s'il apparaît des taches dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S24, aucune d'entre elles n'est plus intense que les taches situées aux positions correspondantes dans les chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins.

**Additif pour plastique 22**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Evaporez à siccité 25 mL de la solution S2, sous vide à 45 °C. Dissolvez le résidu dans un mélange de 10 mL de *toluène R* et de 10 mL de solution d'*hydroxyde de tétrabutylammonium R* à 10 g/L dans un mélange de 35 volumes de *toluène R* et de 65 volumes d'*éthanol anhydre R*. Chauffez à reflux pendant 3 h. Laissez refroidir et filtrez si nécessaire.

*Solution témoin.* Dissolvez 30 mg d'*additif pour plastique 22 SCR* dans 50 mL de *toluène R*. Ajoutez 1 mL de cette solution à 25 mL de solution à blanc S2. Evaporez à siccité sous vide à 45 °C. Dissolvez le résidu dans un mélange de 10 mL de *toluène R* et de 10 mL de solution d'*hydroxyde de tétrabutylammonium R* à 10 g/L dans un mélange de 35 volumes de *toluène R* et de 65 volumes d'*éthanol anhydre R*. Chauffez à reflux pendant 3 h. Laissez refroidir et filtrez si nécessaire.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice aminopropylsilylé pour chromatographie R* (5 μm),

*Phase mobile* : *éthanol anhydre R, hexane R* (11:89 *V/V*).

*Débit* : 2 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 227 nm.

*Injection* : 20 μL.

*Enregistrement* : 10 min.

*Conformité du système* :

– *résolution* : au minimum 7 entre les pics dus au composé « diol » et au solvant de dilution de la solution témoin.

*Limite* : la surface du pic dû au composé "diol" issu de l'additif pour plastique 22 dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est inférieure à la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

**Amides et stéarates**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Utilisez la solution à examiner S24 de l'essai des antioxydants non phénoliques.

*Solution témoin (q).* Dissolvez 20 mg d'acide stéarique (*additif pour plastique 19 SCR*) dans 10 mL de *chlorure de méthylène R*.

*Solution témoin (r).* Dissolvez 40 mg d'oléamide (*additif pour plastique 20 SCR*) dans 20 mL de *chlorure de méthylène R*.

*Solution témoin (s).* Dissolvez 40 mg d'érucamide (*additif pour plastique 21 SCR*) dans 20 mL de *chlorure de méthylène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $GF_{254}$ pour CCM R* (2 plaques).

A. *Phase mobile* : *éthanol anhydre R, triméthylpentane R* (25:75 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL de solution à examiner S24, et de solution témoin (q).

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution de *sel sodique de dichlorophénolindophénol R* à 2 g/L dans l'*éthanol anhydre R* ; chauffez à l'étuve à 120 °C pendant quelques minutes pour intensifier les taches.

*Limite* : s'il apparaît une tache correspondant à l'additif pour plastique 19 dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S24, elle est semblable quant à sa position ($R_F$ = environ 0,5) mais elle n'est pas plus intense que la tache du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (q).

B. *Phase mobile A* : *hexane R*.

*Phase mobile B* : *méthanol R, chlorure de méthylène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL de solution à examiner S24 et des solutions témoins (r) et (s).

*Développement A* : sur un parcours de 13 cm avec la phase mobile A.

*Séchage A* : à l'air.

*Développement B* : sur un parcours de 10 cm avec la phase mobile B.

*Séchage B* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution d'*acide phosphomolybdique R* à 40 g/L dans l'*éthanol anhydre R* ; chauffez à l'étuve à 120 °C jusqu'à apparition des taches.

*Limite* : s'il apparaît des taches correspondant à l'additif pour plastique 20 ou à l'additif pour plastique 21 dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S24, elles sont semblables quant à leur position ($R_F$ = environ 0,2) mais elles ne sont pas plus intenses que les taches des chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins (r) et (s).

**01/2008:30104**
**corrigé 6.0**

# 3.1.4. POLYÉTHYLÈNE SANS ADDITIF POUR RÉCIPIENTS DESTINÉS AUX PRÉPARATIONS PARENTÉRALES ET AUX PRÉPARATIONS OPHTALMIQUES

DÉFINITION

Le polyéthylène sans additif est obtenu par polymérisation de l'éthylène sous haute pression, en présence d'oxygène ou d'initiateurs générateurs de radicaux libres comme catalyseurs.

CARACTÈRES

*Aspect* : billes, granulés, poudre ou, après transformation, feuilles translucides d'épaisseur variable ou récipients.

*Solubilité* : pratiquement insoluble dans l'eau, soluble à chaud dans les hydrocarbures aromatiques, pratiquement insoluble dans l'éthanol anhydre, dans l'hexane et dans le méthanol.

Le matériau à examiner se ramollit à partir de 65 °C.

*Densité* : 0,910 à 0,937.

IDENTIFICATION

*Découpez préalablement, si nécessaire, les échantillons du matériau à examiner en morceaux d'au maximum 1 cm de côté.*

A. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*).

*Préparation* : chauffez à reflux 0,25 g du matériau à examiner avec 10 mL de *toluène R* pendant environ 15 min. Déposez quelques gouttes de la solution sur une pastille de chlorure de sodium et évaporez le solvant à l'étuve à 80 °C.

*Maximums d'absorption* : 2920 $cm^{-1}$, 2850 $cm^{-1}$, 1465 $cm^{-1}$, 730 $cm^{-1}$ et 720 $cm^{-1}$.

Le spectre obtenu est identique au spectre du matériau sélectionné pour l'échantillon type. Lorsque le matériau est présenté en feuilles, l'identification peut être effectuée directement sur un fragment de dimension appropriée.

B. Additifs (voir Essai).

ESSAI

*Découpez préalablement, si nécessaire, les échantillons du matériau à examiner en morceaux d'au maximum 1 cm de côté.*

**Solution S1**. Dans un ballon de verre borosilicaté à col rodé, introduisez 25 g du matériau à examiner. Ajoutez 500 mL d'*eau pour préparations injectables R* et chauffez à reflux pendant 5 h. Laissez refroidir et décantez la solution. Prélevez une partie de la solution pour l'essai de l'aspect de la solution. Filtrez le reste de la solution sur un filtre de verre fritté (16) (*2.1.2*). *Utilisez la solution S1 dans les 4 h qui suivent sa préparation*.

**Solution S2**. Dans une fiole conique de verre borosilicaté à col rodé, introduisez 2,0 g de matériau à examiner. Ajoutez 80 mL de *toluène R* et chauffez à reflux en maintenant une agitation constante pendant 1 h 30 min. Laissez refroidir à 60 °C et ajoutez, en maintenant l'agitation, 120 mL de *méthanol R*. Filtrez la solution sur un filtre de verre fritté (16) (*2.1.2*). Rincez la fiole et le filtre avec 25 mL d'un mélange de 40 mL de *toluène R* et de 60 mL de *méthanol R*, ajoutez les liquides de rinçage au filtrat et complétez à 250 mL avec le même mélange de solvants. Préparez une solution à blanc.

**Solution S3**. Dans une fiole conique de verre borosilicaté à col rodé, introduisez 100 g de matériau à examiner. Ajoutez 250 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* et chauffez à reflux pendant 1 h en maintenant une agitation constante. Laissez refroidir et décanter la solution.

**Aspect de la solution**. La solution S1 est limpide (*2.2.1*) et incolore (*2.2.2, Procédé II*).

**Acidité ou alcalinité**. A 100 mL de solution S1, ajoutez 0,15 mL de *solution d'indicateurs BRP R*. Le virage de l'indicateur au bleu ne nécessite pas plus de 1,5 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*. A 100 mL de solution S1, ajoutez 0,2 mL de *solution de méthylorange R*. Le début du virage de l'indicateur du jaune à l'orange ne nécessite pas plus de 1,0 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M*.

**Absorbance** (*2.2.25*) : au maximum 0,2, déterminé à toutes les longueurs d'onde entre 220 nm et 340 nm avec la solution S1.

**Substances réductrices**. A 20 mL de solution S1, ajoutez 1 mL d'*acide sulfurique dilué R* et 20 mL de *permanganate de potassium 0,002 M*. Chauffez à reflux pendant 3 min et refroidissez immédiatement. Ajoutez 1 g d'*iodure de potassium R* et titrez immédiatement par le *thiosulfate de sodium 0,01 M* en présence de 0,25 mL de *solution d'amidon R*. Effectuez un titrage à blanc. La différence entre les volumes utilisés pour les 2 titrages est au maximum de 0,5 mL.

**Substances solubles dans l'hexane**. Dans une fiole conique de verre borosilicaté à col rodé de 250 mL, introduisez 10 g du matériau à examiner. Ajoutez 100 mL d'*hexane R* et chauffez à reflux en maintenant sous agitation constante pendant 4 h. Refroidissez dans l'eau glacée et filtrez rapidement à travers un filtre de verre fritté (16) (*2.1.2*) en maintenant la solution à 0 °C (le temps de filtration doit rester inférieur à 5 min ; si nécessaire, augmentez la pression sur la solution pour accélérer la filtration). Dans une capsule de verre borosilicaté tarée, évaporez au bain-marie 20 mL du filtrat. Desséchez le résidu à l'étuve à 100-105 °C pendant 1 h. La masse du résidu obtenu est égale, à 10 pour cent près, à la masse du résidu obtenu avec l'échantillon type et elle est au maximum de 5 pour cent.

**Additifs**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Evaporez à siccité 50 mL de la solution S2, sous vide à 45 °C. Dissolvez le résidu d'évaporation dans 5 mL de *chlorure de méthylène R*. Préparez une solution à blanc à partir de la solution à blanc correspondant à la solution S2.

*Solution témoin*. Dissolvez 20 mg d'*additif pour plastique 15 SCR* et 20 mg de d'*additif pour plastique 08 SCR* dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R*.

*Phase mobile A* : *hexane R*.

*Phase mobile B* : *méthanol R, chlorure de méthylène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL.

*Développement A* : sur un parcours de 13 cm avec la phase mobile A.

*Séchage A* : à l'air.

*Développement B* : sur un parcours de 10 cm avec la phase mobile B.

*Séchage B* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution d'*acide phosphomolybdique R* à 40 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R* et chauffez à 120 °C jusqu'à apparition des taches dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

*Conformité du système* : solution témoin :

– le chromatogramme présente 2 taches séparées.

*Limite* : il n'apparaît aucune tache dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner. Ne tenez pas compte d'une tache éventuelle près du front du solvant utilisé pour le premier développement (oligomères) ni des taches correspondant à celles du chromatogramme obtenu avec la solution à blanc.

**Métaux lourds extractibles** (*2.4.8*) : au maximum 2,5 ppm. Concentrez au bain-marie 50 mL de solution S3 et réduisez le volume à environ 5 mL. Complétez à 20 mL avec de l'*eau R*. 12 mL de solution satisfont à l'essai A. Préparez la solution témoin avec 2,5 mL de *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R*.

**Cendres sulfuriques** (*2.4.14*) : au maximum 0,02 pour cent, déterminé sur 5,0 g du matériau à examiner.

**01/2008:30105**
**corrigé 7.0**

## 3.1.5. POLYÉTHYLÈNE AVEC ADDITIFS POUR RÉCIPIENTS DESTINÉS AUX PRÉPARATIONS PARENTÉRALES ET AUX PRÉPARATIONS OPHTALMIQUES

DÉFINITION

Le polyéthylène avec additifs est obtenu par polymérisation de l'éthylène sous pression en présence de catalyseurs ou par copolymérisation de l'éthylène avec au maximum 25 pour cent d'alcènes homologues supérieurs ($C_3$ à $C_{10}$).

PRODUCTION

Un certain nombre d'additifs sont ajoutés aux polymères de base afin d'optimiser leurs propriétés chimiques, physiques et mécaniques et ainsi de les adapter au mieux à l'usage qui en sera fait. Tous ces additifs sont choisis dans la liste ci-après, qui spécifie pour chaque produit la teneur maximale admise.

Ils peuvent renfermer au plus 3 antioxydants, 1 ou plusieurs lubrifiants ou antibloquants ainsi que du dioxyde de titane comme opacifiant lorsque le matériau doit exercer un effet protecteur vis-à-vis de la lumière.

– butylhydroxytoluène (additif pour plastique 07) : au maximum 0,125 pour cent,
– tétrakis[3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphényl)propionate] de pentaérythrityle (additif pour plastique 09) : au maximum 0,3 pour cent,
– 1,3,5-tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl)-*S*-triazine-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-trione (additif pour plastique 13) : au maximum 0,3 pour cent,
– 3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphényl)propionate d'octadécyle (additif pour plastique 11) : au maximum 0,3 pour cent,
– bis[3,3-bis[3-(1,1-diméthyléthyl)-4-hydroxyphényl]butanoate] d'éthylène (additif pour plastique 08) : au maximum 0,3 pour cent,
– disulfure de dioctadécyle (additif pour plastique 15) : au maximum 0,3 pour cent,
– 4,4′,4″-(2,4,6-triméthylbenzène-1,3,5-triyltrisméthylène)tris[2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)phénol] (additif pour plastique 10) : au maximum 0,3 pour cent,
– 2,2′-bis(octadécyloxy)-5,5′-spirobi[1,3,2-dioxaphosphinane] (additif pour plastique 14) : au maximum 0,3 pour cent,
– 3,3′-thiodipropanoate de didodécyle (additif pour plastique 16) : au maximum 0,3 pour cent,
– 3,3′-thiodipropanoate de dioctadécyle (additif pour plastique 17) : au maximum 0,3 pour cent,
– phosphite de tris[2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)phényle] (additif pour plastique 12) : au maximum 0,3 pour cent.

Le total des additifs antioxydants cités ci-dessus est au maximum de 0,3 pour cent.

– hydrotalcite : au maximum 0,5 pour cent,
– alcanamides : au maximum 0,5 pour cent,
– alcènamides : au maximum 0,5 pour cent,
– silicoaluminate de sodium : au maximum 0,5 pour cent,
– silice : au maximum 0,5 pour cent,
– benzoate de sodium : au maximum 0,5 pour cent,
– sels ou esters d'acides gras : au maximum 0,5 pour cent,
– phosphate trisodique : au maximum 0,5 pour cent,
– paraffine liquide : au maximum 0,5 pour cent,
– oxyde de zinc : au maximum 0,5 pour cent,
– oxyde de magnésium : au maximum 0,2 pour cent,
– stéarate de calcium ou de zinc ou un mélange des 2 : au maximum 0,5 pour cent,
– dioxyde de titane, pour les récipients destinés aux préparations ophthalmiques exclusivement : au maximum 4 pour cent.

Le fournisseur du matériau devra pouvoir démontrer que la composition qualitative et quantitative retenue pour l'échantillon type est satisfaite pour chaque lot de production.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre, billes, granulés ou, après transformation, feuilles translucides d'épaisseur variable ou récipients.

*Solubilité* : pratiquement insoluble dans l'eau, soluble à chaud dans les hydrocarbures aromatiques, pratiquement insoluble dans l'éthanol anhydre, dans l'hexane et dans le méthanol.

Le matériau à examiner se ramollit à une température comprise entre 70 °C et 140 °C.

*Densité* : 0,890 à 0,965.

IDENTIFICATION

*Si nécessaire, découpez les échantillons du matériau à examiner en morceaux d'au maximum 1 cm de côté.*

A. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*).

*Préparation* : chauffez à reflux 0,25 g du matériau à examiner avec 10 mL de *toluène R* pendant environ 15 min. Déposez quelques gouttes de la solution obtenue sur une lame de chlorure de sodium et évaporez le solvant à l'étuve à 80 °C.

*Maximums d'absorption* : à 2920 $cm^{-1}$, 2850 $cm^{-1}$, 1465 $cm^{-1}$, 1375 $cm^{-1}$, 1170 $cm^{-1}$, 730 $cm^{-1}$ et 720 $cm^{-1}$.

Le spectre obtenu est identique au spectre du matériau sélectionné pour l'échantillon type. Lorsque le matériau est présenté en feuilles, l'identification peut être effectuée directement sur un fragment de dimension convenable.

B. Le matériau à examiner satisfait aux essais complémentaires spécifiés pour la recherche des additifs présents (voir Essai).

C. Dans un creuset de platine, mélangez environ 20 mg du matériau à examiner et 1 g d'*hydrogénosulfate de potassium R*, puis chauffez jusqu'à fusion complète. Laissez refroidir. Ajoutez 20 mL d'*acide sulfurique dilué R*. Chauffez doucement. Filtrez la solution obtenue. Ajoutez au filtrat 1 mL d'*acide phosphorique R* et 1 mL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R*. Si le matériau est opacifié par le dioxyde de titane, il se développe une coloration jaune-orange.

ESSAI

*Découpez préalablement, si nécessaire, les échantillons du matériau à examiner en morceaux d'au maximum 1 cm de côté.*

**Solution S1**. Dans un ballon de verre borosilicaté à col rodé, introduisez 25 g du matériau à examiner. Ajoutez 500 mL d'*eau pour préparations injectables R* et chauffez à reflux pendant 5 h. Laissez refroidir et décantez la solution. Prélevez une partie de la solution pour l'essai de l'aspect de la solution. Filtrez le reste de la solution sur un filtre de verre fritté (16) (*2.1.2*). *Utilisez la solution S1 dans les 4 h qui suivent sa préparation*.

**Solution S2**. Dans une fiole conique de verre borosilicaté à col rodé, introduisez 2,0 g du matériau à examiner. Ajoutez 80 mL de *toluène R* et chauffez à reflux pendant 90 min en maintenant une agitation constante. Laissez refroidir à 60 °C et ajoutez, en maintenant l'agitation, 120 mL de *méthanol R*. Filtrez la solution sur un filtre de verre fritté (16) (*2.1.2*). Rincez la fiole et le filtre avec 25 mL d'un mélange de 40 mL de *toluène R* et de 60 mL de *méthanol R*, ajoutez les liquides de rinçage au filtrat et complétez à 250,0 mL avec le même mélange de solvants. Préparez une solution à blanc.

**Solution S3**. Dans une fiole conique de verre borosilicaté à col rodé, introduisez 100 g du matériau à examiner. Ajoutez 250 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* et chauffez à reflux pendant 1 h en maintenant une agitation constante. Laissez refroidir et décanter la solution.

**Aspect de la solution**. La solution S1 est limpide (*2.2.1*) et incolore (*2.2.2, Procédé II*).

**Acidité ou alcalinité**. A 100 mL de solution S1, ajoutez 0,15 mL de *solution d'indicateurs BRP R*. Le virage de l'indicateur au bleu ne nécessite pas plus de 1,5 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*. A 100 mL de solution S1, ajoutez 0,2 mL de *solution de méthylorange R*. Le début du virage de l'indicateur du jaune à l'orange ne nécessite pas plus de 1,0 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M*.

**Absorbance** (*2.2.25*) : au maximum 0,2, déterminé à toutes les longueurs d'onde entre 220 nm et 340 nm avec la solution S1.

**Substances réductrices**. A 20 mL de solution S1, ajoutez 1 mL d'*acide sulfurique dilué R* et 20 mL de *permanganate de potassium 0,002 M*. Chauffez à reflux pendant 3 min et refroidissez immédiatement. Ajoutez 1 g d'*iodure de potassium R* et titrez immédiatement par le *thiosulfate de sodium 0,01 M* en présence de 0,25 mL de *solution d'amidon R*. Effectuez un titrage à blanc. La différence entre les volumes utilisés pour les 2 titrages est au maximum de 0,5 mL.

**Substances solubles dans l'hexane**. Dans une fiole conique de verre borosilicaté à col rodé de 250 mL, introduisez 10 g du matériau à examiner. Ajoutez 100 mL d'*hexane R* et chauffez à reflux pendant 4 h en maintenant sous agitation constante. Refroidissez dans l'eau glacée et filtrez rapidement à travers un filtre de verre fritté (16) (*2.1.2*) en maintenant la solution à 0 °C (le temps de filtration doit rester inférieur à 5 min ; si nécessaire, augmentez la pression sur la solution pour accélérer la filtration). Dans une capsule de verre borisilicaté tarée, évaporez au bain-marie 20 mL du filtrat. Desséchez le résidu à l'étuve à 100-105 °C pendant 1 h. La masse du résidu obtenu est égale, à 10 pour cent près, à la masse du résidu obtenu avec l'échantillon type et elle est au maximum de 5 pour cent.

**Aluminium extractible** : au maximum 1 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner*. Utilisez la solution S3.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 200 ppm d'aluminium (Al) R*, en la diluant avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation de l'aluminium située à 396,15 nm, le fond spectral étant évalué à 396,25 nm.

Vérifiez l'absence d'aluminium dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Chrome extractible** : au maximum 0,05 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner*. Utilisez la solution S3.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 100 ppm de chrome (Cr) R*, en la diluant avec un mélange de 2 volumes d'*acide chlorhydrique R* et de 8 volumes d'*eau R*.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation du chrome située à 205,55 nm, le fond spectral étant évalué à 205,50 nm.

Vérifiez l'absence de chrome dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Titane extractible** : au maximum 1 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner*. Utilisez la solution S3.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 100 ppm de titane (Ti) R*, en la diluant avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation du titane située à 336,12 nm, le fond spectral étant évalué à 336,16 nm.

Vérifiez l'absence de titane dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Vanadium extractible** : au maximum 0,1 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner*. Utilisez la solution S3.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 1 g/L de vanadium (V) R*, en la diluant avec un mélange de 2 volumes d'*acide chlorhydrique R* et de 8 volumes d'*eau R*.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation du vanadium située à 292,40 nm, le fond spectral étant évalué à 292,35 nm.

Vérifiez l'absence de vanadium dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Zinc extractible** : au maximum 1 ppm.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner*. Utilisez la solution S3.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 10 ppm de zinc (Zn) R*, en la diluant avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Source* : lampe à cathode creuse au zinc.

*Longueur d'onde* : 213,9 nm.

*Dispositif d'atomisation* : flamme air-acétylène.

**Zirconium extractible** : au maximum 0,1 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner.* Utilisez la solution S3.

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 1 g/L de zirconium (Zr) R*, en la diluant avec un mélange de 2 volumes d'*acide chlorhydrique R* et de 8 volumes d'*eau R*.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation de zirconium située à 343,82 nm, le fond spectral étant évalué à 343,92 nm.

Vérifiez l'absence de zirconium dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Métaux lourds extractibles** (*2.4.8*) : au maximum 2,5 ppm.

Concentrez au bain-marie 50 mL de solution S3 et réduisez le volume à environ 5 mL. Complétez à 20,0 mL avec de l'*eau R*. 12 mL de solution satisfont à l'essai A. Préparez la solution témoin avec 2,5 mL de *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R*.

**Cendres sulfuriques** (*2.4.14*) : au maximum 1,0 pour cent, déterminé sur 5,0 g du matériau à examiner.

Cette limite ne s'applique pas aux matériaux opacifiés avec du dioxyde de titane.

ESSAIS COMPLÉMENTAIRES

*Effectuez ces essais, en tout ou en partie, selon la composition annoncée du matériau.*

**Antioxydants phénoliques**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Mélange de solvants* : *acétonitrile R, tétrahydrofurane R* (50:50 *V/V*).

*Solution à examiner S21.* Evaporez à siccité 50 mL de solution S2 sous vide à 45 °C. Dissolvez le résidu dans 5,0 mL du mélange de solvants. Préparez une solution à blanc à partir de la solution à blanc correspondant à la solution S2.

*Solution à examiner S22.* Evaporez à siccité 50 mL de solution S2 sous vide à 45 °C. Dissolvez le résidu dans 5,0 mL de *chlorure de méthylène R*. Préparez une solution à blanc à partir de la solution à blanc correspondant à la solution S2.

*Parmi les solutions témoins suivantes, préparez uniquement celles qui sont nécessaires à l'analyse des antioxydants phénoliques annoncés dans la composition du matériau à examiner.*

*Solution témoin (a).* Dissolvez 25,0 mg de *butylhydroxytoluène SCR* (additif pour plastique 07) et 60,0 mg d'*additif pour plastique 08 SCR* dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 09 SCR* et 60,0 mg d'*additif pour plastique 10 SCR* dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (c).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 11 SCR*, et 60,0 mg d'*additif pour plastique 12 SCR* dans 10,0 mL de *chlorure de méthylène R*. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec du *chlorure de méthylène R*.

*Solution témoin (d).* Dissolvez 25,0 mg de *butylhydroxytoluène SCR* (additif pour plastique 07) dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (e).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 08 SCR* dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (f).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 13 SCR* dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (g).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 09 SCR* dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (h).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 10 SCR* dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (i).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 11 SCR* dans 10,0 mL de *chlorure de méthylène R*. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec du *chlorure de méthylène R*.

*Solution témoin (j).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 12 SCR* dans 10,0 mL de *chlorure de méthylène R*. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec du *chlorure de méthylène R*.

A. Si le matériau à examiner contient l'additif pour plastique 07 et/ou l'additif pour plastique 08, procédez comme suit.

*Colonne* :

- *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : *eau R, acétonitrile R* (30:70 *V/V*).

*Débit* : 2 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 280 nm.

*Injection* : 20 µL de solution à examiner S21, de la solution à blanc correspondante, de solution témoin (a) et soit de solution témoin (d) ou (e), soit des solutions témoins (d) et (e).

*Enregistrement* : 30 min.

*Conformité du système* :

- *résolution* : au minimum 8,0 entre les pics dus à l'additif pour plastique 07 et à l'additif pour plastique 08 dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) ;
- le chromatogramme correspondant à la solution à examiner S21 ne comporte que les pics correspondant aux antioxydants annoncés dans la composition, ainsi que des pics mineurs décelés également dans le chromatogramme de la solution à blanc.

*Limites* : la surface des pics du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S21 est inférieure à la surface des pics correspondants dans le chromatogramme obtenu avec les solutions témoins (d) et/ou (e).

B. Si le matériau à examiner contient un ou plusieurs des antioxydants suivants :

- additif pour plastique 09,
- additif pour plastique 10,
- additif pour plastique 11,
- additif pour plastique 12,
- additif pour plastique 13,

procédez comme décrit précédemment avec les modifications suivantes.

*Phase mobile* : *eau R, tétrahydrofurane R, acétonitrile R* (10:30:60 *V/V/V*).

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Injection* : 20 µL de solution à examiner S21, de la solution à blanc correspondante, de solution témoin (b) et des solutions témoins des antioxydants de la liste ci-dessus annoncés dans la composition.

3. Matériaux/ Récipients

*Conformité du système* :

– *résolution* : au minimum 2,0 entre les pics dus à l'additif pour plastique 09 et à l'additif pour plastique 10 dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b),

– le chromatogramme correspondant à la solution à examiner S21 ne comporte que les pics correspondant aux antioxydants annoncés dans la composition, ainsi que des pics mineurs décelés également dans le chromatogramme de la solution à blanc.

*Limite* : la surface des pics du chromatogrammes obtenu avec la solution à examiner S21 est inférieure à la surface des pics correspondants dans les chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins des antioxydants de la liste ci-dessus annoncés dans la composition.

C. Si le matériau à examiner contient l'additif pour plastique 11 et/ou l'additif pour plastique 12, procédez comme décrit pour les matériaux contenant les additifs pour plastiques 07 et/ou 08 avec les modifications suivantes.

*Phase mobile* : *eau R, 2-propanol R, méthanol R* (5:45:50 *V/V/V*).

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Injection* : 20 µL de solution à examiner S22, de la solution à blanc correspondante, de la solution témoin (c) et soit de solution témoin (i) ou (j), soit des solutions témoins (i) et (j).

*Conformité du système* :

– *résolution* : au minimum 2,0 entre les pics dus à l'additif pour plastique 11 et à l'additif pour plastique 12 dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c),

– le chromatogramme correspondant à la solution à examiner S22 ne comporte que les pics correspondant aux antioxydants annoncés dans la composition, ainsi que des pics mineurs décelés également dans le chromatogramme de la solution à blanc.

*Limites* : la surface des pics du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S22 est inférieure à la surface des pics correspondants dans le chromatogramme obtenu avec les solutions témoins (i) et/ou (j).

**Antioxydants non phénoliques**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner S23*. Evaporez à siccité 100 mL de la solution S2 sous vide à 45 °C. Dissolvez le résidu dans 2 mL de *chlorure de méthylène acidifié R*.

*Solution témoin (k)*. Dissolvez 60 mg d'*additif pour plastique 14 SCR* dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant. Prélevez 2 mL de cette solution et complétez à 10 mL avec du *chlorure de méthylène acidifié R*.

*Solution témoin (l)*. Dissolvez 60 mg d'*additif pour plastique 15 SCR* dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant. Prélevez 2 mL de cette solution et complétez à 10 mL avec du *chlorure de méthylène acidifié R*.

*Solution témoin (m)*. Dissolvez 60 mg d'*additif pour plastique 16 SCR* dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant. Prélevez 2 mL de cette solution et complétez à 10 mL avec du *chlorure de méthylène acidifié R*.

*Solution témoin (n)*. Dissolvez 60 mg d'*additif pour plastique 17 SCR* dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant. Prélevez 2 mL de cette solution et complétez à 10 mL avec du *chlorure de méthylène acidifié R*.

*Solution témoin (o)*. Dissolvez 60 mg d'*additif pour plastique 16 SCR* et 60 mg d'*additif pour plastique 17 SCR* dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant. Prélevez 2 mL de cette solution et complétez à 10 mL avec du *chlorure de méthylène acidifié R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice* $GF_{254}$ *pour CCM R*.

*Phase mobile A* : *hexane R*.

*Phase mobile B* : *chlorure de méthylène R*.

*Dépôt* : 20 µL de la solution à examiner S23, de la solution témoin (o) et de chacune des solutions témoins correspondantes à tous les antioxydants phénoliques et non-phénoliques annoncés dans la composition type du matériau examiné.

*Développement A* : sur un parcours de 18 cm avec la phase mobile A.

*Séchage A* : à l'air.

*Développement B* : sur un parcours de 17 cm avec la phase mobile B.

*Séchage B* : à l'air.

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm, pulvérisez de la *solution alcoolique d'iode R* et examinez en lumière ultraviolette à 254 nm après 10-15 min.

*Conformité du système* : solution témoin (o) :

– le chromatogramme présente 2 taches nettement séparées.

*Limites* :

– s'il apparaît des taches dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S23, aucune d'entre elles n'est plus intense que les taches situées aux mêmes positions dans les chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins.

**Amides et stéarates**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Utilisez la solution à examiner S23 de l'essai des antioxydants non phénoliques.

*Solution témoin (p)*. Dissolvez 20 mg d'*acide stéarique SCR* (additif pour plastique 19) dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (q)*. Dissolvez 40 mg d'*additif pour plastique 20 SCR* dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 20 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (r)*. Dissolvez 40 mg d'*additif pour plastique 21 SCR* dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 20 mL avec le même solvant.

*Plaques* : *plaque au gel de silice* $GF_{254}$ *pour CCM R* (2 plaques).

A. *Phase mobile* : *éthanol anhydre R, triméthylpentane R* (25:75 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL de solution à examiner S23 et de solution témoin (p).

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution de *sel sodique de dichlorophénolindophénol R* à 2 g/L dans de l'*éthanol anhydre R* et chauffez quelques minutes à l'étuve à 120 °C pour intensifier les taches.

*Limites* : s'il apparaît une tache correspondant à l'additif pour plastique 19 dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S23, elle est identique en position ($R_F$ : environ 0,5), mais n'est pas plus intense que la tache correspondante dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (p).

B. *Phase mobile A* : *hexane R*.

*Phase mobile B* : *méthanol R, chlorure de méthylène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL de solution à examiner S23 et des solutions témoins (q) et (r).

*Développement A* : sur un parcours de 13 cm avec la phase mobile A.

*Séchage A* : à l'air.

*Développement B* : sur un parcours de 10 cm avec la phase mobile B.

*Séchage B* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution d'*acide phosphomolybdique R* à 40 g/L dans l'*éthanol anhydre R* et chauffez à l'étuve à 120 °C jusqu'à apparition des taches.

*Limite* : s'il apparaît des taches correspondant à l'additif pour plastique 20 ou à l'additif pour plastique 21 dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S23, elles sont identiques en position ($R_F$ : environ 0,2) mais pas plus intenses que les taches correspondantes dans les chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins (q) et (r).

**01/2008:30106**
**corrigé 7.0**

# 3.1.6. POLYPROPYLÈNE POUR RÉCIPIENTS ET FERMETURES DESTINÉS AUX PRÉPARATIONS PARENTÉRALES ET AUX PRÉPARATIONS OPHTALMIQUES

DÉFINITION

Le polypropylène est un homopolymère du propylène ou un copolymère du propylène contenant au maximum 25 pour cent d'éthylène ou un mélange (alliage) de polypropylène avec du polyéthylène dont la proportion peut atteindre 25 pour cent. Le polypropylène peut contenir des additifs.

PRODUCTION

Un certain nombre d'additifs sont ajoutés aux polymères de base afin d'optimiser leurs propriétés chimiques, physiques et mécaniques et ainsi de les adapter au mieux à l'usage qui en sera fait. Tous ces additifs sont choisis dans la liste ci-après, qui spécifie pour chaque produit la teneur maximale admise.

Ils peuvent renfermer au plus 3 antioxydants, un ou plusieurs lubrifiants ou antibloquants ainsi que du dioxyde de titane comme opacifiant lorsque le matériau doit exercer un effet protecteur vis-à-vis de la lumière.

– butylhydroxytoluène (additif pour plastique 07) : au maximum 0,125 pour cent,
– tétrakis[3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphényl)propionate] de pentaérythrityle (additif pour plastique 09) : au maximum 0,3 pour cent,
– 1,3,5-tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl)-*s*-triazine-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-trione (additif pour plastique 13) : au maximum 0,3 pour cent,
– 3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphényl)propionate d'octadécyle (additif pour plastique 11) : au maximum 0,3 pour cent,
– bis[3,3-bis[3-(1,1-diméthyléthyl)-4-hydroxyphényl]butanoate] d'éthylène (additif pour plastique 08) : au maximum 0,3 pour cent,
– disulfure de dioctadécyle (additif pour plastique 15) : au maximum 0,3 pour cent,
– 4,4′,4″-(2,4,6-triméthylbenzène-1,3,5-triyltrisméthylène)tris[2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)phénol] (additif pour plastique 10) : au maximum 0,3 pour cent,
– 2,2′-bis(octadécyloxy)-5,5′-spirobi[1,3,2-dioxaphosphinane] (additif pour plastique 14) : au maximum 0,3 pour cent,
– 3,3′-thiodipropanoate de didodécyle (additif pour plastique 16) : au maximum 0,3 pour cent,
– 3,3′-thiodipropanoate de dioctadécyle (additif pour plastique 17) : au maximum 0,3 pour cent,
– phosphite de tris[2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)phényle] (additif pour plastique 12) : au maximum 0,3 pour cent,

Le total des additifs antioxydants cités ci-dessus est au maximum de 0,3 pour cent.

– hydrotalcite : au maximum 0,5 pour cent,
– alcanamides : au maximum 0,5 pour cent,
– alcènamides : au maximum 0,5 pour cent,
– silicoaluminate de sodium : au maximum 0,5 pour cent,
– silice : au maximum 0,5 pour cent,
– benzoate de sodium : au maximum 0,5 pour cent,
– sels ou esters d'acides gras : au maximum 0,5 pour cent,
– phosphate trisodique : au maximum 0,5 pour cent,
– paraffine liquide : au maximum 0,5 pour cent,
– oxyde de zinc : au maximum 0,5 pour cent,
– talc : au maximum 0,5 pour cent,
– oxyde de magnésium : au maximum 0,2 pour cent,
– stéarate de calcium ou de zinc ou un mélange des deux : au maximum 0,5 pour cent,
– dioxyde de titane, pour les récipients destinés aux préparations ophthalmiques exclusivement : au maximum 4 pour cent.

Le fournisseur du matériau devra pouvoir démontrer que la composition qualitative et quantitative retenue pour l'échantillon type est satisfaisante pour chaque lot de production.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre, billes, granulés ou, après transformation, feuilles translucides d'épaisseur variable ou récipients.

*Solubilité* : pratiquement insoluble dans l'eau, soluble à chaud dans les hydrocarbures aromatiques, pratiquement insoluble dans l'éthanol anhydre, dans l'hexane et dans le méthanol.

Il se ramollit à partir d'environ 120 °C.

IDENTIFICATION

*Découpez préalablement, si nécessaire, les échantillons du matériau à examiner en morceaux de 1 cm de côté au maximum.*

A. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*).

*Préparation* : chauffez à reflux 0,25 g du matériau à examiner avec 10 mL de *toluène R* pendant environ 15 min ; déposez quelques gouttes de la solution chaude obtenue sur une lame de chlorure de sodium et évaporez le solvant à l'étuve à 80 °C.

*Maximums d'absorption* : à 1375 $cm^{-1}$, 1170 $cm^{-1}$, 995 $cm^{-1}$ et 970 $cm^{-1}$.

Le spectre obtenu est identique au spectre du matériau sélectionné pour l'échantillon type. Lorsque le matériau est présenté en feuilles, l'identification peut être effectuée directement sur un fragment de dimension appropriées.

B. Le matériau à examiner satisfait aux essais complémentaires spécifiés pour la recherche des additifs présents (voir Essai).

C. Dans un creuset de platine, mélangez environ 20 mg du matériau à examiner et 1 g d'*hydrogénosulfate de potassium R*, puis chauffez jusqu'à fusion complète. Laissez refroidir. Ajoutez 20 mL d'*acide sulfurique dilué R*. Chauffez doucement. Filtrez la solution obtenue. Ajoutez au filtrat 1 mL d'*acide phosphorique R* et 1 mL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R*. Si le matériau est opacifié par le dioxyde de titane, il se développe une coloration jaune-orange.

ESSAI

*Découpez préalablement, si nécessaire, les échantillons du matériau à examiner en morceaux de 1 cm de côté au maximum.*

**Solution S1**. *Utilisez la solution S1 dans les 4 h qui suivent sa préparation.* Dans un ballon de verre borosilicaté à col rodé, introduisez 25 g du matériau à examiner. Ajoutez 500 mL d'*eau pour préparations injectables R* et chauffez à reflux pendant 5 h. Laissez refroidir et décantez la solution. Prélevez une partie de la solution pour l'essai de l'aspect de la solution. Filtrez le reste de la solution sur un filtre de verre fritté (16) (*2.1.2*).

**Solution S2**. Dans une fiole conique de verre borosilicaté à col rodé, introduisez 2,0 g du matériau à examiner. Ajoutez 80 mL de *toluène R* et chauffez à reflux pendant 1 h 30 min en maintenant une agitation constante. Laissez refroidir à 60 °C et ajoutez, en maintenant l'agitation, 120 mL de *méthanol R*.

3. Matériaux/Récipients

Filtrez la solution sur un filtre de verre fritté (16) (*2.1.2*). Rincez la fiole et le filtre avec 25 mL d'un mélange de 40 mL de *toluène R* et de 60 mL de *méthanol R*, ajoutez les liquides de rinçage au filtrat et complétez à 250,0 mL avec le même mélange de solvants. Préparez une solution à blanc.

**Solution S3**. Dans une fiole conique de verre borosilicaté à col rodé, introduisez 100 g du matériau à examiner. Ajoutez 250 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* et chauffez à reflux pendant 1 h en maintenant une agitation constante. Laissez refroidir et décanter la solution.

**Aspect de la solution**. La solution S1 n'est pas plus fortement opalescente que la suspension témoin II (*2.2.1*) et est incolore (*2.2.2, Procédé II*).

**Acidité ou alcalinité**. A 100 mL de solution S1, ajoutez 0,15 mL de *solution d'indicateurs BRP R*. Le virage de l'indicateur au bleu ne nécessite pas plus de 1,5 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*. A 100 mL de solution S1, ajoutez 0,2 mL de *solution de méthylorange R*. Le début du virage de l'indicateur du jaune à l'orange ne nécessite pas plus de 1,0 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M*.

**Absorbance** (*2.2.25*) : au maximum 0,2, déterminé à toutes les longueurs d'onde entre 220 nm et 340 nm avec la solution S1.

**Substances réductrices**. A 20 mL de solution S1, ajoutez 1 mL d'*acide sulfurique dilué R* et 20 mL de *permanganate de potassium 0,002 M*. Chauffez à reflux pendant 3 min et refroidissez immédiatement. Ajoutez 1 g d'*iodure de potassium R* et titrez immédiatement par le *thiosulfate de sodium 0,01 M* en présence de 0,25 mL de *solution d'amidon R*. Effectuez un titrage à blanc. La différence entre les volumes utilisés pour les 2 titrages est au maximum de 0,5 mL.

**Substances solubles dans l'hexane**. Dans une fiole conique de verre borosilicaté à col rodé de 250 mL, introduisez 10 g du matériau à examiner. Ajoutez 100 mL d'*hexane R* et chauffez à reflux pendant 4 h en maintenant sous agitation constante. Refroidissez dans l'eau glacée et filtrez rapidement sur un filtre de verre fritté (16) (*2.1.2*) en maintenant la solution à 0 °C (le temps de filtration doit rester inférieur à 5 min ; si nécessaire, augmentez la pression sur la solution pour accélérer la filtration). Dans une capsule en verre borosilicaté tarée, évaporez au bain-marie 20 mL du filtrat. Desséchez le résidu à l'étuve à 100-105 °C pendant 1 h. La masse du résidu obtenu est égale, à 10 pour cent près, à la masse du résidu obtenu avec l'échantillon type et elle est au maximum de 5 pour cent.

**Aluminium extractible** : au maximum 1 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner.* Utilisez la solution S3.

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 200 ppm d'aluminium (Al) R*, en la diluant avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation de l'aluminium située à 396,15 nm, le fond spectral étant évalué à 396,25 nm.

Vérifiez l'absence d'aluminium dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Chrome extractible** : au maximum 0,05 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner.* Utilisez la solution S3.

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 100 ppm de chrome (Cr) R*, en la diluant avec un mélange de 2 volumes d'*acide chlorhydrique R* et de 8 volumes d'*eau R*.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation du chrome située à 205,55 nm, le fond spectral étant évalué à 205,50 nm.

Vérifiez l'absence de chrome dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Titane extractible** : au maximum 1 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner.* Utilisez la solution S3.

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 100 ppm de titane (Ti) R*, en la diluant avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation du titane située à 336,12 nm, le fond spectral étant évalué à 336,16 nm.

Vérifiez l'absence de titane dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Vanadium extractible** : au maximum 0,1 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner.* Utilisez la solution S3.

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 1 g/L de vanadium (V) R*, en la diluant avec un mélange de 2 volumes d'*acide chlorhydrique R* et de 8 volumes d'*eau R*.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation du vanadium située à 292,40 nm, le fond spectral étant évalué à 292,35 nm.

Vérifiez l'absence de vanadium dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Zinc extractible** : au maximum 1 ppm.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner.* Utilisez la solution S3.

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 10 ppm de zinc (Zn) R*, en la diluant avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Source* : lampe à cathode creuse au zinc.

*Longueur d'onde* : 213,9 nm.

*Dispositif d'atomisation* : flamme air-acétylène.

Vérifiez l'absence de zinc dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Métaux lourds extractibles** (*2.4.8*) : au maximum 2,5 ppm.

Concentrez au bain-marie 50 mL de solution S3 et réduisez le volume à environ 5 mL. Complétez à 20,0 mL avec de l'*eau R*. 12 mL de solution satisfont à l'essai A. Préparez la solution témoin avec 2,5 mL de *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R*.

**Cendres sulfuriques** (*2.4.14*) : au maximum 1,0 pour cent, déterminé sur 5,0 g du matériau à examiner. Cette limite ne s'applique pas aux matériaux opacifiés avec du dioxyde de titane.

ESSAIS COMPLÉMENTAIRES

*Ces essais sont à effectuer, en totalité ou en partie, selon la composition annoncée du matériau.*

**Antioxydants phénoliques**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Mélange de solvants* : *acétonitrile R, tétrahydrofurane R* (50:50 *V/V*).

*Solution à examiner S21.* Evaporez à siccité 50 mL de solution S2 sous vide à 45 °C. Dissolvez le résidu dans 5,0 mL du mélange de solvants. Préparez une solution à blanc à partir de la solution à blanc correspondant à la solution S2.

*Solution à examiner S22.* Evaporez à siccité 50 mL de solution S2 sous vide à 45 °C. Dissolvez le résidu dans 5,0 mL de *chlorure de méthylène R*. Préparez une solution à blanc à partir de la solution à blanc correspondant à la solution S2.

*Parmi les solutions témoins suivantes, préparez uniquement celles qui sont nécessaires à l'analyse des antioxydants phénoliques annoncés dans la composition de la substance à examiner.*

*Solution témoin (a).* Dissolvez 25,0 mg de *butylhydroxy-toluène SCR* (additif pour plastique 07) et 60,0 mg d'*additif pour plastique 08 SCR* dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 09 SCR* et 60,0 mg d'*additif pour plastique 10 SCR* dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (c).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 11 SCR* et 60,0 mg d'*additif pour plastique 12 SCR* dans 10 mL de *chlorure de méthylène R*. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec du *chlorure de méthylène R*.

*Solution témoin (d).* Dissolvez 25,0 mg de *butylhydroxytoluène SCR* (additif pour plastique 07) dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (e).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 08 SCR* dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (f).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 13 SCR* dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (g).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 09 SCR* dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (h).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 10 SCR* dans 10,0 mL du mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (i).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 11 SCR* dans 10,0 mL de *chlorure de méthylène R*. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec du *chlorure de méthylène R*.

*Solution témoin (j).* Dissolvez 60,0 mg d'*additif pour plastique 12 SCR* dans 10,0 mL de *chlorure de méthylène R*. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec du *chlorure de méthylène R*.

A. Si le matériau à examiner contient l'additif pour plastique 07 et/ou l'additif pour plastique 08, procédez comme suit.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : *eau R, acétonitrile R* (30:70 *V/V*).

*Débit* : 2 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 280 nm.

*Injection* : 20 µL de solution à examiner S21, de solution à blanc correspondante, de solution témoin (a) et soit de solution témoin (d) ou (e), soit des solutions témoins (d) et (e).

*Enregistrement* : 30 min.

*Conformité du système* :

– *résolution* : au minimum 8,0 entre les pics dus à l'additif pour plastique 07 et à l'additif pour plastique 08 dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),
– le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S21 ne comporte que les pics correspondant aux antioxydants annoncés dans la composition, ainsi que des pics mineurs décelés également dans le chromatogramme de la solution à blanc.

*Limite* : la surface du pic du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S21 est inférieure à la surface des pics correspondants dans les chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins (d) et/ou (e).

B. Si la substance à examiner contient un ou plusieurs des antioxydants suivants :

– additif pour plastique 09,
– additif pour plastique 10,
– additif pour plastique 11,
– additif pour plastique 12,
– additif pour plastique 13,

procédez comme décrit précédemment avec les modifications suivantes.

*Phase mobile* : *eau R, tétrahydrofurane R, acétonitrile R* (10:30:60 *V/V/V*).

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Injection* : 20 µL de solution à examiner S21, de solution à blanc correspondante, de solution témoin (b) et de chacune des solutions témoins des antioxydants de la liste ci-dessus annoncés dans la composition.

*Conformité du système* :

– *résolution* : au minimum 2,0 entre les pics dus à l'additif pour plastique 09 et à l'additif pour plastique 10 dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b),
– le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S21 ne comporte que les pics correspondant aux antioxydants annoncés dans la composition, ainsi que des pics mineurs décelés également dans le chromatogramme de la solution à blanc.

*Limite* : la surface du pic du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S21 est inférieure à la surface des pics correspondants dans les chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins des antioxydants de la liste ci-dessus annoncés dans la composition.

C. Si la substance à examiner contient de l'additif pour plastique 11 et/ou de l'additif pour plastique 12, procédez comme décrit pour les matériaux contenant l'additif pour plastique 07 et/ou l'additif pour plastique 08 avec les modifications suivantes.

*Phase mobile* : *eau R, 2-propanol R, méthanol R* (5:45:50 *V/V/V*).

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Injection* : 20 µL de solution à examiner S22, de solution à blanc correspondante, de solution témoin (c) et soit de solution témoin (i) ou (j), soit des solutions témoins (i) et (j).

*Conformité du système* :

– *résolution* : au minimum 2,0 entre les pics dus à l'additif pour plastique 11 et à l'additif pour plastique 12 dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c),
– le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S22 ne comporte que les pics correspondant aux antioxydants annoncés dans la composition, ainsi que des pics mineurs décelés également dans le chromatogramme de la solution à blanc.

*Limite* : la surface du pic du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S22 est inférieure à la surface des pics correspondants dans les chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins (i) et/ou (j).

**Antioxydants non phénoliques**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner S23.* Evaporez à siccité 100 mL de solution S2 sous vide à 45 °C. Dissolvez le résidu avec 2 mL de *chlorure de méthylène acidifié R*.

*Solution témoin (k).* Dissolvez 60 mg d'*additif pour plastique 14 SCR* dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant. Prélevez 2 mL de solution et complétez à 10 mL avec du *chlorure de méthylène acidifié R*.

*Solution témoin (l).* Dissolvez 60 mg d'*additif pour plastique 15 SCR* dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant. Prélevez 2 mL de solution et complétez à 10 mL avec du *chlorure de méthylène acidifié R*.

3. Matériaux/Récipients

*Solution témoin (m).* Dissolvez 60 mg d'*additif pour plastique 16 SCR* dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant. Prélevez 2 mL de solution et complétez à 10 mL avec du *chlorure de méthylène acidifié R.*

*Solution témoin (n).* Dissolvez 60 mg d'*additif pour plastique 17 SCR* dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant. Prélevez 2 mL de solution et complétez à 10 mL avec du *chlorure de méthylène acidifié R.*

*Solution témoin (o).* Dissolvez 60 mg d'*additif pour plastique 16 SCR* et 60 mg d'*additif pour plastique 17 SCR* dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant. Prélevez 2 mL de solution et complétez à 10 mL avec du *chlorure de méthylène acidifié R.*

*Plaque* : *plaque au gel de silice* $GF_{254}$ *pour CCM R.*

*Phase mobile A* : *hexane R.*

*Phase mobile B* : *chlorure de méthylène R.*

*Dépôt* : 20 µL de solution à examiner S23, de solution témoin (o) et des solutions témoins correspondant à tous les antioxydants phénoliques et non-phénoliques annoncés dans la composition type du matériau examiné.

*Développement A* : sur un parcours de 18 cm avec la phase mobile A.

*Séchage A* : à l'air.

*Développement B* : sur un parcours de 17 cm avec la phase mobile B.

*Séchage B* : à l'air.

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm ; pulvérisez de la *solution alcoolique d'iode R* et examinez en lumière ultraviolette à 254 nm après 10-15 min.

*Conformité du système* : solution témoin (o) :

– le chromatogramme présente 2 taches nettement séparées.

*Limite* : s'il apparaît des taches dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S23, aucune d'entre elles n'est plus intense que les taches situées aux mêmes positions dans les chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins.

**Amides et stéarates**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Utilisez la solution S23 de l'essai des antioxydants non phénoliques.

*Solution témoin (p).* Dissolvez 20 mg d'*acide stéarique SCR* (additif pour plastique 19) dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (q).* Dissolvez 40 mg d'*additif pour plastique 20 SCR* dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 20 mL avec le même solvant

*Solution témoin (r).* Dissolvez 40 mg d'*additif pour plastique 21 SCR* dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 20 mL avec le même solvant

*Plaques* : *plaque au gel de silice* $GF_{254}$ *pour CCM R* (2 plaques).

A. *Phase mobile* : *éthanol anhydre R, triméthylpentane R* (25:75 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL de solution à examiner S23 et de solution témoin (p).

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution de *sel sodique de dichlorophénolindophénol R* à 2 g/L dans l'*éthanol anhydre R* et chauffez quelques minutes à l'étuve à 120 °C pour intensifier les taches.

*Limite* : s'il apparaît une tache correspondant à l'additif pour plastique 19 dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S23, elle est identique en position ($R_F$ = environ 0,5) mais pas plus intense que la tache correspondante du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (p).

B. *Phase mobile A* : *hexane R.*

*Phase mobile B* : *méthanol R, chlorure de méthylène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL de solution à examiner S23 et des solutions témoins (q) et (r).

*Développement A* : sur un parcours de 13 cm avec la phase mobile A.

*Séchage A* : à l'air.

*Développement B* : sur un parcours de 10 cm avec la phase mobile B.

*Séchage B* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution d'*acide phosphomolybdique R* à 40 g/L dans l'*éthanol anhydre R* et chauffez à l'étuve à 120 °C jusqu'à apparition des taches.

*Limite* : s'il apparaît des taches correspondant à l'additif pour plastique 20 ou à l'additif pour plastique 21 dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner S23, elles sont identiques en position ($R_F$ = environ 0,2) mais pas plus intenses que les taches correspondantes des chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins (q) et (r).

**01/2008:30107**

## 3.1.7. POLY(ÉTHYLÈNE - ACÉTATE DE VINYLE) POUR RÉCIPIENTS ET TUBULURES DESTINÉS AUX PRÉPARATIONS POUR L'ALIMENTATION PARENTÉRALE TOTALE

DÉFINITION

Le poly(éthylène - acétate de vinyle), correspondant aux spécifications suivantes, est adapté à la fabrication des récipients et tubulures destinés aux préparations pour l'alimentation parentérale totale. Il est obtenu par la copolymérisation d'éthylène et d'acétate de vinyle.

*Teneur en acétate de vinyle* :

– *matériaux utilisés dans la fabrication des récipients* : une quantité définie d'acétate de vinyle pouvant atteindre 25 pour cent,

– *matériaux utilisés dans la fabrication des tubulures* : une quantité définie d'acétate de vinyle pouvant atteindre 30 pour cent.

PRODUCTION

Un certain nombre d'additifs sont ajoutés aux polymères de base afin d'optimiser leurs propriétés chimiques, physiques et mécaniques et ainsi de les adapter au mieux à l'usage qui en sera fait. Tous ces additifs sont choisis dans la liste ci-après, qui spécifie pour chaque produit la teneur maximale admise.

Le poly(éthylène - acétate de vinyle) ne peut contenir plus de 3 des antioxydants suivants :

– butylhydroxytoluène (additif pour plastique 07) : au maximum 0,125 pour cent,
– tétrakis[3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphényl)propionate] de pentaérythrityle (additif pour plastique 09) : au maximum 0,2 pour cent,
– 3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphényl)propionate d'octadécyle (additif pour plastique 11) : au maximum 0,2 pour cent,
– phosphite de tris[2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)phényle] (additif pour plastique 12) : au maximum 0,2 pour cent,
– 4,4′,4″-(2,4,6-triméthylbenzène-1,3,5-triyltrisméthylène)tris[2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)phénol] (additif pour plastique 10) : au maximum 0,2 pour cent.

Le poly(éthylène - acétate de vinyle) peut également contenir :

– de l'oléamide (additif pour plastique 20) : au maximum 0,5 pour cent,
– de l'érucamide (additif pour plastique 21) : au maximum 0,5 pour cent,
– du stéarate de calcium, du stéarate de zinc ou leur mélange : au maximum 0,5 pour cent,
– du carbonate de calcium ou de l'hydroxyde de potassium : au maximum 0,5 pour cent,
– de la silice colloïdale : au maximum 0,2 pour cent.

Le fournisseur du matériau devra pouvoir démontrer que la composition qualitative et quantitative retenue pour l'échantillon type est satisfaisante pour chaque lot de production.

## CARACTÈRES

*Aspect* : billes, granulés ou, après transformation, feuilles translucides ou tubulures d'épaisseur variable ou échantillons d'objets finis.

*Solubilité* : pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans les hydrocarbures aromatiques chauds, pratiquement insoluble dans l'éthanol anhydre, dans le méthanol et dans l'hexane ; ce dernier solvant dissout cependant les polymères de faible masse moléculaire.

Le matériau à examiner brûle avec une flamme bleue.

La température de ramollissement varie en fonction de la teneur en acétate de vinyle : d'environ 100 °C pour des teneurs de quelques pour cent à environ 70 °C pour des teneurs de 30 pour cent.

## IDENTIFICATION

*Découpez préalablement, si nécessaire, les échantillons de matériau à examiner en morceaux de 1 cm de côté au maximum.*

Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*).

*Préparation* : chauffez à reflux 0,25 g du matériau à examiner avec 10 mL de *toluène R* pendant environ 15 min ; déposez quelques gouttes de la solution obtenue sur une lame de chlorure de sodium et évaporez le solvant à l'étuve à 80 °C.

*Maximums d'absorption dus à l'acétate de vinyle* : à 1740 $cm^{-1}$, 1375 $cm^{-1}$, 1240 $cm^{-1}$, 1020 $cm^{-1}$ et 610 $cm^{-1}$.

*Maximums d'absorption dus à l'"éthylène* : à 2920-2850 $cm^{-1}$, 1470 $cm^{-1}$, 1460 $cm^{-1}$, 1375 $cm^{-1}$, 730 $cm^{-1}$ et 720 $cm^{-1}$.

Le spectre obtenu est identique à celui obtenu avec l'échantillon type fourni par le fabricant. Lorsque le matériau est présenté en feuilles, la détermination peut être effectuée directement sur un fragment de dimensions appropriées.

## ESSAI

*Découpez préalablement, si nécessaire, les échantillons de matériau en morceaux de 1 cm de côté au maximum.*

**Solution S1**. Dans une fiole de verre borosilicaté à col rodé, introduisez 2,0 g du matériau à examiner. Ajoutez 80 mL de *toluène R* et chauffez à reflux sous agitation constante pendant 90 min. Laissez refroidir jusqu'à 60 °C et ajoutez dans la fiole, en maintenant l'agitation, 120 mL de *méthanol R*. Filtrez la solution sur un filtre de verre fritté (16) (*2.1.2*). Rincez la fiole et le filtre avec 25 mL d'un mélange de 40 mL de *toluène R* et de 60 mL de *méthanol R*, ajoutez les liquides de rinçage au filtrat et complétez à 250 mL avec le même mélange de solvants.

**Solution S2**. *Utilisez la solution dans les 4 h qui suivent sa préparation*. Dans un ballon de verre borosilicaté à col rodé, introduisez 25 g du matériau à examiner. Ajoutez 500 mL d'*eau pour préparations injectables R* et chauffez à reflux pendant 5 h. Laissez refroidir et décantez la solution. Prélevez une partie de la solution pour l'essai de l'aspect de la solution S2. Filtrez le reste de la solution sur un filtre de verre fritté (16) (*2.1.2*).

**Aspect de la solution S2**. La solution S2 est limpide (*2.2.1*) et incolore (*2.2.2, Procédé II*).

**Acidité ou alcalinité**. A 100 mL de solution S2, ajoutez 0,15 mL de *solution d'indicateurs BRP R*. Le virage de l'indicateur au bleu ne nécessite pas plus de 1,0 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*. A 100 mL de solution S2, ajoutez 0,2 mL de *solution de méthylorange R*. Le début du virage de l'indicateur du jaune à l'orange ne nécessite pas plus de 1,5 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M*.

**Absorbance** (*2.2.25*) : au maximum 0,2, déterminé à toutes les longueurs d'onde entre 220 nm et 340 nm avec la solution S2.

**Substances réductrices**. A 20 mL de solution S2, ajoutez 1 mL d'*acide sulfurique dilué R* et 20 mL de *permanganate de potassium 0,002 M*. Chauffez à reflux pendant 3 min et refroidissez immédiatement. Ajoutez 1 g d'*iodure de potassium R* et titrez immédiatement par le *thiosulfate de sodium 0,01 M* en présence de 0,25 mL de *solution d'amidon R*. Effectuez un titrage à blanc. La différence entre les volumes utilisés dans les 2 titrages est au maximum de 0,5 mL.

**Amides et acide stéarique**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Evaporez à siccité 100 mL de solution S1 à 45 °C sous vide. Reprenez le résidu par 2 mL de *chlorure de méthylène acidifié R*.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 20 mg d'*acide stéarique SCR* (additif pour plastique 19) dans 10 mL de *chlorure de méthylène R*.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 40 mg d'*additif pour plastique 20 SCR* dans 10 mL de *chlorure de méthylène R*. Prélevez 1 mL de cette solution et complétez à 5 mL avec du *chlorure de méthylène R*.

*Solution témoin (c)*. Dissolvez 40 mg d'*additif pour plastique 21 SCR* dans 10 mL de *chlorure de méthylène R*. Prélevez 1 mL de cette solution et complétez à 5 mL avec du *chlorure de méthylène R*.

*Plaques* : *plaque au gel de silice $GF_{254}$ pour CCM R* (2 plaques).

A. *Phase mobile* : *éthanol anhydre R, triméthylpentane R* (25:75 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution de *sel sodique de dichlorophénolindophénol R* à 2 g/L dans de l'*éthanol anhydre R* et chauffez à l'étuve à 120 °C pendant quelques minutes pour intensifier les taches.

*Limite* : s'il apparaît une tache correspondant à l'additif pour plastique 19 dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, elle n'est pas plus intense que la tache des chromatogrammes obtenu avec la solution témoin (a).

B. *Phase mobile A* : *hexane R*.

*Phase mobile B* : *méthanol R, chlorure de méthylène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL.

*Développement A* : sur un parcours de 13 cm avec la phase mobile A.

*Séchage A* : à l'air.

*Développement B* : sur un parcours de 10 cm avec la phase mobile B.

*Séchage B* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution d'*acide phosphomolybdique R* à 40 g/L dans de l'*éthanol anhydre R* et chauffez à l'étuve à 120 °C jusqu'à apparition des taches.

*Limite* : s'il apparaît une tache correspondant à l'additif pour plastique 21 ou à l'additif pour plastique 20 dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, elle n'est pas plus intense que la tache des chromatogrammes obtenu avec les solutions témoins (b) et (c).

**Antioxydants phénoliques**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Mélange de solvants* : *acétonitrile R, tétrahydrofurane R* (50:50 *V/V*).

*Solution à examiner (a).* Evaporez à siccité 50 mL de solution S1 à 45 °C sous vide et dissolvez le résidu dans 5,0 mL de mélange de solvants.

*Solution à examiner (b).* Evaporez à siccité 50 mL de solution S1 à 45 °C sous vide et dissolvez le résidu dans 5,0 mL de *chlorure de méthylène R*.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 25 mg de *butylhydroxytoluène SCR* (additif pour plastique 07), 40 mg d'*additif pour plastique 10 SCR*, 40 mg d'*additif pour plastique 09 SCR* et 40 mg d'*additif pour plastique 11 SCR* dans 10 mL de mélange de solvants. Prélevez 2 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 40 mg d'*additif pour plastique 11 SCR* et 40 mg d'*additif pour plastique 12 SCR* dans 10 mL de *chlorure de méthylène R*. Prélevez 2 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec du *chlorure de méthylène R*.

*Colonne* :

- *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : *eau R, tétrahydrofurane R, acétonitrile R* (10:30:60 *V/V/V*).

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 280 nm.

*Injection* : 20 µL de solution à examiner (a) et de solution témoin (a).

*Conformité du système* : solution témoin (a) :

- *résolution* : au minimum 2,0 entre les pics dus à l'additif pour plastique 09 et à l'additif pour plastique 10,
- *nombre de plateaux théoriques* : au minimum 2500, calculé pour le pic dû à l'additif pour plastique 07.

*Limites* :

- le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a) ne présente pas d'autres pics principaux que ceux du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) ayant un temps de rétention supérieur à 2 min,
- la surface des pics du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a) n'est pas supérieure à celle des pics correspondants dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a), à l'exception du dernier pic élué dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

Si le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a) présente un pic de même temps de rétention que le dernier antioxydant élué de la solution témoin (a), procédez comme décrit précédemment avec les modifications suivantes.

*Phase mobile* : *eau R, 2-propanol R, méthanol R* (5:45:50 *V/V/V*).

*Injection* : 20 µL de solution à examiner (b) et de solution témoin (b).

*Conformité du système* : solution témoin (b) :

- *résolution* : au minimum 2,0 entre les pics dus à l'additif pour plastique 11 et à l'additif pour plastique 12.

*Limites* :

- le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b) ne présente pas d'autres pics principaux que ceux du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) ayant un temps de rétention supérieur à 3 min,
- la surface des pics du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b) n'est pas supérieure à celle des pics correspondants dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b).

**Substances solubles dans l'hexane**. Dans une fiole conique de verre borosilicaté à col rodé, reliée à un condenseur, introduisez 5 g du matériau à examiner. Ajoutez 50 mL d'*hexane R* et chauffez à reflux au bain marie en agitant constamment pendant 4 h. Refroidissez dans de l'eau glacée ; un gel peut se former. Placez une jaquette remplie d'eau glacée autour d'un filtre de verre fritté (16) (*2.1.2*) muni d'un dispositif permettant l'application de pression pendant la filtration. Laissez refroidir le filtre pendant 15 min. Filtrez la solution dans l'hexane en appliquant une pression effective de 27 kPa sans laver le résidu ; le temps de filtration ne doit pas dépasser 5 min. Evaporez 20 mL de la solution à siccité au bain-marie. Séchez le résidu à 100 °C pendant 1 h. La masse du résidu est au maximum de 40 mg (2 pour cent) si le matériau est destiné à la fabrication des récipients et au maximum de 0,1 g (5 pour cent) si le matériau est destiné à la fabrication des tubulures.

**Cendres sulfuriques** (*2.4.14*) : au maximum 1,2 pour cent, déterminé sur 5,0 g de poly(éthylène - acétate de vinyle).

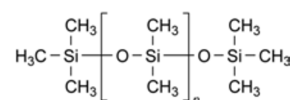
DOSAGE

Dans une fiole conique à col rodé de 300 mL contenant un agitateur magnétique, introduisez 0,250 g à 1,000 g de poly(éthylène - acétate de vinyle), suivant la teneur en acétate de vinyle du copolymère à examiner. Ajoutez 40 mL de *xylène R*. Chauffez à reflux en agitant pendant 4 h. Sans cesser l'agitation, laissez refroidir jusqu'au début de la précipitation avant d'ajouter lentement 25,0 mL de *solution alcoolique d'hydroxyde de potassium R1*. Chauffez à nouveau à reflux avec agitation pendant 3 h. Laissez refroidir en continuant d'agiter, rincez le réfrigérant avec 50 mL d'*eau R* et ajoutez dans la fiole 30,0 mL d'*acide sulfurique 0,05 M*. Transvasez le contenu de la fiole dans un vase à précipiter de 400 mL, rincez la fiole avec 2 fois 50 mL d'une solution de *sulfate de sodium anhydre R* à 200 g/L, puis avec 3 fois 20 mL d'*eau R* ; ajoutez tous les liquides de rinçage au vase contenant la solution initiale. Titrez l'acide sulfurique en excès par l'*hydroxyde de sodium 0,1 M*. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (*2.2.20*). Effectuez un titrage à blanc.

1 mL d'*acide sulfurique 0,05 M* correspond à 8,609 mg d'acétate de vinyle.

**01/2008:30108**

# 3.1.8. HUILE DE SILICONE UTILISÉE COMME LUBRIFIANT



DÉFINITION

L'huile de silicone utilisée comme lubrifiant est un poly(diméthylsiloxane) obtenu par hydrolyse et polycondensation de dichlorodiméthylsilane et de chlorotriméthylsilane. Il en existe différentes qualités qui sont caractérisées par l'indication de la valeur de la viscosité nominale sous la forme d'un nombre placé après le nom de la substance.

Les huiles de silicone utilisées comme lubrifiants correspondent à un degré de polymérisation (*n* = 400 à 1200) tel que leur viscosité cinématique nominale est de 1000 $mm^2·s^{-1}$ à 30 000 $mm^2·s^{-1}$.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, incolore, présentant diverses viscosités.

*Solubilité* : pratiquement insoluble dans l'eau et dans le méthanol, très peu soluble dans l'éthanol anhydre, miscible à l'acétate d'éthyle, à la méthyléthylcétone et au toluène.

IDENTIFICATION

A. Viscosité cinématique à 25 °C (voir Essai).

B. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*).

*Comparaison* : *huile de silicone SCR*.

Il n'est pas tenu compte de la région spectrale de 850-750 $cm^{-1}$ car elle peut présenter de légères différences en fonction du degré de polymérisation.

C. Dans un tube à essai, chauffez 0,5 g d'huile à examiner sur une petite flamme jusqu'à apparition de fumées blanches. Renversez ce 1er tube à essai sur un 2e contenant 1 mL d'une solution de *sel sodique d'acide chromotropique R* à 1 g/L dans l'*acide sulfurique R* de façon que les fumées atteignent la solution. Agitez le 2e tube pendant environ 10 s, puis chauffez au bain-marie pendant 5 min. La solution est violette.

D. Dans un creuset de platine, préparez les cendres sulfuriques (*2.4.14*) à partir de 50 mg d'huile à examiner : la poudre blanche obtenue donne la réaction des silicates (*2.3.1*).

ESSAI

**Acidité**. A 2,0 g d'huile de silicone, ajoutez 25 mL d'un mélange à volumes égaux d'*éthanol anhydre R* et d'*éther R* préalablement neutralisé en présence de 0,2 mL de *solution de bleu de bromothymol R1*, puis agitez. Le virage de la solution au bleu ne nécessite pas plus de 0,15 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*.

**Viscosité** (*2.2.10*). Déterminez la viscosité dynamique à 25 °C et calculez la viscosité cinématique en prenant 0,97 comme densité. La viscosité cinématique est comprise entre 95 pour cent et 105 pour cent de la viscosité nominale indiquée sur l'étiquette.

**Huiles minérales**. Dans un tube à essai, introduisez 2 mL d'huile à examiner et examinez en lumière ultraviolette à 365 nm. La fluorescence n'est pas plus intense que celle d'une solution de *sulfate de quinine R* à 0,1 ppm dans l'*acide sulfurique 0,005 M* examinée dans les mêmes conditions.

**Composés phénylés**. L'indice de réfraction (*2.2.6*) est au maximum de 1,410.

**Métaux lourds** : au maximum 5 ppm.

*Mélange de solvants* : *ammoniaque diluée R2*, solution de *chlorhydrate d'hydroxylamine R* à 2 g/L (1:9 *V/V*).

Mélangez 1,0 g d'huile à examiner avec du *chlorure de méthylène R* et complétez à 20 mL avec le même solvant. Ajoutez 1,0 mL d'une solution extemporanée de *dithizone R* à 0,02 g/L dans le *chlorure de méthylène R*, 0,5 mL d'*eau R* et 0,5 mL du mélange de solvants. Préparez simultanément comme suit la solution témoin : à 20 mL de *chlorure de méthylène R*, ajoutez 1,0 mL d'une solution extemporanée de *dithizone R* à 0,02 g/L dans le *chlorure de méthylène R*, 0,5 mL de *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R* et 0,5 mL du mélange de solvants. Agitez immédiatement et énergiquement chaque solution pendant 1 min. S'il apparaît une coloration rouge dans la solution à examiner, elle n'est pas plus intense que celle de la solution témoin.

**Matières volatiles** : au maximum 2,0 pour cent, déterminé sur 2,00 g d'huile à examiner par chauffage à l'étuve à 150 °C pendant 24 h dans une capsule d'un diamètre de 60 mm et d'une hauteur de 10 mm.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– la viscosité nominale par un nombre placé après le nom de la substance,
– que le produit doit être utilisé comme lubrifiant.

**01/2008:30109**

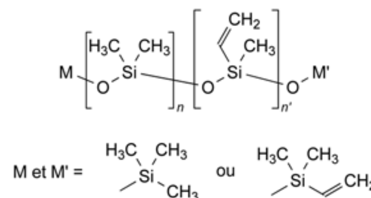
## 3.1.9. SILICONE-ÉLASTOMÈRE POUR FERMETURES ET TUBULURES

DÉFINITION

Le silicone-élastomère qui répond aux spécifications suivantes est adapté à la fabrication des fermetures et tubulures.

Le silicone-élastomère est obtenu par réticulation d'un polysiloxane en chaîne linéaire à motifs diméthylsiloxyles contenant de faibles quantités de groupes méthylvinylsiloxyles et dont les extrémités de chaînes sont bloquées par des groupes triméthylsiloxyles ou diméthylvinylsiloxyles.

La formule générale de ce polysiloxane est :




La réticulation est effectuée à chaud :

– soit au moyen de :
  – peroxyde de 2,4-dichlorobenzoyle dans le cas des produits extrudés,
  – peroxyde de 2,4-dichlorobenzoyle ou peroxyde de dicumyle ou monoperoxycarbonate de *OO*-(1,1-diméthyléthyle) et de *O*-isopropyle ou 2,5-bis[(1,1-diméthyléthyl)dioxy]-2,5-diméthylhexane dans le cas des produits moulés,
– soit par hydrosilylation à l'aide de polysiloxane à groupes -SiH en présence de platine comme catalyseur.

Dans tous les cas, les additifs appropriés sont utilisés, parmi lesquels la silice et parfois de faibles quantités d'additifs organosiliciques (α,ω-dihydroxypolydiméthylsiloxane).

CARACTÈRES

*Aspect* : matériau transparent ou translucide.

*Solubilité* : pratiquement insoluble dans les solvants organiques dont certains, tels que par exemple le cyclohexane, l'hexane et le chlorure de méthylène, provoquent un gonflement réversible du matériau.

IDENTIFICATION

A. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*) par la méthode de réflexion multiple pour les solides.

*Comparaison* : *silicone-élastomère SCR*.

B. Dans un tube à essai, chauffez 1,0 g du matériau à examiner sur une petite flamme jusqu'à apparition de fumées blanches. Renversez ce 1er tube à essai sur un 2e contenant 1 mL d'une solution de *sel sodique d'acide chromotropique R* à 1 g/L dans l'*acide sulfurique R* de façon que les fumées atteignent la solution. Agitez le 2e tube pendant environ 10 s, puis chauffez-le au bain-marie pendant 5 min. La solution est violette.

C. 50 mg du résidu de combustion donnent la réaction des silicates (*2.3.1*).

ESSAI

*Si nécessaire, découpez les échantillons du matériau à examiner en morceaux de 1 cm de côté au maximum.*

**Solution S**. Dans un ballon de verre borosilicaté à col rodé, introduisez 25 g du matériau à examiner. Ajoutez 500 mL d'*eau R* et chauffez à reflux pendant 5 h. Laissez refroidir et décantez la solution.

**Aspect de la solution**. La solution S est limpide (*2.2.1*).

**Acidité ou alcalinité**. A 100 mL de solution S, ajoutez 0,15 mL de *solution de bleu de bromothymol R1*. Le virage de l'indicateur au bleu ne nécessite pas plus de 2,5 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*. A 100 autres millilitres de solution S, ajoutez 0,2 mL de *solution de méthylorange R*. Le début du virage de l'indicateur du jaune à l'orange ne nécessite pas plus de 1,0 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M*.

**Densité** (*2.2.5*) : 1,05 à 1,25, déterminée à l'aide d'un pycnomètre et avec l'*éthanol anhydre R* comme liquide d'immersion.

**Substances réductrices**. A 20 mL de solution S, ajoutez 1 mL d'*acide sulfurique dilué R* et 20 mL de *permanganate de potassium 0,002 M*. Laissez reposer pendant 15 min, puis ajoutez 1 g d'*iodure de potassium R*. Titrez immédiatement par le *thiosulfate de sodium 0,01 M* en présence de 0,25 mL de *solution d'amidon R*. Effectuez un titrage à blanc en remplaçant la solution S par 20 mL d'*eau R*. La différence entre les volumes de *thiosulfate de sodium 0,01 M* utilisés dans les 2 titrages est au maximum de 1,0 mL.

**Substances solubles dans l'hexane** : au maximum 3 pour cent.

Dans une capsule de verre, évaporez au bain-marie 25 mL de la solution obtenue dans l'essai des composés phénylés. Faites sécher ensuite à l'étuve à 100-105 °C pendant 1 h. La masse du résidu est au maximum de 15 mg.

**Composés phénylés**. Dans un ballon de verre borosilicaté à col rodé, introduisez 2,0 g du matériau à examiner. Ajoutez 100 mL d'*hexane R* et chauffez à reflux pendant 4 h. Après refroidissement, filtrez rapidement sur un creuset de verre fritté (16) (*2.1.2*). Recueillez le filtrat et bouchez pour éviter l'évaporation. A aucune des longueurs d'onde de 250 nm à 340 nm, l'absorbance (*2.2.25*) n'est supérieure à 0,4.

**Huiles minérales**. Dans une fiole conique de 100 mL contenant 30 mL d'un mélange de 5 volumes d'*ammoniaque R* et de 95 volumes de *pyridine R*, introduisez 2 g du matériau à examiner. Laissez reposer pendant 2 h en agitant fréquemment. Prélevez la solution pyridinique et examinez en lumière ultraviolette à 365 nm. La fluorescence n'est pas plus intense que celle d'une solution de *sulfate de quinine R* à 1 ppm dans l'*acide sulfurique 0,005 M* examinée dans les mêmes conditions.

**Matières volatiles** : au maximum 0,5 pour cent si le silicone-élastomère est préparé à l'aide de peroxydes ; au maximum 2,0 pour cent si le silicone-élastomère est préparé à l'aide de platine.

Pesez 10,0 g du matériau à examiner maintenu au préalable pendant 48 h dans un dessiccateur contenant du *chlorure de calcium anhydre R*. Chauffez à l'étuve à 200 °C pendant 4 h. Laissez refroidir dans un dessiccateur et pesez.

*Le silicone-élastomère préparé à l'aide de peroxydes satisfait à l'essai supplémentaire suivant* :

**Peroxydes résiduels** : au maximum 0,08 pour cent, calculé en peroxyde de dichlorobenzoyle.

Dans une fiole de verre borosilicaté, introduisez 5 g du matériau à examiner et ajoutez 150 mL de *chlorure de méthylène R*, bouchez et agitez à l'aide d'un agitateur mécanique pendant 16 h. Filtrez rapidement en recueillant le filtrat dans une fiole à col rodé. Chassez l'air de la fiole à l'aide d'*azote exempt d'oxygène R*. Introduisez 1 mL d'une solution d'*iodure de sodium R* à 200 g/L dans l'*acide acétique anhydre R*, bouchez, agitez fortement et laissez reposer à l'abri de la lumière pendant 30 min, puis ajoutez 50 mL d'*eau R*. Titrez immédiatement par le *thiosulfate de sodium 0,01 M* en présence de 0,25 mL de *solution d'amidon R*. Effectuez un titrage à blanc. La différence entre les volumes de *thiosulfate de sodium 0,01 M* utilisés dans les 2 titrages est au maximum de 2,0 mL.

*Le silicone-élastomère préparé à l'aide de platine satisfait à l'essai supplémentaire suivant* :

**Platine** : au maximum 30 ppm.

Dans un creuset de quartz, calcinez 1,0 g du matériau à examiner en augmentant progressivement la température du chauffage jusqu'à obtention d'un résidu blanc. Placez le résidu dans un creuset de graphite. Dans le creuset de quartz, ajoutez 10 mL d'un mélange récemment préparé de 1 volume d'*acide nitrique R* et de 3 volumes d'*acide chlorhydrique R*. Chauffez au bain-marie pendant 1-2 min, puis transvasez la solution dans le creuset de graphite. Ajoutez 5 mg de *chlorure de potassium R* et 5 mL d'*acide fluorhydrique R*, puis évaporez au bain-marie à siccité. Ajoutez 5 mL d'*acide fluorhydrique R* et évaporez de nouveau à siccité. Répétez 2 fois cette dernière opération. Dissolvez ensuite le résidu dans 5 mL d'*acide chlorhydrique 1 M* en chauffant au bain-marie. Laissez refroidir, puis ajoutez la solution à 1 mL d'une solution de *chlorure stanneux R* à 250 g/L dans l'*acide chlorhydrique 1 M*. Rincez le creuset de graphite avec quelques millilitres d'*acide chlorhydrique 1 M* et complétez à 10,0 mL avec le même acide.

Préparez simultanément comme suit la solution témoin : à 1 mL d'une solution de *chlorure stanneux R* à 250 g/L dans l'*acide chlorhydrique 1 M*, ajoutez 1,0 mL de *solution à 30 ppm de platine (Pt) R*, puis complétez à 10,0 mL avec de l'*acide chlorhydrique 1 M*.

La solution à examiner n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique si le matériau a été préparé au moyen de peroxydes ou de platine.

**01/2008:30110**
**corrigé 7.0**

## 3.1.10. MATÉRIAUX À BASE DE POLY(CHLORURE DE VINYLE) NON PLASTIFIÉ POUR CONDITIONNEMENT DES SOLUTIONS AQUEUSES NON INJECTABLES

DÉFINITION

Les matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) non plastifié répondant aux spécifications suivantes sont adaptés à la préparation de récipients destinés à contenir des solutions aqueuses non injectables. Ils peuvent éventuellement servir au conditionnement de formes solides administrées par voie orale et dans certains cas, sous réserve d'études particulières de compatibilité contenant-contenu, ces matériaux peuvent convenir pour la préparation de récipients destinés à contenir des suppositoires. Ils sont constitués par 1 ou plusieurs poly(chlorure de vinyle/acétate de vinyle), ou par un mélange de poly(chlorure de vinyle) et de poly(acétate de vinyle), ou par un poly(chlorure de vinyle).

La teneur en chlore exprimée en poly(chlorure de vinyle) est au minimum de 80 pour cent.

Ils peuvent contenir au maximum 15 pour cent de copolymères à base d'acides et/ou d'esters acryliques et/ou méthacryliques, et/ou de styrène et/ou de butadiène.

PRODUCTION

Les matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) non plastifié sont produits par des méthodes de polymérisation permettant de garantir une teneur en chlorure de vinyle résiduel inférieure à 1 ppm. Le procédé de fabrication est validé de façon à démontrer que le produit satisfait à l'essai suivant.

**Chlorure de vinyle**. Chromatographie en phase gazeuse à espace de tête (*2.2.28*).

*Solution d'étalon interne*. Au moyen d'une microseringue, injectez 10 µL d'*éther R* dans 20,0 mL de *diméthylacétamide R* en plongeant l'extrémité de l'aiguille dans le solvant. Immédiatement avant l'emploi, diluez la solution à 1000 fois son volume avec du *diméthylacétamide R*.

*Solution à examiner*. Dans un flacon de 50 mL, introduisez 1,000 g du matériau à examiner et 10,0 mL de solution d'étalon interne. Bouchez et sertissez. Agitez la solution en évitant que le liquide n'entre en contact avec le bouchon et placez le flacon dans un bain-marie à 60 ± 1 °C pendant 2 h.

*Solution mère de chlorure de vinyle. Préparez sous hotte ventilée*. Dans un flacon de 50 mL, introduisez 50,0 mL de *diméthylacétamide R*, bouchez et sertissez, puis pesez l'ensemble à 0,1 mg près. Remplissez une seringue de 50 mL en polyéthylène ou polypropylène avec du *chlorure de vinyle R* gazeux ; laissez le gaz en contact avec la seringue pendant environ 3 min ; videz la seringue, puis remplissez-la à nouveau avec 50 mL de *chlorure de vinyle R* gazeux. Adaptez à la seringue une aiguille hypodermique et ramenez le volume de gaz contenu dans la seringue de 50 mL à 25 mL ; injectez lentement ces 25 mL de chlorure de vinyle dans le flacon en agitant légèrement et en évitant le contact entre l'aiguille et le liquide. Pesez à nouveau le flacon : l'augmentation de masse est d'environ 60 mg (1 µL de la solution ainsi obtenue contient une quantité de chlorure de vinyle d'environ 1,2 µg). Laissez reposer pendant 2 h. Conservez la solution mère au réfrigérateur.

*Solution étalon de chlorure de vinyle* : solution mère de chlorure de vinyle, *diméthylacétamide R* (1:3 *V/V*).

*Solutions de référence*. Introduisez 10,0 mL de solution d'étalon interne dans 6 flacons de 50 mL. Bouchez et sertissez. Dans 5 de ces flacons, injectez respectivement 1 µL, 2 µL, 3 µL, 5 µL et 10 µL de solution étalon de chlorure de vinyle. Les quantités de chlorure de vinyle contenus dans chacun des 6 flacons sont voisines respectivement de 0 µg, 0,3 µg, 0,6 µg, 0,9 µg, 1,5 µg et 3 µg. Agitez les solutions en évitant que le liquide n'entre en contact avec le bouchon et placez les flacons dans un bain-marie à 60 ± 1 °C pendant 2 h.

*Colonne* :

- *matériau* : acier inoxydable,
- *dimensions* : $l$ = 3 m, Ø = 3 mm,
- *phase stationnaire* : *terre d'infusoires silanisée pour chromatographie en phase gazeuse R* imprégnée de 5 pour cent *m/m* de *diméthylstéarylamide R* et de 5 pour cent *m/m* de *macrogol 400 R*.

*Gaz vecteur* : *azote pour chromatographie R*.

*Débit* : 30 mL/min.

*Température* :

- *colonne* : 45 °C,
- *chambre à injection* : 100 °C,
- *détecteur* : 150 °C.

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 mL de l'espace de tête.

*Limite* :

- *chlorure de vinyle* : au maximum 1 ppm.

**Additifs**

Dans le but d'obtenir les caractéristiques mécaniques et la stabilité souhaitées, les matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) non plastifié peuvent contenir les constituants suivants :

- huile de soja époxydée dont la teneur en oxygène oxirane est de 6 pour cent à 8 pour cent et dont l'indice d'iode est au maximum de 6 : au maximum 8 pour cent,
- sels de calcium ou de zinc, d'acides gras aliphatiques à plus de 7 atomes de carbone : au maximum 1,5 pour cent ou au maximum 1,5 pour cent de leur mélange,
- paraffine liquide : au maximum 1,5 pour cent,
- cires : au maximum 1,5 pour cent,
- huiles hydrogénées ou esters d'acides gras aliphatiques : au maximum 2 pour cent,
- esters de macrogol : au maximum 1,5 pour cent,
- sorbitol : au maximum 1,5 pour cent,
- phosphite de 2,4-dinonylphényle, phosphite de di(4-nonylphényle) ou phosphite de tris(nonylphényle) : au maximum 1 pour cent.

Les matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) peuvent contenir selon les cas, l'un des 3 groupes de stabilisants suivants :

- étain sous forme de 2,2′-[(dioctylstannylène)bis(thio)]diacétate de di(isooctyle) contenant 27 pour cent environ de 2,2′,2″-[(monooctylstannylidyne)tris(thio)]triacétate de tri(isooctyle) : au maximum 0,25 pour cent,
- étain sous forme d'un mélange contenant un maximum de 76 pour cent de 2,2′-[(diméthylstannylène)bis(thio)]diacétate de di(isooctyle) et un maximum de 85 pour cent de 2,2′,2″-[(monométhylstannylidyne)tris(thio)]triacétate de tri(isooctyle) ; (isooctyle est par ex. 2-éthylhexyle) : au maximum 0,25 pour cent,
- 1-phényleicosane-1,3-dione (benzoylstéaroylméthane) ou 2-(4-dodécylphényl)indole ou 1,4-dihydropyridine-2,6-diméthyl-3,5-dicarboxylate de didodécyle : au maximum 1 pour cent ou 1 pour cent du mélange de 2 d'entre eux.

Certains matériaux peuvent renfermer un pigment ou colorant et peuvent être opacifiés par du dioxyde de titane.

Le fournisseur du matériau fini devra pouvoir démontrer que la composition qualitative et quantitative retenue pour l'échantillon type est satisfaisante pour chaque lot de production.

## CARACTÈRES

*Aspect* : poudres, billes, granulés, feuilles d'épaisseur variable ou échantillons provenant d'objets finis.

*Solubilité* : insoluble dans l'eau, soluble dans le tétrahydrofurane, peu soluble dans le chlorure de méthylène, insoluble dans l'éthanol anhydre.

Ils brûlent avec une flamme jaune-orange bordée de vert en dégageant une épaisse fumée noire.

## IDENTIFICATION

Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*)

*Préparation*. Dissolvez le résidu A (Voir Essai : Solution S2) dans 5 mL de *tétrahydrofurane R*. Déposez quelques gouttes de la solution sur une lame de chlorure de sodium et évaporez à siccité à l'étuve à 100-105 °C.

*Maximums d'absorption* : à 2975 $cm^{-1}$, 2910 $cm^{-1}$, 2865 $cm^{-1}$, 1430 $cm^{-1}$, 1330 $cm^{-1}$, 1255 $cm^{-1}$, 690 $cm^{-1}$ et 615 $cm^{-1}$.

Le spectre obtenu est identique au spectre du matériau sélectionné pour l'échantillon type.

## ESSAI

*Découpez préalablement, si nécessaire, les échantillons de matériau à examiner en morceaux de 1 cm de côté au maximum.*

**Solution S1**. Dans un ballon de verre borosilicaté, introduisez 25 g de matériau à examiner. Ajoutez 500 mL d'*eau R* et recouvrez le col du ballon d'une feuille en aluminium ou d'un vase de verre borosilicaté. Chauffez à l'autoclave à 121 ± 2 °C pendant 20 min. Laissez refroidir et décanter la solution.

**Solution S2**. Dissolvez 5,0 g de matériau à examiner dans 80 mL de *tétrahydrofurane R*, puis complétez à 100 mL avec le même solvant. Filtrez si nécessaire (la solution peut demeurer opalescente). Prélevez 20 mL de cette solution et ajoutez, goutte à goutte et en agitant doucement, 70 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*, puis refroidissez dans la glace pendant 1 h. Filtrez ou centrifugez (résidu A). Lavez le résidu A avec de l'*éthanol à 96 pour cent R* et réunissez la solution de lavage au filtrat ou au liquide de centrifugation, puis complétez à 100 mL avec de l'*éthanol à 96 pour cent R*.

**Solution S3**. Dans un ballon de verre borosilicaté à col rodé, introduisez 5 g de matériau à examiner. Ajoutez 100 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* et chauffez à reflux pendant 1 h. Laissez refroidir et décanter la solution.

**Aspect de la solution S1**. La solution S1 n'est pas plus fortement opalescente que la suspension témoin II (*2.2.1*) et elle est incolore (*2.2.2, Procédé II*).

**Absorbance de la solution S1** (*2.2.25*). Evaporez à siccité 100 mL de la solution S1. Dissolvez le résidu dans 5 mL d'*hexane R*. Filtrez, si nécessaire, sur un filtre préalablement rincé à l'*hexane R*. Examinez le filtrat de 250 nm à 310 nm. A aucune longueur d'onde, l'absorbance n'est supérieure à 0,25.

**Absorbance de la solution S2** (*2.2.25*) : au maximum 0,2 pour les matériaux stabilisés à l'étain ou 0,4 pour les autres matériaux, déterminé à toutes les longueurs d'onde entre 250 nm et 330 nm avec la solution S2.

**Baryum extractible** : au maximum 2 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner*. Solution S3.

*Solution témoin*. Solution à 0,1 ppm de baryum préparée par dilution de la *solution à 50 ppm de baryum (Ba) R* avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation du baryum située à 455,40 nm, le fond spectral étant évalué à 455,30 nm.

Vérifiez l'absence de baryum dans l'acide chlorhydrique utilisé.

L'émission à 455,40 nm de la solution à examiner n'est pas supérieure à celle de la solution témoin.

**Cadmium extractible** : au maximum 0,6 ppm.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner*. Solution S3.

*Solution témoin*. Solution à 0,03 ppm de cadmium préparée par dilution de la *solution à 0,1 pour cent de cadmium (Cd) R* avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

Vérifiez l'absence de cadmium dans l'acide chlorhydrique utilisé.

L'absorbance à 228,8 nm de la solution à examiner n'est pas supérieure à celle de la solution témoin.

**Matériaux stabilisés à l'étain** : au maximum 0,25 pour cent de Sn.

*Solution mère d'étain*. Prélevez 81 mg d'*additif pour plastique 23 SCR* et complétez à 100,0 mL avec du *tétrahydrofurane R*.

*Solution étalon d'étain*. Prélevez 20 mL de solution mère d'étain et complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 96 pour cent R*.

Dans un tube à essai, introduisez 0,10 mL de solution S2, ajoutez 0,05 mL d'*acide chlorhydrique 1 M*, 0,5 mL de *solution d'iodure de potassium R* et 5 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Mélangez soigneusement et attendez 5 min. Ajoutez 9 mL d'*eau R* et 0,1 mL d'une solution de *sulfite de sodium R* à 5 g/L ; mélangez soigneusement. Ajoutez 1,5 mL de *solution de dithizone R* diluée 100 fois extemporanément avec du *chlorure de méthylène R*, agitez 15 s et laissez reposer 2 min. Préparez simultanément une solution témoin dans les mêmes conditions en utilisant 0,1 mL de solution étalon d'étain.

Si la phase inférieure obtenue avec la solution S2 devient violette, sa couleur n'est pas plus intense que celle obtenue avec la solution témoin. La coloration bleu-vert de la solution de dithizone vire au rose en présence d'étain.

**Matériaux non stabilisés à l'étain** : au maximum 25 ppm de Sn.

Dans un tube à essai, introduisez 5 mL de solution S2, 0,05 mL d'*acide chlorhydrique 1 M* et 0,5 mL de *solution d'iodure de potassium R*. Mélangez soigneusement et attendez 5 min. Ajoutez 9 mL d'*eau R* et 0,1 mL d'une solution de *sulfite de sodium R* à 5 g/L ; mélangez soigneusement ; la solution obtenue doit être incolore, sinon rajoutez de la solution de sulfite de sodium par fraction de 0,05 mL. Ajoutez 1,5 mL de *solution de dithizone R* diluée 100 fois extemporanément avec du *chlorure de méthylène R*, agitez 15 s et laissez reposer 2 min. Préparez simultanément une solution témoin dans les mêmes conditions en utilisant 0,05 mL de solution étalon d'étain (voir essai ci-dessus).

Si la phase inférieure obtenue avec la solution S2 devient violette, sa couleur n'est pas plus intense que celle obtenue avec la solution témoin.

**Métaux lourd extractibles** (*2.4.8*) : au maximum 20 ppm.

12 mL de solution S3 satisfont à l'essai A. Préparez la solution témoin avec 10 mL de *solution à 1 ppm de plomb (Pb) R*.

**Zinc extractible** : au maximum 100 ppm.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner*. Diluez 10 fois la solution S3 avec de l'*eau R*.

*Solution témoin*. Solution à 0,50 ppm de zinc préparée par dilution de la *solution à 5 mg de zinc (Zn) par millilitre R* avec de l'*acide chlorhydrique 0,01 M*.

Vérifiez l'absence de zinc dans l'acide chlorhydrique utilisé.

L'absorbance à 214,0 nm de la solution à examiner n'est pas supérieure à celle de la solution de référence.

**Cendres sulfuriques** (*2.4.14*) : au maximum 1,0 pour cent, déterminé sur 1,0 g du matériau à examiner ; au maximum 4,0 pour cent lorsque les matériaux sont opacifiés par du dioxyde de titane.

DOSAGE

Sur 50,0 mg du matériau à examiner effectuez une combustion dans l'oxygène (*2.5.10*). Faites absorber les produits de la combustion par 20 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M*. A la solution obtenue, ajoutez 1 mL de *phtalate de dibutyle R*, 2,5 mL d'*acide nitrique R*, 5 mL de *solution de sulfate ferrique et d'ammonium R2* et 10,0 mL de *nitrate d'argent 0,1 M*. Titrez par le *thiocyanate d'ammonium 0,05 M* jusqu'à coloration jaune-rouge. Effectuez un titrage à blanc.

1 mL de *nitrate d'argent 0,1 M* correspond à 6,25 mg de poly(chlorure de vinyle).

**04/2009:30111**
**corrigé 7.0**

# 3.1.11. MATÉRIAUX À BASE DE POLY(CHLORURE DE VINYLE) NON PLASTIFIÉ POUR CONDITIONNEMENT DE FORMES PHARMACEUTIQUES SÈCHES POUR ADMINISTRATION PAR VOIE ORALE

DÉFINITION

Les matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) non plastifié pour conditionnement de formes pharmaceutiques sèches pour administration par voie orale sont adaptés à la préparation de feuilles ou de récipients, et sont constitués par 1 ou plusieurs poly(chlorure de vinyle/acétate de vinyle) ou par un mélange de poly(chlorure de vinyle) et de poly(acétate de vinyle) ou par un poly(chlorure de vinyle).

La teneur en chlore, exprimé en poly(chlorure de vinyle) est au minimum de 80 pour cent.

Ils peuvent contenir au maximum 15 pour cent de copolymères à base d'acides et/ou d'esters acryliques et/ou méthacryliques, et/ou de styrène et/ou de butadiène.

PRODUCTION

Les matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) non plastifié sont produits par des méthodes de polymérisation permettant de garantir une teneur en chlorure de vinyle résiduel inférieure à 1 ppm. Le procédé de fabrication est validé de façon à démontrer que le produit satisfait à l'essai du chlorure de vinyle suivant.

**Chlorure de vinyle**. Chromatographie en phase gazeuse à espace de tête (*2.2.28*).

*Solution d'étalon interne.* Au moyen d'une microseringue, injectez 10 μL d'*éther R* dans 20,0 mL de *diméthylacétamide R* en plongeant l'extrémité de l'aiguille dans le solvant. Immédiatement avant l'emploi, diluez la solution à 1000 fois son volume avec du *diméthylacétamide R*.

*Solution à examiner.* Dans un flacon de 50 mL, introduisez 1,000 g du matériau à examiner et 10,0 mL de solution d'étalon interne. Bouchez et sertissez. Agitez la solution en évitant que le liquide n'entre en contact avec le bouchon et placez le flacon dans un bain-marie à 60 ± 1 °C pendant 2 h.

*Solution mère de chlorure de vinyle. Préparez sous hotte ventilée.* Dans un flacon de 50 mL, introduisez 50,0 mL de *diméthylacétamide R*, bouchez et sertissez, puis pesez l'ensemble à 0,1 mg près. Remplissez une seringue de 50 mL en polyéthylène ou polypropylène avec du *chlorure de vinyle R* gazeux ; laissez le gaz en contact avec la seringue pendant environ 3 min ; videz la seringue, puis remplissez-la à nouveau avec 50 mL de *chlorure de vinyle R* gazeux. Adaptez à la seringue une aiguille hypodermique et ramenez le volume de gaz contenu dans la seringue de 50 mL à 25 mL ; injectez lentement ces 25 mL de chlorure de vinyle dans le flacon en agitant légèrement et en évitant le contact entre l'aiguille et le liquide. Pesez à nouveau le flacon : l'augmentation de masse est d'environ 60 mg (1 μL de la solution ainsi obtenue contient une quantité de chlorure de vinyle d'environ 1,2 μg). Laissez reposer pendant 2 h. Conservez la solution mère au réfrigérateur.

*Solution étalon de chlorure de vinyle* : solution mère de chlorure de vinyle, *diméthylacétamide R* (1:3 *V/V*).

*Solutions de référence.* Introduisez 10,0 mL de solution d'étalon interne, dans 6 flacons de 50 mL. Bouchez et sertissez. Dans 5 de ces flacons, injectez respectivement 1 μL, 2 μL, 3 μL, 5 μL et 10 μL de solution étalon de chlorure de vinyle. Les quantités de chlorure de vinyle contenu dans chacun des 6 flacons sont voisines respectivement de 0 μg, 0,3 μg, 0,6 μg, 0,9 μg, 1,5 μg et 3 μg. Agitez les solutions en évitant que le liquide n'entre en contact avec le bouchon et placez les flacons dans un bain-marie à 60 ± 1 °C pendant 2 h.

*Colonne* :
- *matériau* : acier inoxydable,
- *dimensions* : *l* = 3 m, Ø = 3 mm,
- *phase stationnaire* : *terre d'infusoires silanisée pour chromatographie en phase gazeuse R* imprégnée de 5 pour cent *m/m* de *diméthylstéarylamide R* et de 5 pour cent *m/m* de *macrogol 400 R*.

*Gaz vecteur* : *azote pour chromatographie R*.

*Débit* : 30 mL/min.

*Température* :
- *colonne* : 45 °C,
- *chambre à injection* : 100 °C,
- *détecteur* : 150 °C.

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 mL de l'espace de tête.

*Limite* :
- *chlorure de vinyle* : au maximum 1 ppm.

**Additifs**

Dans le but d'obtenir les caractéristiques mécaniques et la stabilité souhaitées, les matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) non plastifié peuvent contenir les constituants suivants :
- huile de soja époxydée dont la teneur en oxygène oxirane est de 6 pour cent à 8 pour cent et dont l'indice d'iode est au maximum de 6 pour les matériaux stabilisés à l'étain : au maximum 2 pour cent,
- huile de soja époxydée dont la teneur en oxygène oxirane est de 6 pour cent à 8 pour cent et dont l'indice d'iode n'est pas supérieur à 6 pour les matériaux non stabilisés à l'étain : au maximum 3 pour cent,
- sels de calcium, de magnésium ou de zinc, d'acides gras aliphatiques à plus de 7 atomes de carbone : au maximum 1,5 pour cent ou au maximum 1,5 pour cent de leur mélange,
- cires : au maximum 4 pour cent,
- paraffine liquide : au maximum 1,5 pour cent,
- huiles hydrogénées ou esters d'acides gras aliphatiques : au maximum 2 pour cent,
- somme des pourcentages des 3 agents lubrifiants précédents : au maximum 4 pour cent,
- esters de macrogol : au maximum 1,5 pour cent,
- sorbitol : au maximum 1,5 pour cent,
- phosphite de 2,4-dinonylphényle, phosphite de di(4-nonylphényle) ou phosphite de tris(nonylphényle) : au maximum 1 pour cent,
- carbonate de calcium : au maximum 1 pour cent,
- silice : au maximum 1 pour cent.

Les matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) non plastifié peuvent contenir selon les cas, l'un des 3 groupes de stabilisants suivants (l'isooctyle étant, par exemple, le 2-éthylhexyle) :
- étain sous forme de 2,2′-[(dioctylstannylène)bis(thio)]diacétate de di(isooctyle) contenant environ 27 pour cent de 2,2′,2″-[(monooctylstannylidyne)tris(thio)]triacétate de tri(isooctyle) : au maximum 0,25 pour cent,
- étain sous forme d'un mélange contenant au maximum 76 pour cent de 2,2′-[(diméthylstannylène)bis(thio)]diacétate de di(isooctyle) et au maximum 85 pour cent de 2,2′,2″-[(monométhylstannylidyne)tris(thio)]triacétate de tri(isooctyle) : au maximum 0,25 pour cent,
- 1-phényleicosane-1,3-dione (benzoylstéaroylméthane) : au maximum 1 pour cent.

Certains matériaux peuvent renfermer un pigment ou un colorant et peuvent être opacifiés par du dioxyde de titane.

Le fournisseur du matériau fini devra pouvoir démontrer que la composition qualitative et quantitative retenue pour l'échantillon type est satisfaisante pour chaque lot de production.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudres, billes, granulés, feuilles d'épaisseur variable ou échantillons provenant d'objet finis.

*Solubilité* : insoluble dans l'eau, soluble dans le tétrahydrofurane, peu soluble dans le chlorure de méthylène, insoluble dans l'éthanol anhydre.

Il brûle avec une flamme jaune-orange bordée de vert en dégageant une épaisse fumée noire.

IDENTIFICATION

Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*).

*Préparation.* Dissolvez le résidu A (voir Essai : solution S2) dans 5 mL de *tétrahydrofurane R*. Déposez quelques gouttes de la solution sur une lame de chlorure de sodium et évaporez à siccité à l'étuve à 100-105 °C.

*Maximums d'absorption* : à 2975 $cm^{-1}$, 2910 $cm^{-1}$, 2865 $cm^{-1}$, 1430 $cm^{-1}$, 1330 $cm^{-1}$, 1255 $cm^{-1}$, 690 $cm^{-1}$ et 615 $cm^{-1}$.

Le spectre obtenu est identique au spectre du matériau sélectionné pour l'échantillon type.

ESSAI

*Si nécessaire, découpez les échantillons de matériau à examiner en fragments de 1 cm de côté au maximum.*

**Solution S1**. Dans un ballon de verre borosilicaté, introduisez 25 g de matériau à examiner. Ajoutez 500 mL d'*eau R* et recouvrez le col du ballon d'une feuille en aluminium ou d'un vase de verre borosilicaté. Chauffez à l'autoclave à 121 ± 2 °C pendant 20 min. Laissez refroidir et décanter la solution.

**Solution S2**. Dissolvez 5,0 g de matériau à examiner dans 80 mL de *tétrahydrofurane R*, puis complétez à 100 mL avec le même solvant. Filtrez si nécessaire (la solution peut demeurer opalescente). Prélevez 20 mL de la solution et ajoutez, goutte

à goutte et en agitant doucement, 70 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*, puis refroidissez dans la glace pendant 1 h. Filtrez ou centrifugez (résidu A). Lavez le résidu A avec de l'*éthanol à 96 pour cent R* et réunissez la solution de lavage au filtrat ou au liquide de centrifugation, puis complétez à 100 mL avec de l'*éthanol à 96 pour cent R*.

**Solution S3**. Dans un ballon de verre borosilicaté à col rodé, introduisez 5 g de matériau à examiner. Ajoutez 100 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* et chauffez à reflux pendant 1 h. Laissez refroidir et décanter la solution.

**Aspect de la solution S1**. La solution S1 n'est pas plus fortement opalescente que la suspension témoin II (*2.2.1*) et elle est incolore (*2.2.2, Procédé II*).

**Absorbance de la solution S1** (*2.2.25*). Evaporez à siccité 100 mL de la solution S1. Dissolvez le résidu dans 5 mL d'*hexane R*. Filtrez, si nécessaire, sur un filtre préalablement rincé à l'*hexane R*. Examinez la solution ou le filtrat de 250 nm à 310 nm. A aucune longueur d'onde, l'absorbance n'est supérieure à 0,3.

**Absorbance de la solution S2** (*2.2.25*) : au maximum 1,0, déterminé à toutes les longueurs d'onde entre 250 nm et 330 nm avec la solution S2, pour un matériau qui ne contient pas de 1-phényleicosane-1,3-dione ; au maximum 0,4, déterminé à toutes les longueurs d'onde entre 250 nm et 330 nm avec la solution S2 diluée 10 fois avec de l'*éthanol à 96 pour cent R*, pour un matériau qui contient de la 1-phényleicosane-1,3-dione.

**Matériaux stabilisés à l'étain** : au maximum 0,25 pour cent de Sn.

*Solution mère d'étain*. Prélevez 81 mg d'*additif pour plastique 23 SCR* et complétez à 100,0 mL avec du *tétrahydrofurane R*.

*Solution étalon d'étain*. Prélevez 20 mL de solution mère d'étain et complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 96 pour cent R*.

Dans un tube à essai, introduisez 0,10 mL de solution S2, ajoutez 0,05 mL d'*acide chlorhydrique 1 M*, 0,5 mL de *solution d'iodure de potassium R* et 5 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Mélangez soigneusement et attendez 5 min. Ajoutez 9 mL d'*eau R* et 0,1 mL d'une solution de *sulfite de sodium R* à 5 g/L ; mélangez soigneusement. Ajoutez 1,5 mL de *solution de dithizone R* diluée 100 fois extemporanément avec du *chlorure de méthylène R*, agitez 15 s et laissez reposer 2 min. Préparez simultanément une solution témoin dans les mêmes conditions en utilisant 0,1 mL de solution étalon d'étain.

Si la phase inférieure obtenue avec la solution S2 devient violette, sa couleur n'est pas plus intense que celle obtenue avec la solution témoin. La coloration bleu-vert de la solution de dithizone vire au rose en présence d'étain.

**Matériaux non stabilisés à l'étain** : au maximum 25 ppm de Sn.

Dans un tube à essai, introduisez 5 mL de solution S2, 0,05 mL d'*acide chlorhydrique 1 M* et 0,5 mL de *solution d'iodure de potassium R*. Mélangez soigneusement et attendez 5 min. Ajoutez 9 mL d'*eau R* et 0,1 mL d'une solution de *sulfite de sodium R* à 5 g/L ; mélangez soigneusement ; la solution obtenue doit être incolore, sinon rajoutez de la solution de sulfite de sodium par fraction de 0,05 mL. Ajoutez 1,5 mL de *solution de dithizone R* diluée 100 fois extemporanément avec du *chlorure de méthylène R*, agitez 15 s et laissez reposer 2 min. Préparez simultanément une solution témoin dans les mêmes conditions en utilisant 0,05 mL de solution étalon d'étain (voir essai ci-dessus).

Si la phase inférieure obtenue avec la solution S2 devient violette, sa couleur n'est pas plus intense que celle obtenue avec la solution témoin.

**Métaux lourds extractibles** (*2.4.8*) : au maximum 20 ppm.

12 mL de solution S3 satisfont à l'essai A. Préparez la solution témoin avec 10 mL de *solution à 1 ppm de plomb (Pb) R*.

**Zinc extractible** : au maximum 100 ppm.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner*. Diluez 10 fois la solution S3 avec de l'*eau R*.

*Solution témoin*. Solution à 0,50 ppm de zinc préparée par dilution de la *solution à 5 mg de zinc (Zn) par millilitre R* avec de l'*acide chlorhydrique 0,01 M*.

Vérifiez l'absence de zinc dans l'acide chlorhydrique utilisé.

L'absorbance à 214,0 nm de la solution à examiner n'est pas supérieure à celle de la solution témoin.

**Cendres sulfuriques** (*2.4.14*) : au maximum 1,0 pour cent, déterminé sur 1,0 g de matériau à examiner ; au maximum 4,0 pour cent lorsque les matériaux sont opacifiés par du dioxyde de titane.

DOSAGE

Sur 50,0 mg de matériau à examiner effectuez une combustion dans l'oxygène (*2.5.10*). Faites absorber les produits de la combustion par 20 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M*. A la solution obtenue, ajoutez 2,5 mL d'*acide nitrique R*, 10,0 mL de *nitrate d'argent 0,1 M*, 5 mL de *solution de sulfate ferrique et d'ammonium R2* et 1 mL de *phtalate de dibutyle R*. Titrez par le *thiocyanate d'ammonium 0,05 M* jusqu'à coloration jaune-rouge. Effectuez un titrage à blanc.

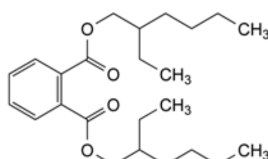
1 mL de *nitrate d'argent 0,1 M* correspond à 6,25 mg de poly(chlorure de vinyle).

**01/2008:30113**
**corrigé 6.2**

# 3.1.13. ADDITIFS POUR PLASTIQUES

*NOTE : la dénomination selon les règles IUPAC est donnée en premier lieu. Le synonyme indiqué en gras correspond à la dénomination reprise dans les textes du Chapitre 3. Le synonyme donné en anglais correspond à la dénomination selon les règles des « Chemical Abstracts ».*

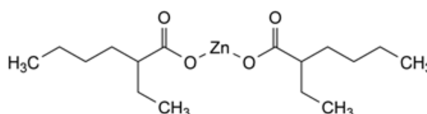
**add01**. $C_{24}H_{38}O_4$. [117-81-7]. PM RN 74640.




benzène-1,2-dicarboxylate de (2*RS*)-2-éthylhexyle

synonymes :
- **phtalate de di(2-éthylhexyle),**
- 1,2-benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester.

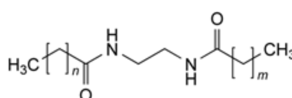
**add02**. $C_{16}H_{30}O_4Zn$. [136-53-8]. PM RN 54120.




(2*RS*)-2-éthylhexanoate de zinc

synonymes :
- **octanoate de zinc,**
- 2-ethylhexanoic acid, zinc salt (2:1),
- 2-éthylcaproate de zinc.

**add03**. [05518-18-3]/[00110-30-5]. PM RN 53440/53520.




*N,N'*-éthylènedialcanamide (avec *n* et *m* = 14 ou 16)

synonymes : – ***N,N′*-diacyléthylènediamines,**

– *N,N′*-diacyléthylènediamine (acyl, dans ce contexte, indique notamment palmitoyl et stéaroyl).

**add04**. [8013-07-8]. PM RN 88640.

huile de soja époxydée

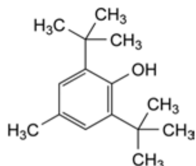
**add05**. [8016-11-3]. PM RN 64240.

huile de lin époxydée

**add06**. [57455-37-5](TSCA)/[101357-30-6] (EINECS)/Pigment blue 29 (CI 77007).

bleu outremer

**add07**. $C_{15}H_{24}O$. [128-37-0]. PM RN 46640.



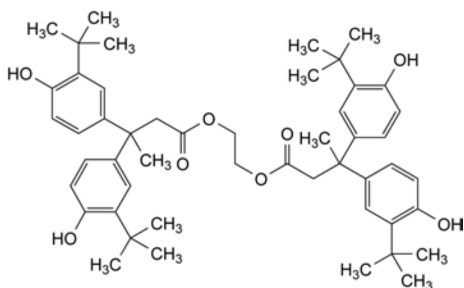

2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-méthylphénol

synonymes : – **butylhydroxytoluène,**

– 2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-méthylphénol,

– 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthylphénol.

**add08**. $C_{50}H_{66}O_8$. [32509-66-3]. PM RN 53670.



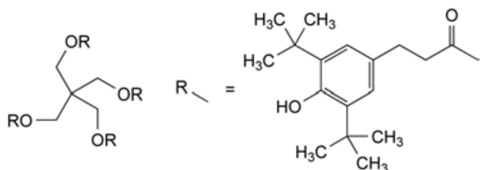

bis[3,3-bis[3-(1,1-diméthyléthyl)-4-hydroxyphényl]butanoate] d'éthylène

synonymes : – **bis[3,3-bis[3-(1,1-diméthyléthyl)-4-hydroxyphényl]butanoate] d'éthylène,**

– butanoic acid, 3,3-bis[3-(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenyl]-, 1,2-ethanediyl ester,

– bis[3,3-bis(3-*tert*-butyl-4-hydroxyphényl)-butyrate] d'éthylène.

**add09**. $C_{73}H_{108}O_{12}$. [6683-19-8]. PM RN 71680.



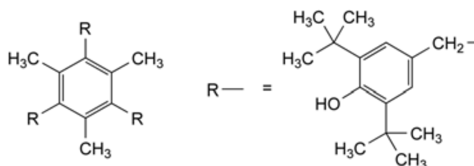

tétrakis[3-[3,5-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-hydroxyphényl]-propanoate] de méthanetétryltétraméthyle

synonymes : – **tétrakis[3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphényl)propionate] de pentaérythrityle,**

– tétrakis[3-[3,5-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-hydroxyphényl]propanoate] de 2,2-bis(hydroxyméthyl)propane-1,3-diol,

– benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-, 2,2-bis[[3-[3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenyl]-1-oxopropoxy]methyl]-1,3-propanediyl ester.

**add10**. $C_{54}H_{78}O_3$. [1709-70-2]. PM RN 95200.



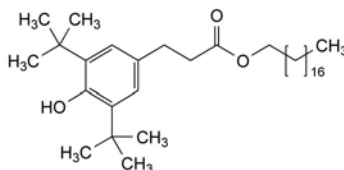

4,4′,4″-(2,4,6-triméthylbenzène-1,3,5-triyltrisméthylène)-tris[2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)phénol]

synonymes : – **4,4′,4″-(2,4,6-triméthylbenzène-1,3,5-triyltrisméthylène)tris[2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)phénol],**

– phenol, 4,4′,4″-[(2,4,6-trimethyl-1,3,5-benzenetriyl)tris(methylene)]tris[2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-,

– 1,3,5-tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl)-2,4,6-triméthylbenzène.

**add11**. $C_{35}H_{62}O_3$. [2082-79-3]. PM RN 68320.

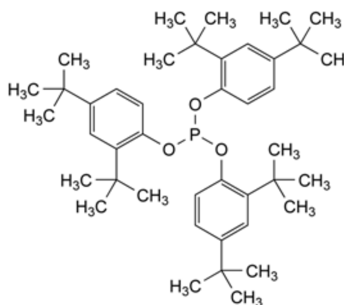



3-[3,5-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-hydroxyphényl]propanoate d'octadécyle

synonymes : – **3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphényl)propionate d'octadécyle,**

– propanoic acid, 3-[3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenyl], octadecyl ester.

**add12**. $C_{42}H_{63}O_3P$. [31570-04-4]. PM RN 74240.



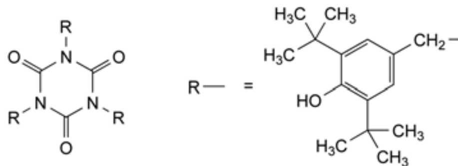

phosphite de tris[2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)phényle]

synonymes : – **phosphite de tris[2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)phényle],**

– phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-, phosphite (3:1),

– phosphite de 2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)-phényle.

**add13**. $C_{48}H_{69}N_3O_6$. [27676-62-6]. PM RN 95360.

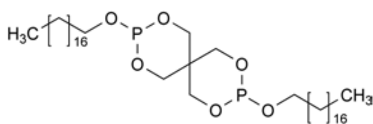



1,3,5-tris[3,5-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-hydroxybenzyl]-1,3,5-triazine-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-trione

synonymes : – **1,3,5-tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl)-*s*-triazine-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-trione,**

– 1,3,5-triazine-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-trione, 1,3,5-tris[[3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenyl]methyl]-.

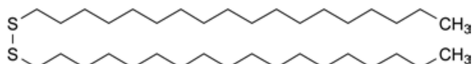
**add14**. $C_{41}H_{82}O_6P_2$. [3806-34-6]. PM RN 50080.



3,9-bis(octadécyloxy)-2,4,8,10-tétraoxa-3,9-diphosphaspiro[5.5]undécane

synonymes :
- **2,2′-bis(octadécyloxy)-5,5′-spirobi[1,3,2-dioxaphosphinane],**
- 2,4,8,10-tetraoxa-3,9-diphosphaspiro[5.5]-undecane, 3,9-bis(octadecyloxy)-.

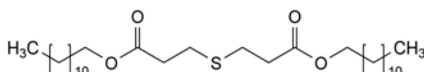
**add15**. $C_{36}H_{74}S_2$. [2500-88-1]. PM RN 49840.



1,1′-disulfanediyldioctadécane

synonymes :
- **disulfure de dioctadécyle,**
- octadecane, 1,1′-dithio-.

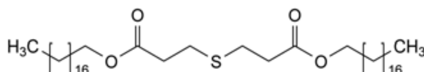
**add16**. $C_{30}H_{58}O_4S$. [123-28-4]. PM RN 93120.



3,3′-sulfanediyldipropanoate de didodécyle

synonymes :
- **3,3′-thiodipropanoate de didodécyle,**
- propanoic acid, 3,3′-thiobis-, dodecyl diester,
- thiodipropionate de lauryle.

**add17**. $C_{42}H_{82}O_4S$. [693-36-7]. PM RN 93280.

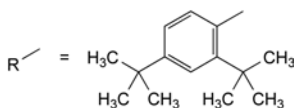


3,3′-sulfanediyldipropanoate de dioctadécyle

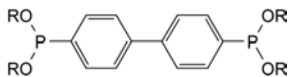
synonymes :
- **3,3′-thiodipropanoate de dioctadécyle,**
- propanoic acid, 3,3′-thiobis-, octadecyl diester,
- thiodipropionate de stéaryle.

**add18**. [119345-01-6]. PM RN 92560.

Mélange de 7 composants correspondant aux produits de réaction du produit de réaction du phosphonite de di-*tert*-butyle avec du trichlorure biphosphoreux, avec du biphényle et du 2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)phénol :

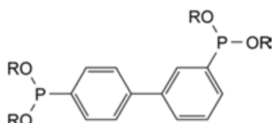


*composant I*



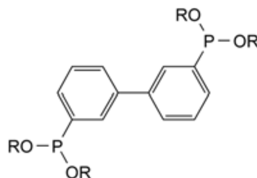
biphényl-4,4′-diyldiphosphonite de 2,4-bis(1,1-diméthylethyl)phényle

*composant II*



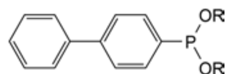
biphényl-3,4′-diyldiphosphonite de 2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)phényle

*composant III*



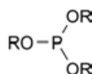
biphényl-3,3′-diyldiphosphonite de 2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)phényle

*composant IV*



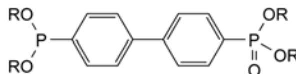
biphényl-4-ylphosphonite de 2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)phényle

*composant V*



phosphite de 2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)phényle

*composant VI*

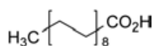


4′-[bis[2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)phénoxy]phosphanyl]biphényl-4-ylphosphonate de 2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)phényle

*composant VII*

R-OH : 2,4-bis(1,1-diméthyléthyl)phénol

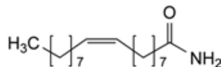
**add19**. $C_{18}H_{36}O_2$. [57-11-4]. PM RN 24550.



acide octadécanoïque

synonymes :
- **acide stéarique,**
- octadecanoic acid.

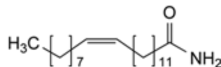
**add20**. $C_{18}H_{35}NO$. [301-02-0]. PM RN 68960.



(*Z*)-octadéc-9-énamide

synonymes :
- **oléamide,**
- 9-octadecenamide, (*Z*)-,
- 9-*cis*-oléamide.

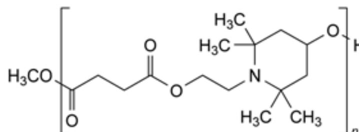
**add21**. $C_{22}H_{43}NO$. [112-84-5]. PM RN 52720.



(*Z*)-docos-13-énamide

synonymes :
- **érucamide,**
- 13-docosenamide, (*Z*)-,
- 13-*cis*-docosénamide.

**add22**. [65447-77-0]. PM RN 60800.



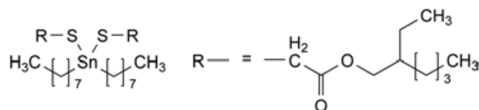
copolymère de butanedioate de diméthyle et de 1-(2-hydroxyéthyl)-2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-4-ol

synonymes :
- **copolymère de succinate de diméthyle et de (4-hydroxy-2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)éthanol.**

**add23**.

mélange du composant I et d'environ 27 pour cent du composant II

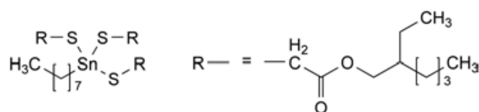
*composant I* [26401-97-8]



2,2′-[(dioctylstannanetriyl)bis(sulfanediyl)]diacétate de bis[(2*RS*)-2-éthylhexyle]

synonymes
– **2,2′-[(dioctylstannylène)bis(thio)]diacétate de di(isooctyle),**
– bis(isooctyloxycarbonylméthylthio)-dioctylstannane.

*composant II* [26401-86-5]



2,2′,2″-[(octylstannanetriyl)tris(sulfanediyl)]triacétate de tris[(2*RS*)-2-éthylhexyle]

synonymes:
– **2,2′,2″-[(monooctylstannylidyne)-tris(thio)]triacétate de tri(isooctyle),**
– ester triisooctylique de l'acide 2,2′,2″-[(octylstannylidyne)tris(thio)] triacétique.

**01/2008:30114**
**corrigé 7.0**

# 3.1.14. MATÉRIAUX À BASE DE POLY(CHLORURE DE VINYLE) PLASTIFIÉ POUR RÉCIPIENTS DESTINÉS À CONTENIR LES SOLUTIONS AQUEUSES POUR PERFUSION INTRAVEINEUSE

DÉFINITION

Les matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) plastifié renferment au minimum 55 pour cent de poly(chlorure de vinyle) et contiennent des additifs variés, en plus du polymère de masse moléculaire élevée obtenu par polymérisation du chlorure de vinyle.

Les matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) plastifié pour récipients destinés à contenir les solutions aqueuses pour perfusion intraveineuse sont définis par la nature et la proportion des composants entrant dans leur fabrication.

PRODUCTION

Les matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) plastifié sont produits par des méthodes de polymérisation permettant de garantir une teneur en chlorure de vinyle résiduel inférieure à 1 ppm. La méthode de production utilisée est validée de façon à démontrer que le produit satisfait à l'essai suivant.

**Chlorure de vinyle**. Chromatographie en phase gazeuse à espace de tête (*2.2.28*).

*Solution d'étalon interne*. Au moyen d'une microseringue, injectez 10 µL d'*éther R* dans 20,0 mL de *diméthylacétamide R* en plongeant l'extrémité de l'aiguille dans le solvant. Immédiatement avant l'emploi, diluez la solution à 1000 fois son volume avec du *diméthylacétamide R*.

*Solution à examiner*. Dans un flacon de 50 mL, introduisez 1,000 g du matériau à examiner et 10,0 mL de solution d'étalon interne. Bouchez et sertissez. Agitez la solution en évitant que le liquide entre en contact avec le bouchon et placez le flacon dans un bain-marie à 60 ± 1 °C pendant 2 h.

*Solution mère de chlorure de vinyle*. *Préparez sous hotte ventilée*. Dans un flacon de 50 mL, introduisez 50,0 mL de *diméthylacétamide R*, bouchez et sertissez, puis pesez l'ensemble à 0,1 mg près. Remplissez une seringue de 50 mL en polyéthylène ou polypropylène avec du *chlorure de vinyle R* gazeux ; laissez le gaz en contact avec la seringue pendant environ 3 min ; videz la seringue, puis remplissez-la à nouveau avec 50 mL de *chlorure de vinyle R* gazeux. Adaptez à la seringue une aiguille hypodermique et ramenez le volume de gaz contenu dans la seringue de 50 mL à 25 mL ; injectez lentement les 25 mL restant de chlorure de vinyle dans le flacon en agitant légèrement et en évitant tout contact entre l'aiguille et le liquide. Pesez à nouveau le flacon : l'augmentation de masse est d'environ 60 mg (1 µL de la solution ainsi obtenue contient une quantité de chlorure de vinyle d'environ 1,2 µg). Laissez reposer pendant 2 h. Conservez la solution mère au réfrigérateur.

*Solution étalon de chlorure de vinyle* : solution mère de chlorure de vinyle, *diméthylacétamide R* (1:3 *V/V*).

*Solutions de référence*. Dans 6 flacons de 50 mL, introduisez 10,0 mL de solution d'étalon interne. Bouchez et sertissez. Dans 5 de ces flacons, injectez respectivement 1 µL, 2 µL, 3 µL, 5 µL et 10 µL de solution étalon de chlorure de vinyle. Les quantités de chlorure de vinyle contenues dans chacun des 6 flacons sont voisines respectivement de 0 µg, 0,3 µg, 0,6 µg, 0,9 µg, 1,5 µg et 3 µg. Agitez les solutions en évitant que le liquide entre en contact avec le bouchon et placez les flacons dans un bain-marie à 60 ± 1 °C pendant 2 h.

*Colonne* :
- *matériau* : acier inoxydable,
- *dimensions* : *l* = 3 m, Ø = 3 mm,
- *phase stationnaire* : *terre d'infusoires silanisée pour chromatographie en phase gazeuse R* imprégnée de 5 pour cent *m/m* de *diméthylstéarylamide R* et de 5 pour cent *m/m* de *macrogol 400 R*.

*Gaz vecteur* : *azote pour chromatographie R*.

*Débit* : 30 mL/min.

*Température* :
- *colonne* : 45 °C,
- *chambre à injection* : 100 °C,
- *détecteur* : 150 °C.

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 mL de l'espace de tête.

*Limite* :
- *chlorure de vinyle* : au maximum 1 ppm.

**Additifs**

Un certain nombre d'additifs sont ajoutés aux polymères de base afin d'optimiser leurs propriétés chimiques, physiques et mécaniques et ainsi de les adapter au mieux à l'usage qui en sera fait. Tous les additifs sont choisis dans la liste suivante, qui spécifie pour chaque produit la teneur maximale admise :
- phtalate de di(2-éthylhexyle) (additif pour plastique 01) : au maximum 40 pour cent,
- octanoate de zinc (2-éthylhexanoate de zinc) (additif pour plastique 02) : au maximum 1 pour cent,
- stéarate de calcium ou stéarate de zinc : au maximum 1 pour cent ou 1 pour cent de leur mélange,
- *N,N′*-diacyléthylènediamines (additif pour plastique 03) : au maximum 1 pour cent,



3. Matériaux/ Récipients

– au maximum 10 pour cent de l'une des 2 huiles époxydées suivantes ou 10 pour cent de leur mélange :
  – huile de soja époxydée (additif pour plastique 04) dont la teneur en oxygène oxirane est de 6 pour cent à 8 pour cent et dont l'indice d'iode est au maximum de 6,
  – huile de lin époxydée (additif pour plastique 05) dont la teneur en oxygène oxirane est au maximum de 10 pour cent et dont l'indice d'iode est au maximum de 7.

Lorsqu'une substance colorante est ajoutée, le bleu outremer est utilisé. D'autres pigments inorganiques peuvent être ajoutés sous réserve que l'innocuité du matériau pour l'usage retenu ait été démontrée de manière à satisfaire les autorités compétentes. De très faibles quantités d'antioxydants ajoutés au monomère (chlorure de vinyle) peuvent être détectées dans le polymère.

Le fournisseur du matériau doit pouvoir démontrer que la composition qualitative et quantitative retenue pour l'échantillon type est satisfaisante pour chaque lot de production.

## CARACTÈRES

Poudre, billes, granulés ou, après transformation, feuilles translucides d'épaisseur variable, incolores ou jaune pâle, d'odeur faible. A la combustion, ils dégagent une épaisse fumée noire.

## IDENTIFICATION

*Découpez préalablement, si nécessaire, les échantillons de matériau à examiner en morceaux de 1 cm de côté au maximum.*

Chauffez à reflux 2,0 g de matériau à examiner avec 200 mL d'*éther exempt de peroxyde R* pendant 8 h. Séparez par filtration la solution A et le résidu B.

Evaporez à siccité la solution A sous pression réduite dans un bain-marie à 30 °C. Dissolvez le résidu dans 10 mL de *toluène R* (solution A1). Dissolvez le résidu B dans 60 mL de *chlorure d'éthylène R* en chauffant au bain-marie à reflux. Filtrez. Versez la solution obtenue, goutte à goutte et en agitant vigoureusement, dans 600 mL d'*heptane R* chauffé à une température voisine de son point d'ébullition. Séparez par filtration à chaud le coagulum B1 de la solution organique. Laissez refroidir cette dernière. Recueillez le précipité B2 qui se forme, sur un filtre de verre fritté (40) (*2.1.2*) préalablement taré.

A. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*).

   *Préparation*. Dissolvez le coagulum B1 dans 30 mL de *tétrahydrofurane R*, puis ajoutez par petits volumes et en agitant 40 mL d'*éthanol anhydre R*. Séparez le précipité B3 en filtrant et séchez sous vide sur du *pentoxyde de diphosphore R* à une température ne dépassant pas 50 °C. Dissolvez quelques milligrammes du précipité B3, dans 1 mL de *tétrahydrofurane R*. Déposez quelques gouttes de la solution sur une lame de chlorure de sodium et évaporez à siccité à l'étuve à 100-105 °C.

   *Comparaison* : *poly(chlorure de vinyle) SCR*.

B. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*). Examinez le résidu C obtenu dans l'essai des additifs pour plastique 01, 04 et 05.

   *Comparaison* : *additif pour plastique 01 SCR*.

## ESSAI

*Découpez préalablement, si nécessaire, les échantillons de matériau à examiner en morceaux de 1 cm de côté au maximum.*

**Solution S1**. Dans un matras à minéralisation, introduisez 5,0 g du matériau à examiner. Ajoutez 30 mL d'*acide sulfurique R* et chauffez jusqu'à obtention d'une masse sirupeuse noire. Refroidissez et ajoutez avec précaution 10 mL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R*. Chauffez modérément, laissez refroidir et ajoutez 1 mL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R*. Répétez en alternant l'évaporation et l'addition de solution concentrée de peroxyde d'hydrogène jusqu'à obtention d'un liquide incolore. Réduisez le volume à environ 10 mL, refroidissez et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution S2**. Dans un ballon de verre borosilicaté, introduisez 25 g du matériau à examiner. Ajoutez 500 mL d'*eau pour préparations injectables R* et recouvrez le col du ballon d'une feuille d'aluminium ou d'un vase de verre borosilicaté. Chauffez à l'autoclave à 121 ± 2 °C pendant 20 min. Laissez refroidir et décantez la solution.

**Aspect de la solution S2**. La solution S2 est limpide (*2.2.1*) et incolore (*2.2.2, Procédé II*).

**Acidité ou alcalinité**. A 100 mL de solution S2, ajoutez 0,15 mL de *solution d'indicateurs BRP R*. Le virage de l'indicateur au bleu ne nécessite pas plus de 1,5 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*. A 100 mL de solution S2, ajoutez 0,2 mL de *solution de méthylorange R*. Le début du virage de l'indicateur du jaune à l'orange ne nécessite pas plus de 1,0 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M*.

**Absorbance** (*2.2.25*). Evaporez à siccité 100,0 mL de solution S2. Dissolvez le résidu dans 5,0 mL d'*hexane R*. De 250 nm à 310 nm, l'absorbance n'est pas supérieure à 0,25.

**Substances réductrices**. *Effectuez l'essai dans les 4 h qui suivent la préparation de la solution S2*. A 20,0 mL de solution S2, ajoutez 1 mL d'*acide sulfurique dilué R* et 20,0 mL de *permanganate de potassium 0,002 M*. Chauffez à reflux pendant 3 min et refroidissez immédiatement. Ajoutez 1 g d'*iodure de potassium R* et titrez immédiatement par le *thiosulfate de sodium 0,01 M* en présence de 0,25 mL de *solution d'amidon R*. Effectuez un titrage à blanc avec 20 mL d'*eau pour préparations injectables R*. La différence entre les volumes utilisés dans les 2 titrages est au maximum de 2,0 mL.

**Amines primaires aromatiques** : au maximum 20 ppm.

A 2,5 mL de solution A1 obtenue au cours de l'identification, ajoutez 6 mL d'*eau R* et 4 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M*. Agitez énergiquement et rejetez la phase supérieure. A la phase inférieur, ajoutez 0,4 mL d'une solution récemment préparée de *nitrite de sodium R* à 10 g/L, mélangez et laissez reposer pendant 1 min. Ajoutez 0,8 mL d'une solution de *sulfamate d'ammonium R* à 25 g/L et laissez reposer pendant 1 min. Ajoutez 2 mL d'une solution de *dichlorhydrate de naphtyléthylènediamine R* à 5 g/L. Préparez un témoin dans les mêmes conditions en remplaçant la phase aqueuse par un mélange de 1 mL d'une solution de *naphtylamine R* à 0,01 g/L dans l'*acide chlorhydrique 0,1 M*, de 5 mL d'*eau R* et de 4 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M*. Après 30 min, si la solution présente une coloration, celle-ci n'est pas plus intense que celle du témoin.

**Additifs pour plastique 01, 04 et 05**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution témoins*. Préparez des solutions contenant 0,1 mg/mL respectivement d'*additif pour plastique 01 SCR*, d'*additif pour plastique 04 SCR* et d'*additif pour plastique 05 SCR* dans le *toluène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice* $GF_{254}$ *pour CCM R*.

*Phase mobile* : *toluène R*.

*Dépôt* : 0,5 mL de la solution A1 obtenue au cours de l'identification en bande de 30 mm sur 3 mm et 5 µL de chaque solution témoin.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

Repérez la bande correspondant à l'additif pour plastique 01 ($R_F$ = environ 0,4). Prélevez la bande de gel de silice correspondant à l'additif pour plastique 01 et agitez le prélèvement avec 40 mL d'*éther R* pendant 1 min. Filtrez, rincez 2 fois la silice avec 10 mL d'*éther R*, ajoutez au filtrat et évaporez à siccité. La masse du résidu C est au maximum de 40 mg.

*Détection B* : exposez la plaque aux vapeurs d'iode pendant 5 min.

Examinez le chromatogramme et repérez les bandes correspondant aux additifs pour plastique 04 et 05 ($R_F$ = 0). Prélevez la bande de gel de silice correspondante. Prélevez parallèlement une portion équivalente de gel de silice qui servira de blanc. Agitez séparément les 2 prélèvements avec 40 mL de *méthanol R* pendant 15 min. Filtrez, rincez 2 fois la silice avec 10 mL de *méthanol R*, joignez aux filtrats et évaporez à siccité. La différence de masse entre les 2 résidus est au maximum de 10 mg.

**Additif pour plastique 03**. Spectrophotométrie dans l'infrarouge (*2.2.24*).

*Préparation*. Lavez avec de l'*éthanol anhydre R* le précipité B2 obtenu au cours de l'identification et contenu dans le filtre de verre fritté (40) (*2.1.2*) préalablement taré. Séchez sur du *pentoxyde de diphosphore R* jusqu'à masse constante, puis pesez le filtre. La masse du résidu est au maximum de 20 mg.

*Comparaison* : *additif pour plastique 03 SCR*.

**Baryum** : au maximum 5 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner*. Dans un creuset de silice, calcinez 1,0 g du matériau à examiner. Reprenez le résidu par 10 mL d'*acide chlorhydrique R* et évaporez au bain-marie à siccité. Reprenez le residu par 20 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Solution témoin*. Solution à 0,25 ppm de baryum préparée par dilution de la *solution à 50 ppm de baryum (Ba) R* avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation du baryum située à 455,40 nm, le fond spectral étant évalué à 455,30 nm.

Vérifiez l'absence de baryum dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Cadmium** : au maximum 0,6 ppm.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner*. Evaporez à siccité 10 mL de solution S1. Reprenez le résidu par 5 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 1 pour cent *V/V*, filtrez et complétez à 10,0 mL avec le même acide.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 0,1 pour cent de cadmium (Cd) R* diluée avec une solution d'*acide chlorhydrique R* à 1 pour cent *V/V*.

*Source* : lampe à cathode creuse au cadmium.

*Longueur d'onde* : 228,8 nm.

*Dispositif d'atomisation* : flamme air-acétylène.

Vérifiez l'absence de cadmium dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Calcium** : au maximum 0,07 pour cent.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner*. Utilisez la solution à examiner préparée pour la détermination du baryum.

*Solution témoin*. Solution à 50,0 ppm de calcium préparée par dilution de la *solution à 400 ppm de calcium (Ca) R* avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation du calcium située à 315,89 nm, le fond spectral étant évalué à 315,60 nm.

Vérifiez l'absence de calcium dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Etain** : au maximum 20 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner*. Diluez 10 fois avec de l'*eau R* la solution S1 immédiatement avant l'emploi.

*Solution témoin*. Dans une fiole jaugée de 50 mL contenant 5 mL d'une solution d'*acide sulfurique R* à 20 pour cent *V/V*, introduisez 2 mL de *solution à 5 ppm d'étain (Sn) R* et complétez à 50 mL avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

*Longueur d'onde* : utilisez la radiation de l'étain située à 189,99 nm, le fond spectral étant évalué à 190,10 nm.

Vérifiez l'absence d'étain dans l'acide sulfurique utilisé.

**Zinc** : au maximum 0,2 pour cent.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner*. Diluez 100 fois la solution S1 avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 100 ppm de zinc (Zn) R* diluée avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Source* : lampe à cathode creuse au zinc.

*Longueur d'onde* : 213,9 nm.

*Dispositif d'atomisation* : flamme air-acétylène.

Vérifiez l'absence de zinc dans l'acide chlorhydrique utilisé.

**Métaux lourds** (*2.4.8*) : au maximum 50 ppm.

A 10 mL de solution S1, ajoutez 0,5 mL de *solution de phénolphtaléine R*, puis de la *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R* jusqu'à faible coloration rose. Complétez à 25 mL avec de l'*eau R*. 12 mL de solution satisfont à l'essai A. Préparez la solution témoin avec la *solution à 2 ppm de plomb (Pb) R*.

**Substances extractibles à l'eau** : au maximum 0,3 pour cent.

Evaporez au bain-marie à siccité 50,0 mL de solution S2. Desséchez à l'étuve 100-105 °C jusqu'à masse constante. Effectuez un essai à blanc avec 50,0 mL d'*eau pour préparations injectables R*. La masse du résidu est au maximum de 7,5 mg, compte tenu de l'essai à blanc.

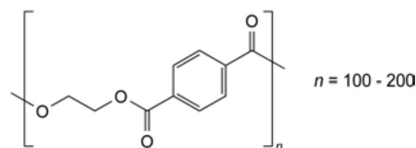
DOSAGE

Sur 50,0 mg du matériau à examiner, effectuez la combustion dans l'oxygène (*2.5.10*). Faites absorber les produits de combustion par 20 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M*. A la solution obtenue, ajoutez 1 mL de *phtalate de dibutyle R*, 2,5 mL d'*acide nitrique R*, 5 mL de *solution de sulfate ferrique et d'ammonium R2* et 10,0 mL de *nitrate d'argent 0,1 M*. Titrez par le *thiocyanate d'ammonium 0,05 M* jusqu'à coloration jaune-rouge. Effectuez un titrage à blanc.

1 mL de *nitrate d'argent 0,1 M* correspond à 6,25 mg de poly(chlorure de vinyle).

**01/2008:30115**
**corrigé 7.0**

# 3.1.15. POLY(TÉRÉPHTALATE D'ÉTHYLÈNE) POUR RÉCIPIENTS POUR PRÉPARATIONS À USAGE NON PARENTÉRAL




DÉFINITION

Le poly(téréphtalate d'éthylène) est obtenu par polymérisation de l'acide téréphtalique ou du téréphtalate de diméthyle avec l'éthylèneglycol. L'acide isophthalique, l'isophtalate de diméthyle, le 1,4-bis(hydroxyméthyl)cyclohexane (cyclohexane-1,4-diméthanol) ou le diéthylèneglycol peuvent être utilisés dans la polymérisation. Il peut contenir au plus 0,5 pour cent de silice ou de silicates et des matières colorantes approuvées par les autorités compétentes.

PRODUCTION

Le procédé de fabrication est validé de façon à démontrer que la teneur en acétaldéhyde résiduel n'est pas supérieure à 10 ppm dans les granules.

3. Matériaux/Récipients

CARACTÈRES

*Aspect* : granules translucides ou opaques.

*Solubilité* : pratiquement insoluble dans l'eau, dans l'alcool et dans le chlorure de méthylène. Le poly(téréphtalate d'éthylène) est hydrolysé par les bases fortes.

IDENTIFICATION

A. Dans un ballon en verre borosilicaté à col rodé, introduisez 0,10 g de poly(téréphtalate d'éthylène). Ajoutez 25 mL d'une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 200 g/L dans une solution d'*éthanol R* à 50 pour cent *V/V*. Chauffez à reflux pendant 30 min. Laissez refroidir et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*. Filtrez si nécessaire. Prélevez 1,0 mL du filtrat et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*. Examinez entre 210 nm et 330 nm (*2.2.25*), la solution présente un maximum d'absorption à 240 nm.

B. Dissolvez 0,05 g de poly(téréphtalate d'éthylène) dans 2 mL de *1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol R*. Déposez plusieurs gouttes de la solution sur une plaque de verre, au bain-marie sous une hotte, pour produire une pellicule d'environ 15 mm sur 15 mm. Laissez le solvant s'évaporer et retirez la pellicule à l'aide d'un jet d'eau et d'un grattoir. Chauffez à l'étuve à 100-105 °C pendant 1-2 h. Examinez la pellicule par spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*). Le spectre de la substance à examiner présente des maximums, en particulier à 1725 $cm^{-1}$, 1410 $cm^{-1}$, 1265 $cm^{-1}$, 1120 $cm^{-1}$, 1100 $cm^{-1}$, 1020 $cm^{-1}$, 875 $cm^{-1}$ et 725 $cm^{-1}$. Le spectre obtenu est, en outre, identique au spectre obtenu avec le matériau sélectionné pour l'échantillon type.

ESSAI

*Si nécessaire, découpez le matériau pour les essais, en fragments de 1 cm de côté au maximum.*

**Solution S1**. Dans un ballon en verre borosilicaté à col rodé, introduisez 10,0 g de poly(téréphtalate d'éthylène). Ajoutez 200 mL d'*eau R* et chauffez à 50 °C pendant 5 h. Laissez refroidir et transvasez la solution. *Utilisez la solution S1 dans les 4 h suivant sa préparation.*

**Solution S2**. Dans un ballon en verre borosilicaté à col rodé, introduisez 10 g de poly(téréphtalate d'éthylène). Ajoutez 100 mL d'*alcool R* et chauffez à 50 °C pendant 5 h. Laissez refroidir et transvasez. *Utilisez la solution S2 dans les 4 h suivant sa préparation.*

**Solution S3**. Dans un ballon en verre borosilicaté à col rodé, introduisez 20 g de poly(téréphtalate d'éthylène). Ajoutez 50 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* et chauffez à 50 °C pendant 5 h. Laissez refroidir et transvasez. *Utilisez la solution S3 dans les 4 h suivant sa préparation.*

**Solution S4**. Dans un ballon en verre borosilicaté à col rodé, introduisez 20 g de poly(téréphtalate d'éthylène). Ajoutez 50 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M* et chauffez à 50 °C pendant 5 h. Laissez refroidir et transvasez. *Utilisez la solution S4 dans les 4 h suivant sa préparation.*

**Aspect de la solution S1**. La solution S1 est limpide (*2.2.1*).

**Aspect de la solution S2**. La solution S2 est limpide (*2.2.1*) et incolore (*2.2.2, Procédé II*).

**Acidité ou alcalinité**. A 50 mL de solution S1, ajoutez 0,15 mL de *solution d'indicateurs BRP R*. La solution vire au jaune. Le virage de l'indicateur au bleu ne nécessite pas plus de 0,5 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*. A 50 mL de solution S1, ajoutez 0,2 mL de *solution de méthylorange R*. La solution vire au jaune. Le début de virage de l'indicateur à l'orange ne nécessite pas plus de 0,5 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M*.

**Absorbance de la solution S1** (*2.2.25*) : au maximum 0,20 entre 220 nm et 340 nm. De plus, pour un poly(téréphtalate d'éthylène) coloré : au maximum 0,05 entre 400 nm et 800 nm.

**Absorbance de la solution S2** (*2.2.25*) : au maximum 0,05 entre 400 nm et 800 nm.

**Substances réductrices**. A 20,0 mL de solution S1, ajoutez 2 mL d'*acide sulfurique 0,5 M* et 20,0 mL de *permanganate de potassium 0,002 M*. Portez à ébullition pendant 3 min. Refroidissez immédiatement à température ambiante. Ajoutez 1 g d'*iodure de potassium R*, 0,25 mL de *solution d'amidon R* comme indicateur et titrez par le *thiosulfate de sodium 0,01 M*. Effectuez un titrage à blanc avec 20,0 mL d'*eau R*. La différence entre les volumes utilisés dans les 2 titrages n'est pas supérieure à 0,5 mL.

**Substances solubles dans le dioxane** : au maximum 3 pour cent.

Dans un ballon en verre borosilicaté à col rodé, introduisez 2 g de poly(téréphtalate d'éthylène). Ajoutez 20 mL de *dioxane R* et chauffez à reflux pendant 2 h. Evaporez 10 mL de la solution à siccité au bain-marie et séchez le résidu à 100-105 °C. La masse du résidu est au maximum de 30 mg.

**Aluminium extractible** : au maximum 1 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner.* Solution S3.

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 200 ppm d'aluminium (Al) R*, diluée avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Longueur d'onde* : 396,15 nm, le fond spectral étant évalué à 396,25 nm.

Vérifiez l'absence d'aluminium dans l'*acide chlorhydrique 0,1 M* utilisé.

**Antimoine extractible** : au maximum 1 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner.* Solution S4.

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 100 ppm d'antimoine (Sb) R*, diluée avec de l'*hydroxyde de sodium 0,01 M*.

*Longueur d'onde* : 231,15 nm ou 217,58 nm, le fond spectral étant évalué à 231,05 nm.

**Baryum extractible** : au maximum 1 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner.* Solution S3.

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 50 ppm de baryum (Ba) R*, diluée avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Longueur d'onde* : 455,40 nm, le fond spectral étant évalué à 455,30 nm.

Vérifiez l'absence de baryum dans l'*acide chlorhydrique 0,1 M* utilisé.

**Cobalt extractible** : au maximum 1 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner.* Solution S3.

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 100 ppm de cobalt (Co) R*, diluée avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Longueur d'onde* : 228,62 nm, le fond spectral étant évalué à 228,50 nm.

Vérifiez l'absence de cobalt dans l'*acide chlorhydrique 0,1 M* utilisé.

**Germanium extractible** : au maximum 1 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner.* Solution S4.

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 100 ppm de germanium (Ge) R*, diluée avec de l'*hydroxyde de sodium 0,01 M*.

*Longueur d'onde* : 206,87 nm ou 265,12 nm, le fond spectral étant évalué à 206,75 nm.

**Manganèse extractible** : au maximum 1 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner.* Solution S3.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 100 ppm de manganèse (Mn) R*, diluée avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Longueur d'onde* : 257,61 nm, le fond spectral étant évalué à 257,50 nm.

Vérifiez l'absence de manganèse dans l'*acide chlorhydrique 0,1 M* utilisé.

**Titane extractible** : au maximum 1 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner*. Solution S3.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 100 ppm de titane (Ti) R*, diluée avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Longueur d'onde* : 323,45 nm ou 334,94 nm, le fond spectral étant évalué à 323,35 nm.

Vérifiez l'absence de titane dans l'*acide chlorhydrique 0,1 M* utilisé.

**Zinc extractible** : au maximum 1 ppm.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.57*).

*Solution à examiner*. Solution S3.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 100 ppm de zinc (Zn) R*, diluée avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

*Longueur d'onde* : 213,86 nm, le fond spectral étant évalué à 213,75 nm.

Vérifiez l'absence de zinc dans l'*acide chlorhydrique 0,1 M* utilisé.

**Cendres sulfuriques** (*2.4.14*) : au maximum 0,5 pour cent, déterminé sur 1,0 g de poly(téréphtalate d'éthylène).

# 3.2. RÉCIPIENTS

**01/2008:30200**

# 3.2. RÉCIPIENTS

Le récipient pour usage pharmaceutique est un dispositif qui contient ou qui est destiné à contenir un produit et qui est, ou peut être, en contact direct avec celui-ci. La fermeture fait partie du récipient.

Le récipient (voir section 1.3. des Prescriptions générales) est conçu pour permettre le prélèvement du contenu de façon appropriée à l'emploi auquel il est destiné. Le récipient protège le contenu de l'environnement à des degrés variables selon la nature du produit et les risques auxquels il est exposé, tout en limitant la perte des composants. Le récipient n'exerce sur le contenu aucune action physique ou chimique susceptible d'altérer sa qualité au-delà des limites tolérées par les prescriptions officielles.

*Récipient unidose*. Un récipient unidose est un récipient qui contient une quantité de préparation destinée à être utilisée en 1 seule occasion en totalité ou partiellement.

*Récipient multidose*. Un récipient multidose contient une quantité suffisante de la préparation pour au moins 2 doses de la préparation.

*Récipient bien fermé*. Un récipient bien fermé protège son contenu de la contamination par des matières étrangères solides et liquides, et de la perte du contenu dans des conditions normales de manutention, de conservation et de transport.

*Récipient étanche*. Un récipient étanche est imperméable aux solides, aux liquides et aux gaz, dans des conditions ordinaires de manutention, de conservation et de transport. Si le récipient est destiné à être ouvert plus d'une fois, il doit être conçu de façon à recouvrer son étanchéité chaque fois qu'il est refermé.

*Récipient scellé*. Un récipient scellé est un récipient fermé par fusion du matériau du récipient.

*Récipient à fermeture inviolable*. Un récipient à fermeture inviolable est un récipient fermé muni d'un dispositif spécial qui révèle irrévocablement qu'il a été ouvert.

*Récipient avec dispositif de sécurité enfant*. Un récipient muni d'un dispositif qui empêche toute ouverture fortuite par un enfant.

**07/2010:30201**

## 3.2.1. RÉCIPIENTS DE VERRE POUR USAGE PHARMACEUTIQUE

Les récipients de verre pour usage pharmaceutique sont des articles de verre destinés à entrer en contact direct avec les préparations pharmaceutiques.

*Verre incolore*. Le verre est très transparent dans le spectre visible.

*Verre coloré*. Le verre peut être coloré par l'addition de petites quantités d'oxydes métalliques, choisis en fonction de l'absorbance spectrale désirée.

*Verre neutre ou borosilicaté*. Le verre neutre est un verre borosilicaté contenant des quantités importantes d'oxyde borique, d'oxydes d'aluminium alcalins et/ou d'oxydes alcalino-terreux. En raison de sa composition, ce verre a une forte résistance hydrolytique et une forte résistance aux chocs thermiques.

*Verre calco-sodique*. Le verre calco-sodique est un verre silicaté contenant des oxydes de métaux alcalins, principalement de l'oxyde de sodium, et des oxydes alcalino-terreux, principalement de l'oxyde de calcium. En raison de sa composition, ce verre n'a qu'une résistance hydrolytique modérée.

La stabilité hydrolytique des récipients de verre pour usage pharmaceutique est exprimée par la résistance offerte par le verre à la cession de substances minérales solubles dans l'eau, dans des conditions déterminées de contact entre la surface intérieure du récipient ou les grains de verre et l'eau. Cette résistance hydrolytique est évaluée par le titrage de l'alcalinité relarguée. Selon leur résistance hydrolytique, les récipients de verre sont classés comme suit :

– récipients de verre de type I : récipients de verre neutre, dont la résistance hydrolytique élevée est due à la composition chimique de la masse,
– récipients de verre de type II : habituellement récipients de verre calco-sodique dont la résistance hydrolytique élevée résulte d'un traitement de surface approprié,
– récipients de verre de type III : habituellement récipients de verre calco-sodique de résistance hydrolytique moyenne.

Les indications suivantes, imprimées en caractères italiques, sont des recommandations générales relatives au type de récipient de verre pouvant être utilisé pour différents types de préparations pharmaceutiques. Le fabricant d'un produit pharmaceutique s'engage à garantir la compatibilité entre le récipient de verre et la substance qu'il contient.

*Les récipients de verre de type I conviennent pour la plupart des préparations, qu'elles soient pour administration parentérale ou non.*

*Les récipients de verre de type II conviennent pour la plupart des préparations aqueuses acides et neutres, qu'elles soient pour administration parentérale ou non.*

*Les récipients de verre de type III conviennent en général pour les préparations en véhicule non-aqueux pour administration parentérale, pour les poudres pour administration parentérale (à l'exclusion des préparations lyophilisées) et pour des préparations pour administration non parentérale.*

Il est toujours possible d'utiliser des récipients d'une résistance hydrolytique supérieure à celle recommandée pour une préparation donnée.

La nature du récipient choisi pour une préparation donnée doit être telle que le matériau ne relargue pas de substances en quantités susceptibles d'affecter la stabilité de la préparation ou de présenter un risque de toxicité. Dans des cas justifiés, il peut être nécessaire d'avoir des informations détaillées sur la composition du verre afin de pouvoir évaluer les risques potentiels.

Les préparations pour administration parentérale sont normalement présentées en récipients de verre incolore, mais du verre coloré peut néanmoins être utilisé dans le cas de substances sensibles à la lumière. Des récipients de verre, coloré ou non, sont utilisés pour les autres préparations. Il est recommandé que tous les récipients de verre pour les préparations liquides et pour les poudres pour administration parentérale permettent l'examen visuel du contenu.

Les récipients de verre peuvent être soumis à divers traitements de leur surface interne pour améliorer la résistance hydrolytique, conférer des propriétés d'hydrophobie, etc. La surface externe peut également être traitée par exemple pour accroître le glissement et la résistance aux rayures. Le traitement externe est tel qu'il ne contamine pas la surface interne du récipient.

A l'exception des récipients de verre de type I, les récipients de verre pour préparations pharmaceutiques ne doivent pas être réutilisés. Les récipients pour le sang humain et les produits du sang ne doivent pas être réutilisés.

Les récipients de verre pour usage pharmaceutique satisfont à l'essai ou aux essais appropriés de résistance hydrolytique. Lorsque des récipients de verre comportent des éléments faits d'un matériau autre que le verre, les essais s'appliquent uniquement à la partie en verre.

Pour définir la qualité du récipient de verre en fonction de l'usage prévu, un ou plusieurs des essais suivants sont nécessaires.

Des essais de résistance hydrolytique sont effectués afin de définir le type de verre (I, II ou III) et contrôler sa résistance hydrolytique.

En outre, les récipients destinés aux préparations aqueuses pour administration parentérale sont soumis à un essai de l'arsenic et les récipients en verre coloré sont soumis à un essai de transmission spectrale.

RÉSISTANCE HYDROLYTIQUE

Tableau 3.2.1.-1. *Types de verre*

| Type de récipient | Essai à réaliser |
|---|---|
| Récipients de verre de type I et de type II (pour les distinguer des récipients de verre de type III) | Essai A (essai de surface) |
| Récipients de verre de type I (pour les distinguer des récipients de verre de type II et de type III) | Essai B (essai sur verre en grains) ou essai C (essai de corrosion) |
| Récipients de verre de type I et de type II quand il est nécessaire de déterminer si la résistance hydrolytique élevée est due à la composition chimique ou au traitement de surface | Essais A et B ou essais A et C |

L'essai est réalisé par titrage des solutions d'extraction obtenues dans les conditions décrites pour les essais A, B et C.

*APPAREILLAGE*

- un autoclave capable de maintenir une température de 121 ± 1 °C et équipé d'un thermomètre ou d'un thermocouple étalonné, d'un manomètre, d'un robinet de purge, d'un panier destiné à contenir les échantillons d'une capacité suffisante pour y placer le nombre de récipients nécessaires à l'essai, au-dessus du niveau de l'eau ; *nettoyez soigneusement à l'eau R la cuve et tous les accessoires avant usage* ;
- des burettes d'une capacité appropriée ;
- des fioles jaugées à un trait, d'une capacité de 1000 mL ;
- des pipettes et des vases à précipiter ;
- des fioles coniques d'une capacité de 100 mL et de 250 mL ;
- un bain-marie ;
- une feuille de métal (par exemple aluminium, acier inoxydable).

Les fioles et vases à précipiter auront déjà été utilisés pour cet essai ou remplis d'*eau R* et maintenus à l'autoclave à 121 °C pendant au moins 1 h avant usage.

*DÉTERMINATION DU VOLUME DE REMPLISSAGE*

Le volume de remplissage est le volume d'eau nécessaire à l'essai effectué sur le récipient. Pour les fioles et les flacons, ce volume correspond à 90 pour cent de leur capacité à ras-bord. Pour les ampoules, l'eau doit atteindre le niveau de l'épaulement du flacon.

**Fioles et flacons**. Prélevez au hasard 6 récipients du lot d'échantillons ou 3 si leur capacité est supérieure à 100 mL et éliminez tout corps étranger (saleté ou résidus d'emballage). Pesez à 0,1 g près les récipients vides. Déposez chacun d'entre eux sur une surface plane et horizontale et remplissez-les avec de l'*eau distillée R* jusqu'au bord supérieur en évitant le débordement et l'introduction de bulles d'air. Ajustez le niveau du liquide par rapport au niveau supérieur (ras-bord) du récipient. Pesez les récipients remplis pour obtenir la masse d'eau exprimée à 2 décimales dans le cas de récipients de volume nominal inférieur ou égal à 30 mL, et exprimée à 1 décimale dans le cas de récipients de volume nominal supérieur à 30 mL. Calculez la valeur moyenne de la capacité à ras-bord en millilitres et multipliez par 0,9. Ce volume (valeur à 1 décimale) correspond à la capacité de remplissage à ras-bord pour ce lot particulier d'échantillons.

**Ampoules**. Disposez au moins 6 ampoules sèches sur une surface plane et horizontale. A l'aide d'une burette, remplissez-les d'*eau distillée R*, jusqu'à ce que le niveau de l'eau atteigne le repère A (endroit où le corps de l'ampoule se rétrécit pour former l'épaulement - voir figure 3.2.1.-1). Lisez les capacités obtenues à 2 décimales et déterminez la valeur moyenne. Le résultat obtenu (à 1 décimale) correspond au volume de remplissage pour ce lot particulier d'ampoules. Le volume de remplissage peut également être déterminé par pesée.

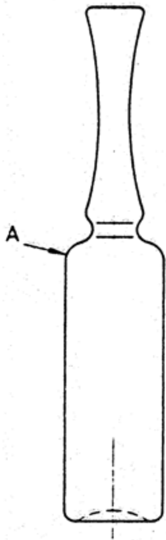



Figure 3.2.1.-1. – *Volume de remplissage des ampoules (jusqu'au repère A)*

*ESSAI A. RÉSISTANCE HYDROLYTIQUE DE LA SURFACE INTERNE DES RÉCIPIENTS DE VERRE (ESSAI DE SURFACE)*

La détermination s'effectue sur des récipients non encore utilisés. Les volumes de liquide nécessaires à l'essai final sont indiqués dans le tableau 3.2.1.-2.

Tableau 3.2.1.-2. – *Volume du liquide d'essai et nombre de titrages*

| Volume de remplissage (mL) | Volume du liquide d'essai à titrer (mL) | Nombre de titrages |
|---|---|---|
| Jusqu'à 3 | 25,0 | 1 |
| Supérieur à 3 et jusqu'à 30 | 50,0 | 2 |
| Supérieur à 30 et jusqu'à 100 | 100,0 | 2 |
| Supérieur à 100 | 100,0 | 3 |

**Nettoyage**. Supprimez les corps étrangers ou la poussière. Juste avant l'essai, rincez soigneusement, au moins 2 fois, chaque récipient avec de l'*eau R* et laissez reposer. Immédiatement avant l'essai, videz les récipients, rincez-les une fois avec de l'*eau R* puis avec de l'*eau R1* et laissez sécher. Effectuez la procédure de nettoyage depuis le premier rinçage en un laps de temps obligatoirement compris entre 20 min et 25 min.

Chauffez les ampoules fermées au bain-marie ou à l'étuve à 50 °C pendant environ 2 min avant de les ouvrir. Ne les rincez pas avant l'essai.

**Remplissage et chauffage**. Remplissez les récipients avec de l'*eau R1* jusqu'au volume de remplissage. Les cartouches et les seringues préremplies sont fermées de manière adéquate à l'aide d'un matériau ne provoquant pas d'interférences lors de l'essai. Recouvrez chaque récipient, y compris les ampoules, à l'aide d'un matériau inerte, par exemple des cristallisoirs de verre neutre ou des feuilles d'aluminium rincées à l'*eau R*. Placez les récipients sur le plateau de l'autoclave, le niveau de l'*eau R* dans la cuve étant inférieur à celui du plateau. Fermez l'appareil et effectuez les opérations suivantes :

- chauffez l'autoclave à 100 °C et laissez la vapeur s'échapper par le robinet de purge pendant 10 min ;
- fermez le robinet de purge et portez la température de 100 °C à 121 °C à raison de 1 °C/min ;
- maintenez la température de 121 ± 1 °C pendant 60 ± 1 min ;

- abaissez la température de 121 °C à 100 °C à raison de 0,5 °C/min, en purgeant pour éviter la formation de vide ;
- n'ouvrez pas l'autoclave avant que sa température ait chuté à 95 °C ;
- retirez avec précaution les récipients de l'autoclave, placez-les dans un bain-marie à 80 °C et faites couler de l'eau du robinet froide ; veillez à ce que l'eau utilisée pour le refroidissement n'entre pas en contact avec les bouchons posés, de manière à éviter toute contamination de la solution d'extraction ;
- la durée de refroidissement ne doit pas dépasser 30 min.

Les solutions d'extraction sont analysées par titrage selon le mode opératoire décrit ci-après.

**Mode opératoire**. Effectuez le titrage dans l'heure qui suit la sortie des récipients de l'autoclave. Réunissez les liquides d'essai provenant de l'ensemble des récipients traités et mélangez. Introduisez le volume prescrit (tableau 3.2.1.-2) dans une fiole conique. Dans une fiole identique à la précédente, introduisez le même volume d'*eau R1* comme blanc. Dans chaque fiole, ajoutez la quantité nécessaire de *solution de rouge de méthyle R*, soit 0,05 mL pour 25 mL de liquide. Titrez le blanc par l'*acide chlorhydrique 0,01 M*. Titrez ensuite le liquide d'essai avec le même acide, jusqu'à ce que la coloration de l'indicateur soit identique à celle obtenue dans le titrage à blanc. Déduisez la valeur obtenue lors du titrage à blanc de celle du titrage du liquide d'essai et exprimez les résultats en millilitres d'*acide chlorhydrique 0,01 M* pour 100 mL. Exprimez les valeurs de titrage inférieures à 1,0 mL et celles supérieures ou égales à 1,0 mL respectivement à 2 décimales et à 1 décimale.

**Limites**. Les valeurs obtenues, ou la moyenne des valeurs obtenues si plusieurs titrages sont effectués, ne sont pas supérieures aux limites indiquées dans le tableau 3.2.1.-3.

Tableau 3.2.1.-3. – *Valeurs limites de la résistance hydrolytique de surface*

| | Volume d'HCl 0,01 M pour 100 mL de liquide d'essai (mL) | |
|---|---|---|
| | Récipients de verre | |
| Volume de remplissage (mL) | Types I et II | Type III |
| Jusqu'à 1 | 2,0 | 20,0 |
| Supérieur à 1 et jusqu'à 2 | 1,8 | 17,6 |
| Supérieur à 2 et jusqu'à 5 | 1,3 | 13,2 |
| Supérieur à 5 et jusqu'à 10 | 1,0 | 10,2 |
| Supérieur à 10 et jusqu'à 20 | 0,80 | 8,1 |
| Supérieur à 20 et jusqu'à 50 | 0,60 | 6,1 |
| Supérieur à 50 et jusqu'à 100 | 0,50 | 4,8 |
| Supérieur à 100 et jusqu'à 200 | 0,40 | 3,8 |
| Supérieur à 200 et jusqu'à 500 | 0,30 | 2,9 |
| Supérieur à 500 | 0,20 | 2,2 |

*ESSAI B. RÉSISTANCE HYDROLYTIQUE SUR VERRE EN GRAINS (ESSAI SUR VERRE EN GRAINS)*

***Veillez à ce que les articles répondent aux critères de qualité en vigueur pour une marchandise de qualité commerciale.***

L'essai peut être réalisé sur les baguettes de verre utilisées pour la fabrication des récipients en verre tube ou sur les récipients.

**Appareillage**

- un mortier, un pilon (voir figure 3.2.1.-2) et un marteau en acier trempé magnétique ;
- un jeu de 3 tamis constitués par une toile à mailles carrées, d'acier inoxydable, montée sur cadre de même métal ; le jeu de 3 tamis se compose comme suit :

  (a) tamis n° 710,

  (b) tamis n° 425,

  (c) tamis n° 300 ;
- un aimant permanent ;
- une feuille de métal (par exemple aluminium, acier inoxydable) ;
- une étuve à air chaud permettant de maintenir une température de 140 ± 5 °C ;
- une balance permettant des pesées jusqu'à 500 g, avec une précision de 0,005 g ;
- un dessiccateur ;
- un bain à ultrasons.

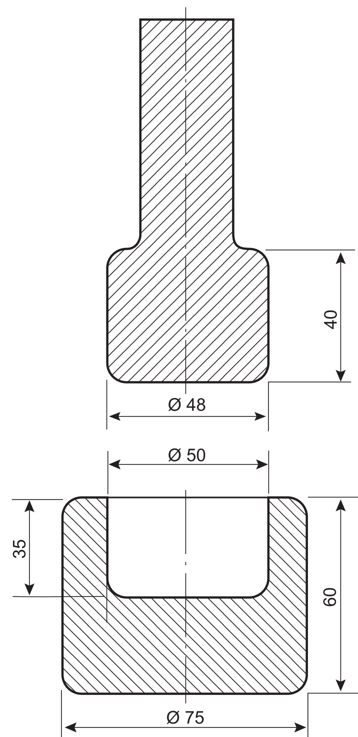



Figure 3.2.1.-2. – *Appareil pour la méthode sur verre en grains (dimensions en millimètres)*

**Mode opératoire**. Rincez les récipients à tester avec de l'*eau R* et séchez-les dans l'étuve. Enveloppez au moins 3 des récipients de verre dans du papier propre, puis brisez-les. Préparez 2 lots d'environ 100 g chacun, composés de fragments ne dépassant pas 30 mm. Dans l'un des 2 lots, prélevez 30-40 g de fragments compris entre 10 mm et 30 mm de largeur. Déposez ces fragments dans le mortier, insérez le pilon et frappez fortement une seule fois avec le marteau. Transvasez le contenu du mortier sur le tamis (a) du jeu. Recommencez l'opération jusqu'à ce que tous les fragments aient été déposés sur le tamis. Soumettez ensuite le jeu de tamis à une agitation manuelle pendant quelques instants et retirez les fragments de verre restés sur les tamis (a) et (b). Soumettez ces fragments à une nouvelle opération de concassage, puis répétez l'opération jusqu'à ce qu'il ne reste sur le tamis (a) qu'environ 10 g de verre. Rejetez cette fraction ainsi que la fraction de verre passée au tamis (c). Réassemblez le jeu de tamis et agitez-les manuellement pendant 5 min. Transférez dans un vase à peser les grains de verre passés au tamis (b) mais retenus par le tamis (c). Répétez les opérations de concassage et de tamisage avec le second lot pour obtenir 2 échantillons de grains qui devraient être supérieurs à 10 g. Etalez chaque échantillon sur une feuille de papier glacé propre et, au moyen de l'aimant, débarrassez l'échantillon des particules métalliques qu'il peut contenir. Transférez chaque échantillon dans un vase à précipiter pour procéder au nettoyage. Dans chacun des vases à précipiter, ajoutez 30 mL d'*acétone R*, puis agitez les grains à l'aide d'un outil approprié, telle une tige de verre gainée de caoutchouc ou de plastique. Après cette opération, laissez décanter et prélevez autant

d'acétone que possible. Ajoutez à nouveau 30 mL d'*acétone R*, agitez, laissez décanter et prélevez à nouveau l'acétone puis ajoutez encore une nouvelle portion d'*acétone R*.

Remplissez la cuve de l'appareil à ultrasons avec de l'eau à température ambiante, puis déposez le vase à précipiter sur le plateau et immergez-le jusqu'à ce que le niveau de l'acétone soit au niveau de l'eau. Traitez aux ultrasons pendant 1 min. Agitez le vase à précipiter, laissez décanter puis prélevez autant d'acétone que possible et répétez le traitement aux ultrasons. Si la solution reste légèrement trouble, répétez le traitement aux ultrasons, laissez décanter et prélevez de l'acétone jusqu'à ce que la solution devienne limpide. Agitez, éliminez l'acétone, puis séchez les grains en commençant par placer le vase à précipiter sur une plaque chauffante pour supprimer l'excédent d'acétone puis en chauffant à l'étuve à 140 °C pendant 20 min. Transvasez les grains desséchés de chaque vase dans des vases à peser distincts, obturez ces derniers, puis laissez refroidir dans le dessiccateur. Introduisez 10,00 g de grains de verre séchés et nettoyés dans 2 fioles coniques distinctes. Au moyen d'une pipette, ajoutez 50 mL d'*eau R1* dans chacune des fioles (solutions d'essai). Pipettez 50 mL d'*eau R1* dans une troisième fiole conique (solution à blanc). Etalez uniformément les grains sur le fond des fioles en agitant doucement. Obturez les fioles au moyen de cristallisoirs de verre neutre ou de feuilles d'aluminium rincées à l'*eau R* ou de vases à précipiter renversés, afin que la paroi intérieure du vase repose parfaitement sur le bord supérieur des fioles. Disposez les 3 fioles sur le plateau de l'autoclave qui contient de l'eau à température ambiante et veillez à ce qu'elles soient maintenues au-dessus du niveau de l'eau de la cuve. Procédez à l'autoclavage tel que décrit dans l'essai A, mais ne maintenez la température à 121 ± 1 °C que pendant 30 ± 1 min. N'ouvrez pas l'autoclave avant que sa température ne soit retombée à 95 °C. Retirez les échantillons chauds et refroidissez les fioles dès que possible sous l'eau courante, en évitant toutefois de provoquer un choc thermique. Ajoutez 0,05 mL de *solution de rouge de méthyle R* dans chacune des 3 fioles. Titrez immédiatement la solution à blanc par l'*acide chlorhydrique 0,02 M* puis titrez les solutions d'essai jusqu'à ce que la coloration obtenue corresponde à celle obtenue avec la solution à blanc. Déduisez la valeur obtenue lors du titrage à blanc de celle du titrage des solutions d'essai.

*NOTE : s'il est nécessaire d'obtenir un point de fin de titrage précis, il convient de transférer la solution limpide dans une fiole distincte de 250 mL. Rincez les grains 3 fois avec 15 mL d'eau R1, en imprimant un mouvement circulaire à la fiole, puis ajoutez les eaux de lavage à la solution principale. Ajoutez 0,05 mL de solution de rouge de méthyle R. Titrez, puis calculez comme décrit ci-après. Dans ce cas, ajoutez également 45 mL d'eau R1 et 0,05 mL de solution de rouge de méthyle R à la solution à blanc.*

Exprimez la moyenne des résultats obtenus en millilitres d'*acide chlorhydrique 0,02 M* par gramme d'échantillon et si nécessaire en son équivalent en métal alcalin extrait, calculé en microgrammes d'oxyde de sodium par gramme de verre en grains.

1 mL d'*acide chlorhydrique 0,02 M* correspond à 620 µg d'oxyde de sodium.

Répétez l'essai si les valeurs extrêmes diffèrent de plus de 20 pour cent.

**Limites**. Les récipients de verre de type I ne nécessitent pas plus de 0,1 mL d'*acide chlorhydrique 0,02 M* par gramme de verre, les récipients de verre de type II et de type III ne nécessitent pas plus de 0,85 mL d'*acide chlorhydrique 0,02 M* par gramme de verre.

*ESSAI C. VISANT À DÉTERMINER SI LES RÉCIPIENTS ONT ÉTÉ SOUMIS À UN TRAITEMENT DE SURFACE (ESSAI DE CORROSION)*

Lorsqu'il est nécessaire de savoir si un récipient a été soumis ou non à un traitement de surface et/ou de distinguer des récipients de verre de type I et de type II, l'essai C est appliqué en plus de l'essai A. Alternativement, les essais A et B peuvent être appliqués. L'essai C est effectué soit sur les récipients non encore utilisés, soit sur les récipients ayant déjà été soumis à l'essai A.

**Flacons et fioles**. Les volumes de liquide d'essai nécessaires sont indiqués dans le tableau 3.2.1.-2.

Rincez 2 fois les récipients avec de l'*eau R*, remplissez-les à ras bord avec un mélange de 1 volume d'*acide fluorhydrique R* et de 9 volumes d'*acide chlorhydrique R*, puis laissez reposer pendant 10 min. Videz les récipients puis rincez soigneusement 5 fois de suite avec de l'*eau R*. Juste avant l'essai, rincez encore une fois avec de l'*eau R*. Les récipients ainsi préparés sont ensuite soumis aux mêmes étapes d'autoclavage et de dosage que celles décrites dans l'essai A de résistance hydrolytique de surface. Si les résultats sont nettement (5 à 10 fois) supérieurs à ceux obtenus à partir des surfaces initiales, les échantillons ont effectivement été soumis à un traitement de surface.

**Ampoules**

*NOTE : les surfaces internes des ampoules obtenues à partir de tubes de verre ne sont généralement pas soumises à un traitement car leur résistance chimique dépend de la composition chimique du verre en tant que matière première.*

Soumettez les récipients au même essai que celui décrit pour les flacons et fioles. Si les ampoules n'ont pas subi de traitement de surface, les nouvelles valeurs sont légèrement inférieures à celles obtenues lors des essais précédents.

**Distinction entre les récipients de verre de type I et de type II**

Les résultats obtenus dans l'essai C sont comparés aux résultats obtenus dans l'essai A ; l'interprétation des résultats est donnée dans le tableau 3.2.1.-4.

Tableau 3.2.1.-4. – *Distinction entre les récipients de verre de type I et de type II*

| Type I | Type II |
|---|---|
| Les valeurs trouvées sont proches de celle de la résistance hydrolytique du verre de type I. | Les valeurs trouvées dépassent largement celle de la résistance hydrolytique. Elles se rapprochent des valeurs du verre de type III, sans les dépasser. |

ARSENIC

*L'essai s'applique aux récipients de verre destinés aux préparations aqueuses pour administration parentérale.*

Spectrométrie d'absorption atomique à génération d'hydrure (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner*. Utilisez l'extrait de solution obtenu à partir des récipients de verre de type I et de type II, après autoclavage à 121 °C pendant 1 h, comme décrit dans l'essai A de résistance hydrolytique de surface. Transférez 10,0 mL de cette solution dans une fiole jaugée de 100 mL. Ajoutez 10 mL d'*acide chlorhydrique R* et 5 mL d'une solution d'*iodure de potassium R* à 200 g/L. Chauffez au bain-marie à 80 °C pendant 20 min, laissez refroidir et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*.

*Solutions témoins*. Préparez les solutions témoins avec de la *solution à 1 ppm d'arsenic (As) R*, ajoutez 10 mL d'*acide chlorhydrique R* et 5 mL d'une solution d'*iodure de potassium R* à 200 g/L. Chauffez au bain-marie à 80 °C pendant 20 min, laissez refroidir et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. La concentration des solutions témoins généralement utilisée est de 0,005 ppm à 0,015 ppm d'As.

*Réservoir d'acide. Acide chlorhydrique R.*

*Réservoir de réduction. Solution réductrice de tétrahydroborate de sodium R.*

Utilisez un appareil à génération d'hydrure pour introduire la solution à examiner dans le brûleur d'un spectromètre d'absorption atomique. Etablissez et étalonnez les conditions opératoires en respectant les instructions du fabricant, optimisez le débit d'admission des tubes de la pompe péristaltique, puis raccordez les tubes au réservoir d'acide, au réservoir de réduction et à la solution à examiner.

*Source* : lampe à cathode creuse.

*Longueur d'onde* : 193,7 nm.

*Dispositif d'atomisation* : flamme air-acétylène.

*Limite* : au maximum 0,1 ppm d'As.

TRANSMISSION DE LA LUMIÈRE POUR LES RÉCIPIENTS DE VERRE COLORÉ

**Appareillage**. Un spectrophotomètre UV-VIS, équipé d'un détecteur à photodiode ou équipé d'un tube photomultiplicateur couplé à une sphère d'intégration.

**Préparation de l'échantillon**. Brisez le récipient de verre ou découpez-le à l'aide d'une scie circulaire munie d'une roue abrasive humide, telle qu'un carborundum ou une scie à diamant. Sélectionnez des fragments représentatifs de l'épaisseur moyenne de la paroi et ajustez-les pour les monter dans un spectrophotomètre. Si l'échantillon est trop petit pour couvrir l'ouverture du porte-échantillon, masquez la portion libre par du papier opaque ou un cache, à condition que la longueur de l'échantillon soit supérieure à celle de la fente. Avant de monter l'échantillon dans le support, lavez, séchez et essuyez l'échantillon à l'aide d'une chiffonnette à verre. Montez l'échantillon à l'aide de cire ou de tout autre moyen approprié en évitant de laisser des traces de doigts ou d'autres empreintes.

**Mode opératoire**. Placez la portion de verre dans le spectrophotomètre, son axe cylindrique étant parallèle à la fente de telle sorte que le rayon lumineux soit perpendiculaire à la surface de la section et que les déperditions de lumière dues à la réflexion soient minimales. Mesurez la transmittance de la section par rapport à l'air dans la région spectrale de 290 nm à 450 nm, en continu ou à des intervalles de 20 nm.

**Limites**. A aucune des longueurs d'onde de 290 nm à 450 nm, la transmission de lumière observée pour les récipients de verre coloré destinés aux préparations non parentérales ne dépasse 10 pour cent, sans tenir compte du type de verre et de la capacité du récipient de verre. La transmission de la lumière, observée dans les récipients de verre coloré pour des préparations parentérales, ne dépasse pas les limites établies dans le tableau 3.2.1.-5.

Tableau 3.2.1.-5. − *Limites de transmission de la lumière pour les récipients de verre coloré destinés aux préparations parentérales*

| | Pourcentage maximal de transmission de la lumière à toute longueur d'onde entre 290 nm et 450 nm | |
|---|---|---|
| **Volume nominal (mL)** | **Récipients scellés à la flamme** | **Récipients avec fermeture** |
| Jusqu'à 1 | 50 | 25 |
| Supérieur à 1 et jusqu'à 2 | 45 | 20 |
| Supérieur à 2 et jusqu'à 5 | 40 | 15 |
| Supérieur à 5 et jusqu'à 10 | 35 | 13 |
| Supérieur à 10 et jusqu'à 20 | 30 | 12 |
| Supérieur à 20 | 25 | 10 |

## Annexe - essai de résistance hydrolytique de surface - détermination par spectrométrie d'absorption atomique de flamme

*La résistance hydrolytique de surface des verres de type I et II peut être déterminée en analysant les solutions obtenues après relargage, par spectrométrie d'absorption atomique de flamme. Un certain nombre d'éléments, présents sous forme d'oxydes dans le verre et contribuant à l'alcalinité de la solution, sont déterminés et utilisés pour exprimer le résultat en équivalent d'alcalinité. La méthode par spectrométrie a l'avantage de permettre l'utilisation d'un volume de solution de relargage beaucoup plus petit, de telle sorte que la méthode peut être appliquée à de petits récipients individuels. Ceci permet d'évaluer l'uniformité des récipients d'un lot donné lorsque cela est important. Les résultats de cette détermination ne sont pas équivalents à ceux obtenus par titrimétrie et les 2 méthodes ne peuvent être considérées comme interchangeables. Une corrélation entre les 2 méthodes dépend du type de verre et des dimensions et de la forme du récipient. La méthode par titrimétrie est la méthode de référence de la Pharmacopée. La méthode par spectrométrie peut être utilisée dans les cas justifiés et autorisés.*

*Une méthode appropriée est décrite ci-après.*

La détermination s'effectue sur des récipients non encore utilisés. Le nombre de récipients à examiner est indiqué dans le tableau 3.2.1-6.

Tableau 3.2.1.-6. - *Nombre de récipients à examiner pour la méthode par spectrométrie*

| Volume de remplissage (mL) | Nombre de récipients à mesurer séparément | Récipients supplémentaires pour mesures préliminaires |
|---|---|---|
| Jusqu'à 2 | 20 | 2 |
| Supérieur à 2 et jusqu'à 5 | 15 | 2 |
| Supérieur à 5 et jusqu'à 30 | 10 | 2 |
| Supérieur à 30 et jusqu'à 100 | 5 | 1 |
| Supérieur à 100 | 3 | 1 |

Des instructions concernant la détermination du volume de remplissage, le nettoyage des récipients, le remplissage et le chauffage sont fournies sous Résistance hydrolytique et Essai A. Résistance hydrolytique de la surface interne des récipients de verre.

*SOLUTIONS*

*Solution tampon spectrochimique*. Dissolvez 80 g de *chlorure de césium R* dans environ 300 mL d'*eau R1*, ajoutez 10 mL d'*acide chlorhydrique 6 M R* et transférez la solution dans une fiole jaugée de 1000 mL. Complétez au volume avec de l'*eau R1* et mélangez.

*Solutions mères* :

- oxyde de sodium, $c(Na_2O)$ = 1 mg/mL,
- oxyde de potassium, $c(K_2O)$ = 1 mg/mL,
- oxyde de calcium, $c(CaO)$ = 1 mg/mL.

Des solutions mères du commerce peuvent également être utilisées.

*Solutions étalons*. Préparez les solutions étalons en diluant les solutions mères avec de l'*eau R1* pour obtenir les concentrations adéquates permettant d'établir les solutions témoins de manière appropriée, par exemple avec des concentrations de 20 µg/mL d'oxyde de sodium, d'oxyde de potassium et d'oxyde de calcium, respectivement. Des solutions étalons du commerce peuvent également être utilisées.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence pour établir la courbe d'étalonnage (série de solutions d'étalonnage) en diluant des solutions étalons de concentration appropriée avec de l'*eau R1*, de façon à couvrir les intervalles normaux des éléments spécifiques, en tenant compte des instruments utilisés pour les mesures. Les intervalles de concentration généralement utilisés pour les solutions de référence sont les suivants :

- pour la détermination par spectrométrie d'émission atomique de l'oxyde de sodium et de l'oxyde de potassium : jusqu'à 10 µg/mL,
- pour la détermination par spectrométrie d'absorption atomique de l'oxyde de sodium et de l'oxyde de potassium : jusqu'à 3 µg/mL,
- pour la détermination par spectrométrie d'absorption atomique de l'oxyde de calcium : jusqu'à 7 µg/mL.

Utilisez des solutions de référence contenant 5 pour cent *V/V* de solution tampon spectrochimique.

*MODE OPÉRATOIRE*
Mesurez à titre préliminaire les concentrations en oxyde de potassium et en oxyde de calcium sur l'une des solutions d'extraction. Si, pour l'un des types de récipients, les concentrations en oxyde de potassium et en oxyde de calcium sont respectivement inférieures à 0,2 µg/mL et à 0,1 µg/mL, il n'est pas nécessaire d'analyser ces ions dans les solutions d'extraction restantes correspondant à ce type de récipients. Aspirez la solution d'extraction de chaque échantillon directement dans la flamme du spectromètre d'absorption atomique ou d'émission atomique et déterminez les concentrations approximatives en oxyde de sodium (également en oxyde de potassium et en oxyde de calcium, le cas échéant) par rapport aux courbes d'étalonnage obtenues à partir des solutions de référence de concentration appropriée.

*DÉTERMINATION FINALE*
Si la dilution est superflue, ajoutez à chaque récipient un volume de solution tampon spectrochimique équivalant à 5 pour cent du volume de remplissage, mélangez bien et déterminez la teneur en oxyde de sodium, en oxyde de calcium et en oxyde de potassium, le cas échéant, par rapport aux courbes d'étalonnage. Pour la détermination de la concentration en oxyde de calcium par spectrométrie d'absorption atomique, utilisez une flamme protoxyde d'azote/acétylène.

Si une dilution est nécessaire, déterminez la teneur en oxyde de sodium, en oxyde de calcium et en oxyde de potassium, le cas échéant, en suivant les procédures susmentionnées. Les solutions de mesure contiennent 5 pour cent *V/V* de solution tampon spectrochimique. Exprimez les valeurs de concentration inférieures à 1,0 µg/mL et celles supérieures ou égales à 1,0 µg/mL respectivement à 2 décimales et à 1 décimale, respectivement. Tenez compte dans le résultat de l'éventuel ajout de solution tampon ou de l'éventuelle dilution.

*CALCUL*
Calculez la valeur moyenne de la concentration de chacun des différents oxydes dans chaque échantillon analysé en microgrammes d'oxyde par millilitre de solution d'extraction et calculez la somme des teneurs en oxydes, exprimée en microgrammes d'oxyde de sodium par millilitre de solution d'extraction, en utilisant les facteurs de conversion massiques suivants :

– 1 µg d'oxyde de potassium correspond à 0,658 µg d'oxyde de sodium,

– 1 µg d'oxyde de calcium correspond à 1,105 µg d'oxyde de sodium.

**Limites**. Pour chaque récipient soumis à l'essai, le résultat obtenu n'est pas supérieur à la valeur indiquée dans le tableau 3.2.1.-7.

Tableau 3.2.1.-7. – *Valeurs limites de la résistance hydrolytique de surface déterminée par spectrométrie d'absorption atomique de flamme*

| | Valeurs maximales de la concentration en oxydes, exprimées en oxyde de sodium (µg/mL) |
|---|---|
| | Récipients de verre |
| Volume de remplissage ( mL) | Types I et II |
| Jusqu'à 1 | 5,00 |
| Supérieur à 1 et jusqu'à 2 | 4,50 |
| Supérieur à 2 et jusqu'à 5 | 3,20 |
| Supérieur à 5 et jusqu'à 10 | 2,50 |
| Supérieur à 10 et jusqu'à 20 | 2,00 |
| Supérieur à 20 et jusqu'à 50 | 1,50 |
| Supérieur à 50 et jusqu'à 100 | 1,20 |
| Supérieur à 100 et jusqu'à 200 | 1,00 |
| Supérieur à 200 et jusqu'à 500 | 0,75 |
| Supérieur à 500 | 0,50 |

**01/2008:30202**

## 3.2.2. RÉCIPIENTS ET FERMETURES EN MATIÈRE PLASTIQUE POUR USAGE PHARMACEUTIQUE

Le récipient en matière plastique pour usage pharmaceutique est un article de matière plastique qui contient ou qui est destiné à contenir un produit pharmaceutique et qui est, ou peut être, en contact direct avec celui-ci. La fermeture fait partie du récipient.

Les récipients et fermetures en matières plastiques pour usage pharmaceutique sont fabriqués dans des matériaux auxquels certains additifs peuvent être ajoutés. Ces matériaux ne contiennent pas de substances qui peuvent être extraites par le contenu en quantités susceptibles d'en altérer l'efficacité ou la stabilité, ou encore de présenter un risque de toxicité.

Les polymères les plus souvent utilisés sont : le polyéthylène (avec et sans additifs), le polypropylène, le poly(chlorure de vinyle), le poly(téréphtalate d'éthylène) et le poly(éthylène-acétate de vinyle).

La nature des additifs et leur quantité sont fonction du type de polymère utilisé, du procédé de transformation de celui-ci en récipient et de l'usage auquel ce récipient est destiné. Ces additifs peuvent être des antioxygènes, des stabilisants, des plastifiants, des lubrifiants, des colorants et des renforçateurs mécaniques. Les agents antistatiques et les agents de démoulage ne peuvent être utilisés que pour les récipients pour préparations à usage oral ou à usage externe pour lesquels ils sont autorisés. Des additifs acceptables sont indiqués dans la formulation type pour chaque matériau décrit dans la Pharmacopée. D'autres additifs peuvent être utilisés à condition d'avoir été approuvés, dans chaque cas, par l'Autorité compétente habilitée à autoriser la mise sur le marché de la préparation en question.

Pour choisir un récipient en matière plastique appropriée, il est nécessaire de connaître la formulation complète de ce matériau, y compris tous les produits ajoutés au cours de la fabrication du récipient, afin d'évaluer les risques éventuels. Le récipient en matière plastique sélectionné pour une préparation particulière devrait être constitué de façon que :

– les constituants de la préparation qu'il contient ne soient pas adsorbés à la surface de la matière plastique et ne migrent pas dans ou à travers elle de manière significative,

– la matière plastique ne libère aucune substance en quantité suffisante pour affecter la stabilité de la préparation ou pour entraîner un risque de toxicité.

A partir du ou des matériaux sélectionnés pour satisfaire à ces critères, des récipients identiques entre eux et constituant « l'échantillon type » sont fabriqués selon des modalités précises, puis mis à l'épreuve sur le plan pratique, dans des conditions reproduisant celles de l'emploi auquel ils sont destinés, y compris la stérilisation éventuelle. Pour vérifier la compatibilité entre récipient et contenu et pour s'assurer qu'il ne se produit pas de changement préjudiciable à la qualité de la préparation, divers essais sont effectués tels que vérification de l'absence de tout changement des caractères physiques, évaluation des pertes ou des gains éventuels par suite de la perméabilité du

récipient, recherche de la modification du pH, évaluation des modifications pouvant intervenir sous l'action de la lumière, essais chimiques et, dans les cas appropriés, essais biologiques.

La méthode de fabrication est telle qu'elle assure la reproductibilité de la fabrication ultérieure en vrac et les conditions de fabrication sont choisies pour éliminer toute possibilité de contamination par d'autres matières plastiques ou leurs sous-produits. Le fabricant du produit devra s'assurer que le récipient est, en tous points, conforme à « l'échantillon type ».

Il est important, pour que les résultats de l'essai effectué sur « l'échantillon type » restent valables, que :

– aucun changement ne soit apporté à la composition du matériau telle qu'elle a été définie pour « l'échantillon type »,
– aucun changement n'intervienne dans les conditions de fabrication telles qu'elles ont été définies pour « l'échantillon type ». En particulier, il faut éviter toute modification de la température à laquelle est soumise la matière plastique au cours de sa transformation ou au cours de toute opération ultérieure telle que la stérilisation,
– les déchets ne soient pas réutilisés.

Le recyclage des chutes de fabrication dont la nature et les proportions sont bien définies peut être autorisé après validation appropriée.

Sous réserve de satisfaire aux épreuves de compatibilité récipient-contenu nécessaires pour chaque cas particulier, les matériaux décrits dans la Pharmacopée sont reconnus comme répondant aux buts spécifiques indiqués, comme défini ci-dessus.

**01/2008:90003**
**corrigé 6.0**

## 3.2.2.1. RÉCIPIENTS EN MATIÈRE PLASTIQUE DESTINÉS AU CONDITIONNEMENT DES SOLUTIONS AQUEUSES POUR PERFUSION

DÉFINITION

Les récipients en matière plastique destinés au conditionnement des solutions aqueuses pour perfusion sont fabriqués à partir d'un ou de plusieurs polymères contenant, le cas échéant, des additifs. Les récipients décrits dans cette section ne conviennent pas nécessairement au conditionnement des émulsions. Les polymères le plus souvent employés sont le polyéthylène, le polypropylène et le poly(chlorure de vinyle). Les spécifications de ce chapitre doivent être interprétées en fonction du chapitre *3.2.2. Récipients et fermetures en matière plastique pour usage pharmaceutique*.

Les récipients peuvent se présenter sous la forme de poches ou de flacons. Ils comportent un emplacement approprié au branchement du nécessaire pour perfusion conçu pour assurer la sécurité de la connexion. Ils comportent éventuellement un dispositif permettant une injection extemporanée. Ils sont généralement munis d'un système de suspension pouvant supporter une tension appropriée à l'usage. Les récipients doivent supporter les conditions de stérilisation auxquelles ils seront soumis. La conception du récipient et la méthode de stérilisation sont choisies de façon à garantir la stérilisation de toutes les parties du récipient qui peuvent entrer en contact avec la solution pour perfusion. Après fermeture, les récipients sont imperméables aux microorganismes. Les récipients sont conçus de façon qu'après remplissage, ils ne soient pas détériorés par une congélation accidentelle qui pourrait survenir pendant le transport de la préparation finale. Sauf exception justifiée et autorisée, ils sont et restent suffisamment transparents pour permettre à tout moment l'examen du contenu.

Les récipients vides ne présentent pas de défauts pouvant entraîner des fuites ; les récipients remplis et fermés ne présentent pas de fuites.

Pour une conservation satisfaisante de certaines préparations, il est nécessaire de placer le récipient dans une enveloppe protectrice. Dans ce cas, il convient de procéder à l'évaluation préliminaire des conditions de conservation, en utilisant le récipient placé dans son enveloppe.

ESSAI

**Solution S**. *Utilisez la solution S dans les 4 h qui suivent sa préparation*. Remplissez le récipient avec de l'*eau R* jusqu'à sa capacité nominale et obturez-le, si possible dans les conditions habituelles de fermeture, sinon obturez-le à l'aide d'une feuille d'aluminium pur. Chauffez le récipient à l'autoclave de façon qu'une température de 121 ± 2 °C soit atteinte en 20 min à 30 min et maintenez cette température pendant 30 min. Si un chauffage à 121 °C entraîne la détérioration du récipient, chauffez à 100 °C pendant 2 h.

*Solution à blanc*. Préparez une solution à blanc en chauffant de l'*eau R* dans une fiole en verre borosilicaté obturée par une feuille d'aluminium pur, à la température et pendant le temps utilisés dans la préparation de la solution S.

**Aspect de la solution**. La solution S est limpide (*2.2.1*) et incolore (*2.2.2, Procédé II*).

**Acidité ou alcalinité**. Prélevez un volume de solution S correspondant à 4 pour cent de la capacité nominale du récipient. Ajoutez 0,1 mL de *solution de phénolphtaléine R*. La solution est incolore. Ajoutez 0,4 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*. La solution est colorée en rose. Ajoutez 0,8 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M* et 0,1 mL de *solution de rouge de méthyle R*. La solution est colorée en rouge orangé ou en rouge.

**Absorbance** (*2.2.25*). Mesurez l'absorbance de la solution S de 230 nm à 360 nm, en utilisant la solution à blanc (voir solution S) comme liquide de compensation. A aucune longueur d'onde, l'absorbance n'est supérieure à 0,20.

**Substances réductrices**. A 20,0 mL de solution S, ajoutez 1 mL d'*acide sulfurique dilué R* et 20,0 mL de *permanganate de potassium 0,002 M*. Portez à ébullition pendant 3 min. Refroidissez immédiatement et ajoutez 1 g d'*iodure de potassium R*. Titrez immédiatement par le *thiosulfate de sodium 0,01 M* en présence de 0,25 mL de *solution d'amidon R*. Effectuez un titrage sur 20,0 mL de la solution à blanc. La différence entre les volumes utilisés dans les deux titrages n'est pas supérieure à 1,5 mL.

**Transparence**. Introduisez dans le récipient utilisé pour la préparation de la solution S un volume égal à sa capacité nominale de suspension mère d'opalescence (*2.2.1*) diluée au 1/200 pour un récipient en polyéthylène ou en polypropylène et au 1/400 pour les autres récipients. Observé à travers les parois du récipient, le trouble de la suspension est perceptible par rapport à un récipient semblable rempli d'*eau R*.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette qui accompagne un lot de récipients vides indique :

– le nom et l'adresse du fabricant,
– un numéro de lot permettant de connaître les antécédents du récipient et de la matière plastique dont celui-ci est composé.

**01/2008:30203**

## 3.2.3. RÉCIPIENTS STÉRILES EN MATIÈRE PLASTIQUE POUR LE SANG HUMAIN ET LES PRODUITS DU SANG

Les récipients (ou poches) en matière plastique pour le prélèvement, la conservation, le traitement et l'administration du sang et de ses composants, sont fabriqués à partir d'un ou de plusieurs polymères avec, le cas échéant, certains additifs. La composition ainsi que les conditions de fabrication des récipients sont enregistrées par l'Autorité compétente selon la réglementation nationale et les accords internationaux régissant la matière.

Quand la composition des matériaux constituant les différentes parties de ces récipients correspond aux spécifications respectivement établies, elle est contrôlée par les méthodes indiquées dans ces textes (voir *3.1. Matériaux utilisés dans la fabrication des récipients* et sous-chapitres).

D'autres matériaux que ceux décrits à la Pharmacopée peuvent être utilisés, à condition que leur composition soit approuvée par l'Autorité compétente et que les récipients fabriqués avec de tels matériaux soient conformes au présent texte.

Dans les conditions normales d'utilisation, les matériaux ne doivent pas céder de monomères ou autres substances en quantités susceptibles d'être nuisibles, ni entraîner de modifications anormales du sang.

Les récipients peuvent contenir des solutions anticoagulantes selon l'usage envisagé ; ils sont fournis à l'état stérile.

Chaque récipient est muni de raccords appropriés à l'usage prévu. Il peut comporter un ou plusieurs compartiments ; dans ce dernier cas, le récipient de récolte est connecté par une ou plusieurs tubulures à une ou plusieurs poches secondaires pour permettre la séparation des composants du sang en système clos.

Les raccords sont de forme et de taille appropriées pour permettre l'adaptation convenable des dispositifs de transfert sur le récipient. Les dispositifs de protection placés sur l'aiguille de prélèvement et sur les raccords doivent assurer le maintien de la stérilité, être dotés d'un témoin d'inviolabilité et pouvoir être retirés facilement.

La capacité des récipients est en rapport avec la capacité nominale prescrite par l'Autorité compétente, ainsi que le volume approprié de solution anticoagulante. Leur forme est telle que les récipients remplis d'un liquide peuvent être centrifugés. Par capacité nominale, on entend le volume de sang à prélever dans le récipient.

Les récipients sont munis d'un dispositif adéquat de suspension ou de mise en position qui ne gêne ni le prélèvement, ni la conservation, ni la manipulation, ni l'administration du sang.

Les récipients sont contenus dans des enveloppes protectrices scellées.

## CARACTÈRES

Le récipient est suffisamment transparent pour permettre l'examen visuel adéquat de son contenu avant et après le prélèvement du sang et suffisamment élastique pour offrir le minimum de résistance au remplissage et à la vidange dans des conditions normales d'utilisation. Le récipient ne contient pas plus de 5 mL d'air.

## ESSAI

**Solution $S_1$**. Remplissez le récipient avec 100 mL d'une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L stérile et exempte de pyrogènes. Fermez le récipient et chauffez-le à l'autoclave de façon que la température du liquide soit maintenue à 110 °C pendant 30 min.

Si le récipient à examiner contient une solution anticoagulante, rejetez la solution au préalable, lavez le récipient avec 250 mL d'*eau pour préparations injectables R* à 20 ± 1 °C et rejetez les produits de lavage.

**Solution $S_2$**. Introduisez dans le récipient un volume d'*eau pour préparations injectables R* correspondant au volume de solution anticoagulante préconisé. Fermez le récipient et chauffez-le à l'autoclave de façon que la température du liquide soit maintenue à 110 °C pendant 30 min ; après refroidissement, remplissez le récipient d'*eau pour préparations injectables R* jusqu'à sa capacité nominale.

Si le récipient à examiner contient une solution anticoagulante, videz-le au préalable et rincez-le comme indiqué ci-dessus.

**Résistance à la centrifugation**. Introduisez dans le récipient un volume d'*eau R*, acidifié par addition de 1 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*, égal à sa capacité nominale. Enveloppez le récipient dans un papier absorbant imprégné d'une *solution de bleu de bromophénol R1* diluée au cinquième ou de tout autre indicateur approprié, puis séché. Centrifugez l'ensemble à 5000 *g* pendant 10 min. Il ne se produit aucune fuite révélée sur le papier indicateur, ni aucune distorsion permanente.

**Résistance à la traction**. Introduisez dans le récipient un volume d'*eau R*, acidifié par addition de 1 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*, égal à sa capacité nominale. Suspendez le récipient par le dispositif dont il est muni à l'opposé de la tubulure à prélèvement et appliquez dans l'axe de cette tubulure une force instantanée de 20 N (2,05 kgf). Maintenez la traction pendant 5 s. Répétez en appliquant la force à chacun des raccords de remplissage et de vidange. Il ne se produit ni rupture ni détérioration.

**Etanchéité**. Placez le récipient soumis au préalable à l'essai de résistance à la traction entre 2 plaques recouvertes de papier absorbant imprégné d'une *solution de bleu de bromophénol R1* diluée au cinquième ou de tout autre indicateur approprié, puis séché. Exercez progressivement une force sur les plaques afin de comprimer le récipient de façon que sa pression interne (c'est-à-dire la différence entre la pression appliquée et la pression atmosphérique) atteigne 67 kPa en 1 min. Maintenez cette pression pendant 10 min. Aucune fuite n'est révélée sur le papier indicateur notamment au niveau de tout point de raccordement tel que raccord, ou soudure.

**Imperméabilité à la vapeur**. Remplissez le récipient contenant une quantité de solution anticoagulante en ajoutant une quantité de solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L correspondant à la quantité de sang à laquelle le récipient est destiné.

Dans le cas d'un récipient vide, remplissez-le avec le même mélange de solution anticoagulante et de solution de chlorure de sodium. Fermez le récipient ainsi rempli, pesez-le, puis conservez-le pendant 21 jours à 5 ± 1 °C dans une atmosphère à humidité relative de (50 ± 5) pour cent. Après cette période, la perte de masse n'est pas supérieure à 1 pour cent.

**Vidange sous pression**. Remplissez le récipient avec une quantité d'*eau R* à 5 ± 1 °C, égale à la capacité nominale. Fixez à l'un des raccords une tubulure à transfusion ne comportant pas d'aiguille de veine. Comprimez le récipient de façon à maintenir pendant toute la vidange une pression interne (c'est-à-dire la différence entre la pression appliquée et la pression atmosphérique) de 40 kPa. Le récipient est vide en moins de 2 min.

**Vitesse de remplissage**. Raccordez le récipient au moyen de la tubulure de prélèvement munie de l'aiguille de ponction à un réservoir contenant une solution convenable, de même viscosité que le sang, telle qu'une solution de *saccharose R* à 335 g/L à 37 °C. La pression interne (c'est-à-dire la différence entre la pression appliquée et la pression atmosphérique) du réservoir étant de 9,3 kPa, le fond du réservoir et la partie supérieure du récipient étant maintenus au même niveau, le volume du liquide écoulé après 8 min dans le récipient est au moins égal à la capacité nominale de celui-ci.

**Résistance aux variations de température**. Placez le récipient dans une enceinte appropriée à la température initiale de 20-23 °C. Refroidissez-le rapidement au congélateur à – 80 °C et maintenez-le à cette température pendant 24 h. Elevez la température à 50 °C et maintenez à cette température pendant 12 h. Laissez refroidir à température ambiante. Le récipient satisfait aux essais prescrits ci-dessus : essai de résistance à la centrifugation, essai de résistance à la traction, essai d'étanchéité, essai d'imperméabilité à la vapeur, essai de vidange sous pression et essai de remplissage.

**Transparence**. Introduisez dans le récipient vide un volume égal à sa capacité nominale, de suspension mère d'opalescence (*2.2.1*) diluée de façon à ce que l'absorbance (*2.2.25*) mesurée à 640 nm, soit de 0,37 à 0,43 (dilution au 1/16 environ). Observé à travers les parois du récipient, le trouble de la suspension est perceptible par rapport à un récipient semblable rempli d'*eau R*.

**Matières extractibles**. Des essais sont effectués d'après des modalités destinées à simuler, autant que possible, les conditions de contact entre le récipient et son contenu qui sont réalisées au cours de l'emploi.

Les modalités de contact et les essais à effectuer sur les éluats sont indiqués, en fonction de la nature des matériaux constitutifs, dans les prescriptions particulières à chaque type de récipient.

**Effets hémolytiques dans des systèmes tamponnés**

*Solution tampon mère*. Dissolvez 90,0 g de *chlorure de sodium R*, 34,6 g de *phosphate disodique R* et 2,43 g de *phosphate monosodique R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000 mL avec le même solvant.

*Solution tampon* $A_0$. A 30,0 mL de solution tampon mère, ajoutez 10,0 mL d'*eau R*.

*Solution tampon* $B_0$. A 30,0 mL de solution tampon mère, ajoutez 20,0 mL d'*eau R*.

*Solution tampon* $C_0$. A 15,0 mL de solution tampon mère, ajoutez 85,0 mL d'*eau R*.

Dans 3 tubes d'une centrifugeuse, introduisez respectivement 1,4 mL de la solution $S_2$. Au tube I, ajoutez 0,1 mL de solution tampon $A_0$, au tube II 0,1 mL de solution tampon $B_0$ et au tube III 0,1 mL de solution tampon $C_0$. A chaque tube, ajoutez 0,02 mL de sang humain frais hépariné, mélangez bien et chauffez au bain-marie à 30 ± 1 °C pendant 40 min. Utilisez du sang prélevé depuis moins de 3 h ou du sang conservé dans la solution anticoagulante citratée-phosphatée-glucosée (CPD), prélevé depuis moins de 24 h.

Préparez 3 solutions contenant respectivement :

3,0 mL de solution tampon $A_0$ et 12,0 mL d'*eau R* (solution $A_1$)

4,0 mL de solution tampon $B_0$ et 11,0 mL d'*eau R* (solution $B_1$)

4,75 mL de solution tampon $B_0$ et 10,25 mL d'*eau R* (solution $C_1$).

Aux tubes I, II et III, ajoutez respectivement 1,5 mL de solution $A_1$, 1,5 mL de solution $B_1$ et 1,5 mL de solution $C_1$. Préparez simultanément 3 autres tubes de façon analogue en remplaçant la solution $S_2$ par de l'*eau R*. Centrifugez simultanément les tubes à examiner et les tubes témoins à exactement 2500 *g* dans une même centrifugeuse horizontale pendant 5 min. Après la centrifugation, mesurez les absorbances (*2.2.25*) des liquides à 540 nm en utilisant la solution tampon mère comme liquide de compensation et calculez en pourcentage l'indice hémolytique par la relation :

$$\frac{A_{exp}}{A_{100}} \times 100$$

$A_{100}$ = absorbance du tube III,

$A_{exp}$ = absorbance des tubes I et II respectivement et des tubes témoins correspondants.

La solution dans le tube I fournit un indice hémolytique qui ne dépasse pas 10 pour cent et l'indice hémolytique de la solution utilisée dans le tube II ne s'écarte pas plus de 10 pour cent de celui du tube témoin correspondant.

**Stérilité** (*2.6.1*). Les récipients satisfont à l'essai de stérilité. Dans le récipient, introduisez aseptiquement 100 mL d'une solution stérile de chlorure de magnésium à 9 g/L. Agitez le récipient pour vérifier que les surfaces internes sont entièrement humectées. Filtrez le contenu sur une membrane filtrante et placez la membrane dans un milieu de culture approprié comme prescrit dans l'essai de stérilité.

**Pyrogènes** (*2.6.8*). La solution $S_1$ satisfait à l'essai des pyrogènes. Injectez à chaque lapin, par kilogramme de masse corporelle, 10 mL de la solution.

**Toxicité anormale** (*2.6.9*). La solution $S_1$ satisfait à l'essai de toxicité anormale. Injectez à chaque souris 0,5 mL de la solution.

CONDITIONNEMENT

Les récipients sont conditionnés dans des enveloppes protectrices.

Au moment de l'ouverture de l'enveloppe protectrice, le récipient ne présente aucune trace de développement de microorganismes ni de fuites. L'enveloppe protectrice est assez solide pour résister à une manipulation normale.

L'enveloppe protectrice est scellée de façon qu'elle ne puisse être ouverte, puis refermée sans laisser de traces visibles de la destruction du scellage.

ÉTIQUETAGE

L'étiquetage est conforme aux prescriptions générales internationales et nationales régissant la matière.

L'étiquette indique en particulier :

– le nom et l'adresse du fabricant,
– un numéro de lot permettant de connaître les antécédents du récipient et de la matière plastique dont celui-ci est composé ;

Une partie de l'étiquette est réservée à :

– l'indication du groupe sanguin, du numéro de référence et de toute autre information exigée par les prescriptions nationales ou internationales. Un espace reste libre pour l'application des étiquetages complémentaires.

L'étiquette de l'*enveloppe protectrice* ou du *récipient* visible à travers l'enveloppe indique :

– la date de péremption,
– que le récipient, une fois retiré de son enveloppe protectrice, doit être utilisé dans les 10 jours.

L'encre ou toute autre substance utilisée pour imprimer les étiquettes ou les inscriptions, ne doit pas diffuser dans la matière plastique du récipient et doit rester visible jusqu'au moment de l'utilisation.

**01/2008:30204**

## 3.2.4. RÉCIPIENTS VIDES ET STÉRILES EN MATÉRIAU À BASE DE POLY(CHLORURE DE VINYLE) PLASTIFIÉ POUR LE SANG HUMAIN ET LES PRODUITS DU SANG

Sauf dans les cas autorisés définis sous *Récipients stériles en matière plastique pour le sang humain et les produits du sang* (*3.2.3*), la nature et la composition du matériau constituant le récipient sont conformes aux prescriptions données sous *Matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) plastifié pour récipients destinés à contenir le sang humain et les produits du sang et les solutions aqueuses pour perfusion intraveineuse* (*3.1.1*).

ESSAI

Les récipients sont conformes aux essais prescrits sous *Récipients stériles en matière plastique pour le sang humain et les produits du sang* (*3.2.3*) ainsi qu'aux essais suivants de recherche de matières extractibles.

**Solution de référence**. Utilisez de l'*eau pour préparations injectables R* contenue dans un ballon de verre borosilicaté et chauffée à l'autoclave à 110 °C pendant 30 min.

**Acidité ou alcalinité**. Prélevez un volume de solution $S_2$ correspondant à 4 pour cent de la capacité nominale du récipient. Ajoutez 0,1 mL de *solution de phénolphtaléine R*. La solution reste incolore. Ajoutez 0,4 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*. La solution est rose. Ajoutez 0,8 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M* et 0,1 mL de *solution de rouge de méthyle R*. La solution est rouge-orange ou rouge.

**Absorbance** (*2.2.25*) : au maximum 0,30, déterminé à toutes les longueurs d'onde entre 230 nm et 250 nm avec la solution $S_2$ ; au maximum 0,10, déterminé à toutes les longueurs d'onde entre 251 nm et 360 nm avec la solution $S_2$. Utilisez la solution de référence comme liquide de compensation.

**Substances oxydables**. Immédiatement après la préparation de la solution $S_2$ (voir *3.2.3*), prélevez un volume correspondant à 8 pour cent de la capacité nominale du récipient et introduisez-le dans un ballon de verre borosilicaté. Préparez simultanément l'essai à blanc avec un volume égal de solution de référence récemment préparée dans un autre ballon de verre borosilicaté. A chacune des solutions, ajoutez 20,0 mL de *permanganate de potassium 0,002 M* et 1 mL d'*acide sulfurique dilué R* et laissez reposer à l'abri de la lumière pendant 15 min. Ajoutez à chacune des solutions 0,1 g d'*iodure de potassium R*. Laissez reposer à l'abri de la lumière pendant 5 min et titrez immédiatement par le *thiosulfate de sodium 0,01 M* en présence de 0,25 mL de *solution d'amidon R*. La différence entre les 2 titrages est au maximum de 2,0 mL.

**Phtalate de di(2-éthylhexyle) extractible**. Utilisez comme solvant d'extraction de l'*éthanol à 96 pour cent R* dilué avec de l'*eau R* de façon à obtenir une densité (*2.2.5*) de 0,9389 à 0,9395, mesurée à l'aide d'un pycnomètre.

*Solution mère*. Dissolvez 0,100 g de *phtalate de di(2-éthylhexyle) R* dans le solvant d'extraction et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Solutions étalons*. Dans 5 fioles jaugés de 100 mL, introduisez respectivement 1,0 mL, 2,0 mL, 5,0 mL, 10,0 mL et 20,0 mL de solution mère et complétez à 100,0 mL avec le solvant d'extraction.

Mesurez les absorbances (*2.2.25*) des solutions étalons au maximum d'absorption à 272 nm en utilisant comme liquide de compensation le solvant d'extraction et construisez la courbe des absorbances par rapport aux concentrations en phtalate de di(2-éthylhexyle).

*Extraction*. Par la tubulure, l'aiguille ou l'adaptateur, introduisez dans le récipient vide une quantité, égale à la moitié du volume nominal, de solvant d'extraction préalablement chauffé à 37 °C dans un ballon bien fermé. Chassez tout l'air du récipient et scellez la tubulure. Immergez le récipient ainsi rempli, en position horizontale, dans un bain d'eau maintenu à 37 ± 1 °C pendant 60 ± 1 min sans agiter. Retirez le récipient du bain, retournez le doucement une dizaine de fois, puis transvasez le contenu dans un ballon de verre. Mesurez immédiatement l'absorbance au maximum d'absorption à 272 nm en utilisant comme liquide de compensation le solvant d'extraction.

Déterminez, à l'aide de la courbe d'étalonnage, la concentration en phtalate de di(2-éthylhexyle) en milligrammes par 100 mL d'extrait. La concentration est au maximum de :

– 10 mg par 100 mL pour les récipients d'un volume nominal supérieur à 300 mL mais inférieur à 500 mL,
– 13 mg par 100 mL pour les récipients d'un volume nominal supérieur à 150 mL mais inférieur à 300 mL,
– 14 mg par 100 mL pour les récipients d'un volume nominal maximal de 150 mL.

**Chlorures** (*2.4.4*) : au maximum 0,4 ppm, déterminé avec la solution $S_2$.

Préparez le témoin avec un mélange de 1,2 mL de *solution à 5 ppm de chlorure (Cl) R* et de 13,8 mL d'*eau R*.

**Ammonium** (*2.4.1*) : au maximum 2 ppm.

Prélevez 5 mL de solution $S_2$ et complétez à 14 mL avec de l'*eau R*.

**Résidu à l'évaporation**. Dans un vase cylindrique de verre borosilicaté de capacité adéquate, préalablement chauffé à 105 °C, évaporez à siccité 100 mL de solution $S_2$. Evaporez dans les mêmes conditions 100 mL de solution de référence (essai à blanc). Desséchez à masse constante à 100-105 °C. La masse du résidu de la solution $S_2$ est au maximum de 3 mg compte tenu de l'essai à blanc.

CONDITIONNEMENT

Voir *Récipients stériles en matière plastique pour le sang humain et les produits du sang* (*3.2.3*).

ÉTIQUETAGE

Voir *Récipients stériles en matière plastique pour le sang humain et les produits du sang* (*3.2.3*).

**01/2008:30205**

# 3.2.5. RÉCIPIENTS STÉRILES EN MATÉRIAU À BASE DE POLY(CHLORURE DE VINYLE) PLASTIFIÉ POUR LE SANG HUMAIN, ET RENFERMANT UNE SOLUTION ANTICOAGULANTE

Les récipients stériles renfermant une solution anticoagulante conforme à la monographie *Solutions anticoagulantes et de conservation du sang humain (0209)* sont utilisés pour le prélèvement, la conservation et l'administration du sang. Ils sont conformes, avant remplissage, à la description et aux caractères indiqués sous *Récipients vides et stériles en matériau à base de poly(chlorure de vinyle) plastifié pour le sang humain et les produits du sang* (*3.2.4*).

Sauf dans les cas autorisés définis sous *Récipients stériles en matière plastique pour le sang humain et les produits du sang* (*3.2.3*), la nature et la composition du matériau constituant le récipient sont conformes aux exigences prescrites sous *Matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) plastifié pour récipients destinés à contenir le sang humain et les produits du sang et les solutions aqueuses pour perfusion intraveineuse* (*3.1.1*).

ESSAI

Le récipient satisfait aux essais prescrits sous *Récipients stériles en matière plastique pour le sang humain et les produits du sang* (*3.2.3*) ainsi qu'aux essais suivants de contrôle du volume de la solution anticoagulante et de recherche des matières extractibles.

**Volume de la solution anticoagulante**. Videz un récipient et recueillez la solution anticoagulante dans une éprouvette graduée. Le volume trouvé correspond à la quantité indiquée à ± 10 pour cent près.

**Examen spectrophotométrique** (*2.2.25*). Mesurez l'absorbance de la solution anticoagulante, extraite du récipient, de 250 nm à 350 nm en utilisant comme liquide de compensation une solution anticoagulante de même composition qui n'a pas été en contact avec une matière plastique. L'absorbance au maximum d'absorption à 280 nm n'est pas supérieure à 0,5.

**Phtalate de di(2-éthylhexyle) extractible**. Eliminez soigneusement la solution anticoagulante par le tube souple à prélèvement. A l'aide d'un entonnoir monté sur le tube à prélèvement, remplissez complètement le récipient avec de l'*eau R*, laissez en contact pendant 1 min en massant légèrement le récipient, puis videz-le complètement. Répétez ce rinçage. Le récipient ainsi vidé et rincé satisfait à l'essai correspondant prescrit sous *Récipients vides et stériles en matériau à base de poly(chlorure de vinyle) plastifié pour le sang humain et les produits du sang* (*3.2.4*).

CONDITIONNEMENT ET ÉTIQUETAGE

Voir *Récipients stériles en matière plastique pour le sang humain et les produits du sang* (*3.2.3*).

**01/2008:30206**

# 3.2.6. NÉCESSAIRES POUR LA TRANSFUSION DU SANG ET DES PRODUITS DU SANG

DÉFINITION

Les nécessaires pour la transfusion du sang et des produits du sang se composent principalement d'un système de tubes en plastique auxquels sont fixés de façon appropriée des dispositifs qui permettent l'emploi du nécessaire pour la transfusion. Les nécessaires comportent un perforateur, un filtre à sang, une chambre compte-goutte, un régulateur de débit, un embout Luer et, généralement, un site pour injection extemporanée. Lorsque les nécessaires sont utilisés avec des récipients exigeant une prise d'air filtrante, celle-ci peut soit être incorporée au perforateur, soit faire l'objet d'un dispositif séparé. La chambre du filtre à sang, la chambre compte-goutte et le tube principal sont transparents. La conception du nécessaire et le type de composants choisis sont tels qu'ils assurent l'absence d'effets hémolytiques. Les nécessaires répondent aux caractéristiques dimensionnelles et fonctionnelles en usage.

Toutes les parties du nécessaire pouvant être mises en contact avec le sang et les produits du sang sont stériles et apyrogènes. Chaque nécessaire est présenté dans un emballage protecteur individuel de stérilité. Les nécessaires ne doivent ni subir une nouvelle stérilisation ni être réutilisés.

Les nécessaires pour la transfusion du sang et des produits du sang sont fabriqués conformément aux bonnes pratiques de fabrication pour les articles médicaux et aux règlements nationaux.

ESSAI

*Effectuez les essais sur les nécessaires stérilisés.*

**Solution S**. Réalisez un système de circulation en circuit fermé avec 3 nécessaires et un récipient de verre borosilicaté de 300 mL. Maintenez la température du liquide dans le récipient à 37 ± 1 °C à l'aide d'un dispositif approprié. Faites circuler dans le sens utilisé pour la transfusion 250 mL d'*eau pour préparations injectables R* à un débit de 1 L/h pendant 2 h (par exemple, au moyen d'une pompe péristaltique munie d'une tubulure de silicone-élastomère appropriée dont la longueur est la plus courte possible). Recueillez la totalité de la solution et laissez refroidir.

**Aspect de la solution**. La solution S est limpide (*2.2.1*) et incolore (*2.2.2, Procédé II*).

**Acidité ou alcalinité**. A 25 mL de solution S, ajoutez 0,15 mL de *solution d'indicateurs BRP R*. Le virage de l'indicateur au bleu ne nécessite pas plus de 0,5 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*. A 25 mL de solution S, ajoutez 0,2 mL de *solution de méthylorange R*. Le début du virage de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,5 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M*.

**Absorbance** (*2.2.25*) : au maximum 0,30, déterminé à toutes les longueurs d'onde entre 230 nm et 250 nm avec la solution S ; au maximum 0,15, déterminé à toutes les longueurs d'onde entre 251 nm et 360 nm avec la solution S.

**Substances réductrices**. *Effectuez l'essai dans les 4 h qui suivent la préparation de la solution S.* A 20,0 mL de solution S, ajoutez 1 mL d'*acide sulfurique dilué R* et 20,0 mL de *permanganate de potassium 0,002 M*. Portez à ébullition pendant 3 min et refroidissez immédiatement. Ajoutez 1 g d'*iodure de potassium R* et titrez par le *thiosulfate de sodium 0,01 M* en présence de 0,25 mL de *solution d'amidon R*. Effectuez un essai à blanc avec 20 mL d'*eau pour préparations injectables R*. La différence entre les volumes utilisés dans les 2 titrages est au maximum de 2,0 mL.

**Oxyde d'éthylène**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*).

*Colonne* :

– *matériau* : acier inoxydable,
– *dimensions* : *l* = 1,5 m, Ø = 6,4 mm,
– *phase stationnaire* : *terre d'infusoires silanisée pour chromatographie en phase gazeuse R*, imprégnée de *macrogol 1500 R* (3 g pour 10 g).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 20 mL/min.

*Température* :

– *colonne* : 40 °C,
– *chambre à injection* : 100 °C,
– *détecteur* : 150 °C.

*Détection* : ionisation de flamme.

Vérifiez l'absence de pics interférant avec celui dû à l'oxyde d'éthylène en effectuant l'essai soit avec un nécessaire non stérilisé soit en utilisant le même système chromatographique avec les modifications suivantes.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 3 m, Ø = 3,2 mm,
– *phase stationnaire* : *terre d'infusoires silanisée pour chromatographie en phase gazeuse R*, imprégnée de *triscyanoéthoxypropane R* (2 g pour 10 g),
– *température* : 60 °C.

*Solution d'oxyde d'éthylène. A préparer sous hotte ventilée.* Dans un flacon de 50 mL, introduisez 50,0 mL de *diméthylacétamide R*, bouchez et sertissez, puis pesez l'ensemble à 0,1 mg près. Remplissez une seringue de 50 mL, en polyéthylène ou en polypropylène, avec de l'*oxyde d'éthylène R* gazeux. Laissez le gaz en contact avec la seringue pendant environ 3 min ; videz la seringue, puis remplissez-la à nouveau avec 50 mL d'*oxyde d'éthylène R* gazeux. Adaptez à la seringue une aiguille hypodermique et ramenez le volume de gaz contenu dans la seringue de 50 mL à 25 mL. Injectez lentement ces 25 mL d'oxyde d'éthylène dans le flacon en agitant légèrement et en évitant tout contact entre l'aiguille et le liquide. Pesez à nouveau le flacon ; l'augmentation de masse est comprise entre 45 mg et 60 mg et permet de déduire le titre exact de la solution (environ 1 g/L).

*Essai.* Pesez le nécessaire débarrassé de son emballage, découpez-le en morceaux de 1 cm de côté au maximum et introduisez-les dans un flacon de 250-500 mL contenant 150 mL de *diméthylacétamide R*. Fermez le flacon avec un bouchon approprié et sertissez. Placez le flacon dans une étuve à 70 ± 1 °C pendant 16 h. Prélevez 1 mL du gaz chaud contenu dans le flacon et injectez-le sur la colonne. A l'aide de la courbe d'étalonnage et à partir de la hauteur du pic obtenu, calculez la masse d'oxyde d'éthylène contenu dans le flacon.

*Courbe d'étalonnage.* Dans une série de 7 flacons identiques à celui utilisé pour l'essai et contenant chacun 150 mL de *diméthylacétamide R*, introduisez respectivement : 0 mL, 0,05 mL, 0,10 mL, 0,20 mL, 0,50 mL, 1,00 mL et 2,00 mL de solution d'oxyde d'éthylène, soit environ 0 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg, 500 µg, 1000 µg et 2000 µg d'oxyde d'éthylène. Bouchez, sertissez et placez les flacons dans une étuve à 70 ± 1 °C pendant 16 h. Injectez sur la colonne 1 mL du gaz chaud contenu dans chaque flacon et construisez la courbe d'étalonnage à partir des hauteurs des pics et de la masse d'oxyde d'éthylène contenu dans chaque flacon.

*Limite* : si l'étiquette indique que l'oxyde d'éthylène a été utilisé pour la stérilisation :

– *oxyde d'éthylène* : au maximum 10 ppm.

**Particules étrangères**. Remplissez le nécessaire par l'orifice d'entrée avec une solution de *laurilsulfate de sodium R* à 0,1 g/L, filtrée au préalable sur un filtre de verre fritté (16) (*2.1.2*) et portée à 37 °C. Recueillez le liquide en le laissant s'écouler par l'orifice de sortie. Examiné dans des conditions appropriées de visibilité, le liquide est limpide et pratiquement exempt de particules ou filaments visibles (en ce qui concerne cet essai, il est supposé que les particules et les filaments d'un diamètre égal ou supérieur à 50 µm sont visibles à l'oeil nu).

**Débit**. Faitez passer à travers un nécessaire complet avec le régulateur de débit totalement ouvert 50 mL d'une solution ayant une viscosité de 3 mPa·s (3 cP) (par exemple, une solution de *macrogol 4000 R* à 33 g/L à une température de 20 °C), la différence de niveau entre le bouchon du flacon et l'embout porte-aiguille du nécessaire étant de 1 m. Le temps d'écoulement de 50 mL de solution est au maximum de 90 s.

**Résistance à la pression**. Rendez étanches les extrémités du nécessaire et le dispositif éventuel de prise d'air. Reliez le nécessaire à une source d'air comprimé munie d'un régulateur de pression. Immergez le nécessaire dans une cuve d'eau à 20-23 °C. Etablissez progressivement une surpression d'air de 100 kPa et maintenez-la pendant 1 min. Aucune bulle d'air ne s'échappe du nécessaire.

**Transparence**. Utilisez comme suspension de référence la suspension-mère d'opalescence (*2.2.1*) diluée au 1/8 dans le cas des nécessaires de diamètre extérieur inférieur à 5 mm et diluée au 1/16 dans le cas des nécessaires de diamètre extérieur égal ou supérieur à 5 mm. Faites circuler la suspension de référence dans le nécessaire. Comparez à un nécessaire du même lot rempli d'*eau R*. L'opalescence et la présence de bulles sont perceptibles.

**Résidu à l'évaporation**. Evaporez à siccité au bain-marie 50,0 mL de solution S et desséchez à l'étuve à 100-105 °C jusqu'à masse constante. Effectuez un essai à blanc avec 50,0 mL d'*eau pour préparations injectables R*. La différence entre la masse de chaque résidu est au maximum de 1,5 mg.

**Stérilité** (*2.6.1*). Les nécessaires satisfont à l'essai de stérilité. Si le nécessaire est déclaré stérile uniquement à l'intérieur, faites passer 50 mL de solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0 (*2.6.12*) à travers le nécessaire et utilisez la solution pour effectuer l'essai de stérilité par la méthode de filtration sur membrane.

Si le nécessaire est déclaré stérile à l'intérieur et à l'extérieur, ouvrez le sachet avec les précautions d'asepsie nécessaires, puis :

– pour la technique d'ensemencement direct, introduisez le nécessaire ou ses composants dans un récipient approprié renfermant le milieu de culture en quantité suffisante pour que l'immersion soit complète,
– pour la technique par filtration sur membrane, introduisez le nécessaire ou ses composants dans un récipient approprié renfermant de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0 (*2.6.12*) en quantité suffisante pour permettre un rinçage total par agitation pendant 10 min.

**Pyrogènes** (*2.6.8*). Prélevez 5 nécessaires, reliez-les les uns aux autres et faites passer dans l'ensemble, à un débit ne dépassant pas 10 mL/min, 250 mL d'une solution stérile et apyrogène de *chlorure de sodium R* à 9 g/L. Recueillez cette solution aseptiquement dans un récipient exempt de substances pyrogènes. La solution satisfait à l'essai des pyrogènes. Injectez, à chaque lapin, par kilogramme de masse corporelle, 10 mL de la solution.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique notamment, dans les cas appropriés, que l'oxyde d'éthylène a été utilisé pour la stérilisation.

**01/2008:30208**

## 3.2.8. SERINGUES EN MATIÈRE PLASTIQUE NON RÉUTILISABLES, STÉRILES

DÉFINITION

Les seringues en matière plastique non réutilisables, stériles, sont des accessoires médicaux destinés à un emploi extemporané pour l'administration des préparations injectables. Elles sont délivrées stériles et apyrogènes. Elles ne doivent en aucun cas subir une nouvelle stérilisation ni être réutilisées. Elles sont composées d'un corps de seringue et d'un piston qui peut comporter un joint en élastomère et peuvent être munies d'une aiguille solidaire ou non de l'ensemble. Chaque seringue comporte une protection individuelle de stérilité.

Le corps de la seringue est suffisamment transparent pour permettre la lecture sans difficulté du volume à administrer et la détection des bulles d'air et des particules étrangères.

Les matières plastiques et les matériaux à base d'élastomère constitutifs du corps et du piston satisfont aux exigences des spécifications correspondantes ou aux exigences de l'Autorité compétente. Le polypropylène et le polyéthylène sont les matériaux les plus couramment employés. Les seringues répondent aux caractéristiques dimensionnelles et fonctionnelles usuelles.

Pour faciliter le fonctionnement de la seringue, de l'huile de silicone (*3.1.8*) peut être déposée sur les parois internes du corps. Aucun excédent susceptible de contaminer le contenu lors de l'injection ne persiste. Les encres, les colles et les adhésifs utilisés pour le marquage et éventuellement l'assemblage de la seringue ou de son emballage ne migrent pas à travers la paroi.

ESSAI

**Solution S**. Préparez la solution de façon à éviter la contamination par des particules étrangères. Prélevez des seringues en nombre suffisant pour obtenir 50 mL de solution. Remplissez chaque seringue à son volume nominal avec de l'*eau pour préparations injectables R* et maintenez-les à 37 °C pendant 24 h. Réunissez le contenu des seringues dans un récipient de verre borosilicaté.

**Aspect de la solution**. La solution S est limpide (*2.2.1*) et incolore (*2.2.2, Procédé II*) et elle est pratiquement exempte de particules étrangères solides.

**Acidité ou alcalinité**. A 20 mL de solution S, ajoutez 0,1 mL de *solution de bleu de bromothymol R1*. Le virage de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,3 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M* ou d'*acide chlorhydrique 0,01 M*.

**Absorbance** (*2.2.25*) : au maximum 0,40, déterminé à toutes les longueurs d'onde entre 220 nm et 360 nm avec la solution S.

**Oxyde d'éthylène**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*).

*Colonne* :

– *matériau* : acier inoxydable,
– *dimensions* : $l$ = 1,5 m, Ø = 6,4 mm,
– *phase stationnaire* : *terre d'infusoires silanisée pour chromatographie en phase gazeuse R*, imprégnée de *macrogol 1500 R* (3 g par 10 g).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 20 mL/min.

*Température* :

– *Colonne* : 40 °C,
– *Chambre à injection* : 100 °C,
– *Détecteur* : 150 °C.

*Détection* : ionisation de flamme.

Vérifiez l'absence de pics interférant avec celui dû à l'oxyde d'éthylène en effectuant l'essai soit avec une seringue non stérilisée soit en utilisant le même système chromatographique avec les modifications suivantes :

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 3 m, Ø = 3,2 mm,
– *phase stationnaire* : *terre d'infusoires silanisée pour chromatographie en phase gazeuse R* imprégnée de *triscyanoéthoxypropane R* (2 g par 10 g),
– *température* : 60 °C.

*Solution d'oxyde d'éthylène*. Préparez sous hotte aspirante. Dans un flacon de 50 mL, introduisez 50,0 mL de *diméthylacétamide R*, bouchez et sertissez, puis pesez l'ensemble à 0,1 mg près. Remplissez une seringue de 50 mL, en

polyéthylène ou en polypropylène, avec de l'*oxyde d'éthylène R* gazeux. Laissez le gaz en contact avec la seringue pendant environ 3 min ; videz la seringue, puis remplissez-la à nouveau avec 50 mL d'*oxyde d'éthylène R* gazeux. Adaptez à la seringue une aiguille hypodermique et ramenez le volume de gaz contenu de 50 mL à 25 mL. Injectez lentement ces 25 mL d'oxyde d'éthylène dans le flacon en agitant légèrement et en évitant tout contact entre l'aiguille et le liquide. Pesez à nouveau le flacon ; l'augmentation de masse est de 45 mg à 60 mg et permet de calculer la concentration exacte de la solution (environ 1 g/L).

*Courbe d'étalonnage*. Dans une série de 7 flacons identiques à celui utilisé pour l'essai et contenant chacun 150 mL de *diméthylacétamide R*, introduisez respectivement : 0 mL, 0,05 mL, 0,10 mL, 0,20 mL, 0,50 mL, 1,00 mL et 2,00 mL de solution d'oxyde d'éthylène, soit environ 0 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg, 500 µg, 1000 µg et 2000 µg d'oxyde d'éthylène. Bouchez, sertissez et placez les flacons dans une étuve à 70 ± 1 °C pendant 16 h . Injectez sur la colonne 1 mL du gaz chaud contenu dans chaque flacon et construisez la courbe d'étalonnage à partir des hauteurs des pics et de la masse d'oxyde d'éthylène contenu dans chaque flacon.

*Essai*. Pesez la seringue débarrassée de son emballage, découpez-la en morceaux de 1 cm de côté au maximum et introduisez-les dans un flacon de 250 mL à 500 mL contenant 150 mL de *diméthylacétamide R*. Fermez le flacon avec un bouchon approprié et sertissez. Placez le flacon dans une étuve à 70 ± 1 °C pendant 16 h. Prélevez 1 mL du gaz chaud contenu dans le flacon et injectez-le sur la colonne. Calculez la masse d'oxyde d'éthylène contenu dans le flacon à l'aide de la courbe d'étalonnage et à partir de la hauteur du pic obtenu.

*Limite* : si l'étiquette indique que l'oxyde d'éthylène a été utilisé pour la stérilisation :

– oxyde d'éthylène : au maximum 10 ppm.

**Huile de silicone**. Calculez la surface intérieure d'une seringue, en centimètres carrés, à l'aide de l'expression suivante :

$$2\sqrt{V \cdot \pi \cdot h}$$

$V$ = volume nominal de la seringue, en centimètres cubes,

$h$ = hauteur de la graduation, en centimètres.

Prélevez un nombre suffisant de seringues pour obtenir une surface intérieure totale de 100 $cm^2$ à 200 $cm^2$. Aspirez dans chaque seringue un volume de *chlorure de méthylène R* correspondant à la moitié du volume nominal, puis complétez au volume nominal avec de l'air. Balayez la surface intérieure correspondant au volume nominal avec le solvant, par 10 retournements successifs, en obturant l'embout de fixation de l'aiguille avec un doigt recouvert d'un film plastique inerte vis-à-vis du chlorure de méthylène. Rassemblez le chlorure de méthylène de chaque seringue dans une capsule tarée et répétez l'opération. Evaporez le chlorure de méthylène au bain-marie. Séchez à 100-105 °C pendant 1 h. Pesez le résidu. La masse du résidu ne dépasse pas 0,25 mg par centimètre carré de surface intérieure.

Examinez le résidu par spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*). Le spectre présente les bandes d'absorption typiques de l'huile de silicone à 805 $cm^{-1}$, à 1020 $cm^{-1}$, à 1095 $cm^{-1}$, à 1260 $cm^{-1}$ et à 2960 $cm^{-1}$.

**Substances réductrices**. A 20,0 mL de solution S, ajoutez 2 mL d'*acide sulfurique R* et 20,0 mL de *permanganate de potassium 0,002 M*. Portez à ébullition pendant 3 min, puis refroidissez immédiatement. Ajoutez 1 g d'*iodure de potassium R* et titrez immédiatement par le *thiosulfate de sodium 0,01 M* en présence de 0,25 mL de *solution d'amidon R*. Effectuez un titrage à blanc sur 20,0 mL d'*eau pour préparations injectables R*. La différence entre les volumes utilisés dans les titrages est au maximum de 3,0 mL.

**Transparence**. Prélevez 2 seringues. Remplissez l'une avec de l'*eau R* (témoin) et l'autre avec une dilution au 1/10 de la suspension-mère d'opalescence (*2.2.1*). Laissez reposer la suspension-mère d'opalescence à 20 ± 2 °C pendant 24 h avant l'emploi. Examinez à l'oeil nu en lumière diffuse sur fond noir. L'opalescence de la suspension est perceptible par rapport au témoin.

**Stérilité** (*2.6.1*). *Les seringues déclarées stériles dans leur totalité satisfont à l'essai de stérilité suivant.* Dans des conditions d'asepsie, ouvrez l'emballage, retirez la seringue, séparez les composants et introduisez-les dans un récipient approprié contenant une quantité de milieu liquide permettant l'immersion complète. Effectuez l'essai en utilisant les 2 milieux recommandés (*2.6.1*).

*Les seringues déclarées stériles uniquement à l'intérieur satisfont à l'essai de stérilité suivant.* Utilisez 50 mL du milieu à ensemencer pour chaque seringue à soumettre à l'essai. Dans des conditions d'asepsie, enlevez le protecteur de l'aiguille et plongez celle-ci dans le milieu de culture. Rincez la seringue à 5 reprises en actionnant le piston sur toute sa longueur.

**Pyrogènes** (*2.6.8*). Les seringues dont le volume nominal est égal ou supérieur à 15 mL satisfont à l'essai des pyrogènes. Remplissez au moins 3 seringues à leur volume nominal avec une solution apyrogène de *chlorure de sodium R* à 9 g/L et maintenez à 37 °C pendant 2 h. Réunissez les solutions aseptiquement dans un récipient exempt de pyrogènes et effectuez l'essai immédiatement. Injectez à chaque lapin, par kilogramme de masse corporelle, 10 mL de la solution.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette de l'*emballage* indique :

– le numéro de lot,
– une description de la seringue,
– que la seringue n'est pas réutilisable.

L'étiquette de l'*emballage extérieur* indique :

– la méthode de stérilisation,
– que la seringue est stérile dans sa totalité ou seulement à l'intérieur,
– le nom du fabricant,
– que la seringue ne doit pas être utilisée si l'emballage est endommagé ou si le protecteur de stérilité est détaché.

**01/2008:30209**
**corrigé 7.0**

## 3.2.9. FERMETURES EN CAOUTCHOUC POUR RÉCIPIENTS DESTINÉS AUX PRÉPARATIONS PARENTÉRALES AQUEUSES, AUX POUDRES ET AUX POUDRES CRYODESSÉCHÉES

Les fermetures en caoutchouc pour récipients destinés aux préparations parentérales aqueuses, aux poudres et aux poudres cryodesséchées sont constituées de matériaux obtenus par réticulation, en présence d'additifs appropriés, de produits organiques macromoléculaires (élastomères) dérivant de substances synthétiques ou naturelles par polymérisation, polyaddition ou polycondensation. La nature des produits de base et celle des divers additifs (agents de vulcanisation, accélérateurs, stabilisants, pigments...) entrant dans la composition du matériau dépend des propriétés auxquelles doit satisfaire l'objet fini. Les spécifications s'appliquent également au cas des fermetures pour récipients contenant des poudres ou des produits cryodesséchés à dissoudre extemporanément dans l'eau. Ces normes ne s'appliquent pas aux fermetures en élastomère de silicone (qui sont traitées sous *Silicone-élastomère pour fermetures et tubulures* (*3.1.9*)), ni aux fermetures laminées, ni aux fermetures laquées.

Les fermetures en caoutchouc peuvent être classées selon 2 types : les fermetures de type I répondent aux exigences les plus sévères, elles sont utilisées de préférence ; les fermetures de type II possèdent les caractéristiques mécaniques convenant à des usages spéciaux (perforations multiples...) et ne peuvent satisfaire à des exigences aussi sévères que celles de la première catégorie en raison de leur composition chimique.

Lorsqu'elles ont été sélectionnées pour une préparation particulière, les fermetures sont telles que :

– les composants de la préparation en contact avec la fermeture ne soient pas adsorbés à la surface et ne migrent pas dans ou à travers elle à un degré suffisant pour altérer la préparation,
– la fermeture ne cède pas à la préparation des substances en quantité suffisante pour en affecter la stabilité ou pour entraîner un risque de toxicité.

Les fermetures sont compatibles avec la préparation pour laquelle elles sont utilisées pendant toute sa période de validité.

Le fabricant de la préparation doit obtenir du fournisseur la garantie que la composition de la fermeture ne varie pas et qu'elle est identique à celle de la fermeture utilisée lors des essais de compatibilité. Les essais de compatibilité doivent être de nouveau effectués partiellement ou complètement en fonction de la nature des modifications apportées à la formule dont le fournisseur tient informé le fabricant de la préparation.

Les fermetures sont lavées et peuvent être stérilisées avant usage.

CARACTÈRES

Les fermetures en caoutchouc sont élastiques, soit translucides, soit opaques, sans coloration caractéristique, celle-ci dépendant des additifs utilisés. Elles sont pratiquement insolubles dans le tétrahydrofurane, solvant dans lequel une dilatation réversible considérable peut toutefois se produire. Elles sont homogènes et pratiquement exemptes de barbes et d'inclusions accidentelles (par exemple fibres, particules étrangères, déchets de caoutchouc).

*Cette spécification ne prévoit pas une identification du type de caoutchouc employé pour la fermeture. L'identification donnée ci-après est destinée à différencier les fermetures en élastomère des fermetures faites d'autres matières non élastiques mais ne différencie pas les divers types de caoutchouc. D'autres contrôles d'identité peuvent être effectués afin de déceler des différences dans un lot par rapport aux fermetures sur lesquelles les essais de compatibilité ont été effectués. Une ou plusieurs des méthodes analytiques suivantes peuvent être utilisées dans ce but : détermination de la densité, détermination des cendres sulfuriques, détermination de la teneur en soufre, chromatographie sur couche mince effectuée sur un extrait, spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet d'un extrait et spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge du produit de pyrolyse.*

IDENTIFICATION

A. L'élasticité est telle qu'une bande du matériau de 1 $mm^2$ à 5 $mm^2$ environ de section peut être étirée à la main à 2 fois au moins sa longueur initiale. Etirée pendant 1 min à 2 fois sa longueur, la bande revient en 30 s à moins de 1,2 fois sa longueur initiale.

B. Chauffez sur une flamme nue 1 g à 2 g de caoutchouc dans un tube à essai résistant à la chaleur pour dessécher l'échantillon, puis continuez le chauffage jusqu'à ce que des vapeurs de pyrolysat se condensent à proximité du bord supérieur du tube. Déposez quelques gouttes de pyrolysat sur une pastille de bromure de potassium, puis examinez par spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*), en comparant avec le spectre obtenu avec l'échantillon type.

C. Le taux des cendres totales (*2.4.16*) se situe dans un intervalle de ± 10 pour cent par rapport au résultat obtenu avec l'échantillon type.

ESSAI

*Les échantillons pour analyses peuvent être lavés et stérilisés avant usage.*

**Solution S**. Dans un récipient de verre approprié, introduisez un nombre de fermetures non coupées correspondant à une surface totale de 100 $cm^2$ environ et recouvrez d'*eau pour préparations injectables R*. Portez à ébullition pendant 5 min, puis rincez 5 fois à l'*eau pour préparations injectables R* froide. Dans une fiole de verre de type I (*3.2.1*) à large ouverture, introduisez les fermetures lavées, ajoutez 200 mL d'*eau pour préparations injectables R* et pesez. Recouvrez le col de la fiole d'un vase de verre borosilicaté et chauffez à l'autoclave de façon à atteindre la température de 121 ± 2 °C en 20 min à 30 min, puis maintenez à cette température pendant 30 min. Refroidissez à température ambiante en 30 min environ. Rétablissez la masse initiale avec de l'*eau pour préparations injectables R*. Agitez puis séparez immédiatement la solution de caoutchouc par décantation. Agitez la solution S avant chaque essai.

*Solution à blanc.* Préparez une solution à blanc dans les mêmes conditions avec 200 mL d'*eau pour préparations injectables R*.

**Aspect de la solution S**. Dans le cas de fermeture du type I, la solution S n'est pas plus fortement opalescente que la suspension témoin II (*2.2.1*) et dans le cas de fermeture du type II, la solution S n'est pas plus fortement opalescente que la suspension témoin III. La solution S n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin $JV_5$ (*2.2.2, Procédé II*).

**Acidité ou alcalinité**. A 20 mL de solution S, ajoutez 0,1 mL de *solution de bleu de bromothymol R1*. Le virage respectivement au bleu ou au jaune de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,3 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M* ou de 0,8 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M.*

**Absorbance**. *Effectuez l'essai dans les 5 h qui suivent la préparation de la solution S.* Filtrez la solution S sur une membrane filtrante de porosité voisine de 0,45 µm en rejetant les premiers millilitres. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de 220 nm à 360 nm en utilisant comme liquide de compensation la solution à blanc (voir solution S). En aucun point du spectre, l'absorbance ne dépasse 0,2 pour les fermetures du type I ou 4,0 pour les fermetures du type II. Si nécessaire, diluez le filtrat avant la mesure de l'absorbance et corrigez la lecture en fonction de la dilution.

**Substances réductrices**. *Effectuez l'essai dans les 4 h qui suivent la préparation de la solution S.* A 20,0 mL de solution S, ajoutez 1 mL d'*acide sulfurique dilué R* et 20,0 mL de *permanganate de potassium 0,002 M.* Chauffez à ébullition pendant 3 min. Refroidissez et ajoutez 1 g d'*iodure de potassium R.* Titrez immédiatement par le *thiosulfate de sodium 0,01 M* en présence de 0,25 mL de *solution d'amidon R.* Effectuez un essai en utilisant 20,0 mL de solution à blanc. La différence entre les volumes utilisés dans les 2 titrages n'est pas supérieure à 3,0 mL pour le caoutchouc du type I ou à 7,0 mL pour le caoutchouc du type II.

**Ammonium** (*2.4.1*) : au maximum 2 ppm.

Prélevez 5 mL de solution S et complétez à 14 mL avec de l'*eau R*. La solution satisfait à l'essai limite A.

**Zinc extractible** : au maximum 5 µg de Zn extractible par millilitre de solution S.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solutions à examiner.* Prélevez 10,0 mL de solution S et complétez à 100 mL avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M.*

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 10 ppm de zinc (Zn) R* diluée avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M.*

*Source* : lampe à cathode creuse au zinc.

*Longueur d'onde* : 213,9 nm.

*Flamme* : air-acétylène.

**Métaux lourds extractibles** (*2.4.8*) : au maximum 2 ppm.

La solution S satisfait à l'essai limite A. Préparez le témoin avec la *solution à 2 ppm de plomb (Pb) R*.

**Résidu à l'évaporation**. Evaporez à siccité au bain-marie 50,0 mL de solution S et desséchez à 100-105 °C. La masse du résidu n'est pas supérieure à 2,0 mg pour les caoutchoucs du type I ou à 4,0 mg pour les caoutchoucs du type II.

**Sulfures volatils**. Dans une fiole conique de 100 mL, introduisez une surface totale de 20 ± 2 $cm^2$ de fermeture, découpez si nécessaire, et ajoutez 50 mL d'une solution d'*acide citrique R* à 20 g/L. Posez un *papier à l'acétate de plomb R* sur l'ouverture de la fiole et maintenez-le en position à l'aide d'une capsule de pesée renversée. Chauffez à l'autoclave à 121 ± 2 °C pendant 30 min. S'il apparaît une tache noire sur le papier, elle n'est pas plus intense que celle obtenue avec un témoin préparé simultanément dans les mêmes conditions avec 0,154 mg de *sulfure de sodium R* et 50 mL d'une solution d'*acide citrique R* à 20 g/L.

*Pour les essais de perçage, de fragmentation et d'auto-obturation, traitez les fermetures comme décrit pour la préparation de la solution S, puis laissez sécher.*

**Essai de perçage**. Dans le cas de fermetures destinées à être percées par une aiguille hypodermique, effectuez l'essai suivant. Remplissez 10 flacons appropriés à leur volume nominal avec de l'*eau R* et fermez-les à l'aide des fermetures à examiner ; placez une capsule sur chaque flacon et sertissez-la. Percez chaque fermeture à l'aide d'une aiguille hypodermique neuve et lubrifiée, à long biseau(1) (angle de biseau 12 ± 2°) et d'un diamètre extérieur de 0,8 mm ; maintenez l'aiguille perpendiculaire à la surface pendant le perçage. La force nécessaire, déterminée à ± 0,25 N (25 gf) près, n'est pas supérieure à 10 N (1 kgf) pour chaque fermeture.

**Fragmentation**. Dans le cas de fermetures destinées à être percées par une aiguille hypodermique, effectuez l'essai suivant. Si les fermetures sont destinées à être utilisées pour des préparations aqueuses, placez dans 12 flacons propres un volume d'*eau R* correspondant au volume nominal moins 4 mL, fermez les flacons à l'aide des fermetures à examiner, placez une capsule sur chaque flacon, sertissez-la et laissez reposer pendant 16 h. Si les fermetures sont destinées à être utilisées pour des préparations sèches, fermez 12 flacons propres à l'aide des fermetures à examiner. A l'aide d'une seringue propre munie d'une aiguille hypodermique lubrifiée à long biseau(1) (angle de biseau 12 ± 2°) et d'un diamètre extérieur de 0,8 mm, injectez dans un flacon 1 mL d'*eau R* et retirez 1 mL d'air ; effectuez cette opération 4 fois pour chaque flacon, en un endroit à chaque fois différent. Utilisez une aiguille neuve pour chaque fermeture et vérifiez que l'aiguille n'a pas été émoussée pendant l'essai. Filtrez le liquide dans les flacons sur une membrane d'une porosité de 0,5 μm environ et comptez les fragments de caoutchouc visibles à l'oeil nu. Le nombre total des fragments n'est pas supérieur à 5. Pour l'application de cette limite, il est supposé que les fragments d'un diamètre égal ou supérieur à 50 μm sont visibles à l'oeil nu ; en cas de doute ou de litige, les fragments sont examinés au microscope pour vérifier leur nature et leurs dimensions.

**Auto-obturation**. Dans le cas de fermetures destinées à être utilisées pour des récipients multidoses, effectuez l'essai suivant. Remplissez 10 flacons appropriés à leur volume nominal avec de l'*eau R* et fermez-les à l'aide des fermetures à examiner. Placez une capsule sur chaque flacon et sertissez-la. Percez chaque fermeture à 10 endroits différents à l'aide d'une aiguille hypodermique neuve d'un diamètre extérieur de 0,8 mm. Immergez les flacons en position verticale dans une solution de *bleu de méthylène R* à 1 g/L et réduisez la pression extérieure de 27 kPa pendant 10 min. Rétablissez la pression atmosphérique et maintenez les flacons en immersion pendant 30 min. Rincez les flacons extérieurement. Aucun flacon ne contient de trace de solution colorée.

(1) Voir ISO 7864 « Aiguilles hypodermiques non réutilisables ».

# 4. RÉACTIFS

**01/2011:40000**

# 4. RÉACTIFS

*Des informations complémentaires sur des réactifs de disponibilité restreinte ou qui ne peuvent être complètement identifiés que par un nom de marque figurent dans la base de données KNOWLEDGE sur le site internet de la DEQM. Cette indication n'est donnée que pour faciliter l'obtention desdits réactifs et ne suppose en aucune façon que les fournisseurs mentionnés soient spécialement recommandés ou agréés par la Commission européenne de Pharmacopée ou le Conseil de l'Europe. Il est donc légitime d'utiliser des réactifs d'autre provenance, pourvu qu'ils satisfassent aux normes de la Pharmacopée.*

**01/2011:40100**

## 4.1. RÉACTIFS, SOLUTIONS ÉTALONS ET SOLUTIONS TAMPONS

La lettre R, utilisée après le nom d'une substance ou d'une solution en caractères italiques, désigne un réactif figurant dans la liste ci-après. Les normes de ces réactifs ne sont pas nécessairement applicables aux substances à usage médicinal.

La description de chaque réactif comporte un code de référence à 7 chiffres en italique (par exemple, *1002501*). Ce code, qui restera inchangé pour un réactif donné lors des révisions ultérieures de la liste des réactifs, est utilisé par le Secrétariat pour identifier chaque réactif et les utilisateurs de la Pharmacopée pourront éventuellement le trouver utile, par exemple dans la gestion des stocks des réactifs. La description peut également comporter le numéro CAS (Chemical Abstracts Service Registry Number) qui est reconnaissable d'après son format typique, par exemple 9002-93-1.

Un certain nombre de réactifs figurant dans la liste sont toxiques et doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.

Les réactifs en solution aqueuse sont préparés avec de l'*eau R*. Lorsqu'une solution d'un réactif est désignée par une expression telle que « acide chlorhydrique à 10 g/L de HCl », la solution doit être préparée par dilution appropriée dans l'*eau R* d'une solution plus concentrée du réactif, décrite dans ce chapitre. Les solutions de réactifs utilisées dans les essais limites du baryum, du calcium et des sulfates, doivent être préparées à partir d'*eau distillée R*. Lorsque le nom du solvant n'est pas mentionné, il s'agit d'une solution aqueuse.

Les réactifs et solutions de réactifs doivent être conservés en récipients bien fermés. L'étiquetage doit être conforme aux prescriptions générales internationales et nationales régissant la matière.

**01/2011:40101**

### 4.1.1. RÉACTIFS

**Acébutolol (chlorhydrate d').** *1148900.* [34381-68-5].

Voir *Chlorhydrate d'acébutolol (0871).*

**Acétal.** $C_6H_{14}O_2$. ($M_r$ 118,2). *1112300.* [105-57-7]. Acétaldéhyde diéthylacétal. 1,1-Diéthoxyéthane.

Liquide limpide, incolore et volatil, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,824.

$n_D^{20}$ : environ 1,382.

Eb : environ 103 °C.

**Acétaldéhyde.** $C_2H_4O$. ($M_r$ 44,1). *1000200.* [75-07-0]. Ethanal.

Liquide limpide, incolore et inflammable, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,788.

$n_D^{20}$ : environ 1,332.

Eb : environ 21 °C.

**Acétique (acide) anhydre.** $C_2H_4O_2$. ($M_r$ 60,1). *1000300.* [64-19-7].

*Teneur* : au minimum 99,6 pour cent *m/m* de $C_2H_4O_2$. Liquide incolore ou cristaux foliacés blancs ou sensiblement blancs et brillants, miscibles ou très solubles dans l'eau, dans l'éthanol à 96 pour cent, dans le glycérol à 85 pour cent et dans la plupart des huiles grasses et essentielles.

$d_{20}^{20}$ : 1,052 à 1,053.

Eb : 117 °C à 119 °C.

Une solution à 100 g/L est fortement acide (*2.2.4*).

Une solution à 5 g/L neutralisée par l'*ammoniaque diluée R2* donne la réaction (b) des acétates (*2.3.1*).

*Point de solidification* (*2.2.18*) : au minimum 15,8 °C.

*Eau* (*2.5.12*) : au maximum 0,4 pour cent. Si l'échantillon contient davantage d'eau, rectifiez par addition de la quantité calculée d'*anhydride acétique R*.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Acétique (acide) deutérié.** $C_2{}^2H_4O_2$. ($M_r$ 64,1). *1101100.* [1186-52-3]. Acide tétradeutéroacétique. Acide-*d* acétique-$d_3$.

*Degré de deutériation* : au minimum 99,7 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,12.

$n_D^{20}$ : environ 1,368.

Eb : environ 115 °C.

F : environ 16 °C.

**Acétique (acide) glacial.** *1000400.* [64-19-7].

Voir *Acide acétique glacial (0590).*

**Acétique (acide).** *1000401.*

*Teneur* : 290 g/L à 310 g/L ($M_r$ 60,1).

Prélevez 30 g d'*acide acétique glacial R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

**Acétique (acide) dilué.** *1000402.*

*Teneur* : 115 g/L à 125 g/L ($M_r$ 60,1).

Prélevez 12 g d'*acide acétique glacial R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

**Acétique (anhydride).** $C_4H_6O_3$. ($M_r$ 102,1). *1000500.* [108-24-7].

*Teneur* : au minimum 97,0 pour cent *m/m*.

Liquide incolore, limpide.

Eb : 136 °C à 142 °C.

*Dosage.* Dans une fiole à bouchon rodé, dissolvez 2,00 g d'anhydride acétique dans 50,0 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* et chauffez à reflux pendant 1 h. Titrez par l'*acide chlorhydrique 1 M* en présence de 0,5 mL de *solution de phénolphtaléine R*. Calculez le nombre de millilitres d'*hydroxyde de sodium 1 M* utilisés pour 1 g ($n_1$).

Dans une fiole à bouchon rodé, dissolvez 2,00 g d'anhydride acétique dans 20 mL de *cyclohexane R*, laissez refroidir dans l'eau glacée et ajoutez un mélange refroidi de 10 mL d'*aniline R* et de 20 mL de *cyclohexane R*. Chauffez à reflux pendant 1 h, ajoutez 50,0 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* et agitez énergiquement. Titrez par l'*acide chlorhydrique 1 M*, en présence de 0,5 mL de *solution de phénolphtaléine R*. Calculez le nombre de millilitres d'*hydroxyde de sodium 1 M* utilisés pour 1 g ($n_2$).

Calculez la teneur pour cent en $C_4H_6O_3$ à l'aide de l'expression suivante :

$$10,2\,(n_1 - n_2)$$

4. Réactifs

**Solution d'anhydride acétique R1.** *1000501.*

Dissolvez 25,0 mL d'*anhydride acétique R* dans de la *pyridine anhydre R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Conservation* : à l'abri de la lumière et de l'air.

**Solution d'anhydride acétique-acide sulfurique.** *1000502.*

Mélangez prudemment 5 mL d'*anhydride acétique R* avec 5 mL d'*acide sulfurique R*. Ajoutez goutte à goutte et en refroidissant à 50 mL d'*éthanol R*. Préparez extemporanément.

**Acétone.** *1000600.* [67-64-1].

Voir *Acétone (0872).*

**Acétone deutériée.** $C_3{}^2H_6O$. ($M_r$ 64,1). *1024900.* [666-52-4]. Acétone-$d_6$. ($^2H_6$)Acétone.

*Degré de deutériation* : au minimum 99,5 pour cent.

Liquide limpide, incolore, miscible à l'eau, au diméthylformamide, à l'éthanol anhydre et au méthanol.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,87.

$n_D^{20}$ : environ 1,357.

Eb : environ 55 °C.

*Eau et oxyde de deutérium* : au maximum 0,1 pour cent.

**Acétonitrile.** $C_2H_3N$. ($M_r$ 41,05). *1000700.* [75-05-8]. Cyanure de méthyle. Ethanenitrile.

Liquide limpide, incolore, miscible à l'eau, à l'acétone et au méthanol.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,78.

$n_D^{20}$ : environ 1,344.

Une solution d'acétonitrile à 100 g/L est neutre au papier tournesol.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : au minimum 95 pour cent distillent de 80 °C à 82 °C.

*L'acétonitrile utilisé en spectrophotométrie satisfait également à l'essai suivant.*

*Transmittance minimale* (*2.2.25*) déterminée en utilisant l'*eau R* comme liquide de compensation : 98 pour cent de 255 nm à 420 nm.

**Acétonitrile pour chromatographie.** *1000701.*

Voir *Acétonitrile R.*

*L'acétonitrile utilisé en chromatographie satisfait également aux essais suivants.*

*Transmittance minimale* (*2.2.25*) déterminée en utilisant l'*eau R* comme liquide de compensation : 98 pour cent à partir de 240 nm.

*Pureté minimale (2.2.28)* : 99,8 pour cent.

**Acétonitrile R1.** *1000702.*

Satisfait aux spécifications de l'*acétonitrile R* et aux spécifications supplémentaires suivantes.

*Teneur* : au minimum 99,9 pour cent.

*Absorbance (2.2.25)* : au maximum 0,10, déterminé à 200 nm avec l'*eau R* comme liquide de compensation.

**Acétonitrile deutérié.** $C_2{}^2H_3N$. ($M_r$ 44,1). *1173100.* [2206-26-0].

*Degré de deutériation* : au minimum 99,8 pour cent.

Liquide limpide, incolore, miscible à l'eau, à l'acétone et au méthanol.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,78.

$n_D^{20}$ : environ 1,344.

**Acétoxyvalérénique (acide).** $C_{17}H_{24}O_4$. ($M_r$ 292,4). *1165800.* [81397-67-3]. Acide (2*E*)-3-[(1*RS*,4*S*,7*R*,7a*R*)-1-(acétyloxy)-3,7-diméthyl-2,4,5,6,7,7a-hexahydro-1*H*-indén-4-yl]-2-méthylprop-2-énoïque.

Huile visqueuse incolore ou jaune pâle.

*Absorbance* (*2.2.25*). Une solution dans du *méthanol R* présente un maximum d'absorption à environ 216 nm.

**Acétylacétamide.** $C_4H_7NO_2$. ($M_r$ 101,1). *1102600.* [5977-14-0]. 3-Oxobutanamide.

F : 53 °C à 56 °C.

**Acétylacétone.** $C_5H_8O_2$. ($M_r$ 100,1). *1000900.* [123-54-6]. Pentane-2,4-dione.

Liquide incolore ou jaunâtre, facilement inflammable, facilement soluble dans l'eau, miscible à l'acétone, à l'éthanol à 96 pour cent et à l'acide acétique glacial.

$n_D^{20}$ : 1,452 à 1,453.

Eb : 138 °C à 140 °C.

**Réactif à l'acétylacétone R1.** *1000901.*

A 100 mL de *solution d'acétate d'ammonium R*, ajoutez 0,2 mL d'*acétylacétone R.*

***N*-Acétyl-ε-caprolactame.** $C_8H_{13}NO_2$. ($M_r$ 155,2). *1102700.* [1888-91-1]. *N*-Acétylhexane-6-lactame.

Liquide incolore, miscible avec l'éthanol anhydre.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,100.

$n_D^{20}$ : environ 1,489.

Eb : environ 135 °C.

**Acétyl-11-céto-β-boswellique (acide).** $C_{32}H_{48}O_5$. ($M_r$ 512,7). *1167700.* [67416-61-9]. Acide 3α-(acétyloxy)-11-oxours-12-én-24-oïque. Acide (4β)-3α-(acétyloxy)-11-oxours-12-én-23-oïque.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, insoluble dans l'eau, soluble dans l'acétone, dans l'éthanol anhydre et dans le méthanol.

F : 271 °C à 274 °C.

*L'acide acétyl-11-céto-β-boswellique utilisé en chromatographie liquide satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications données dans la monographie *Encens indien (2310).*

*Teneur* : au minimum 90 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Acétylcholine (chlorure d').** $C_7H_{16}ClNO_2$. ($M_r$ 181,7). *1001000.* [60-31-1].

Poudre cristalline, très soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent, se décomposant en présence d'eau chaude ou d'alcalins.

*Conservation* : à une température de – 20 °C.

**Acétyle (chlorure d').** $C_2H_3ClO$. ($M_r$ 78,5). *1000800.* [75-36-5].

Liquide limpide, incolore, inflammable, se décomposant en présence d'eau et d'éthanol à 96 pour cent, miscible au chlorure d'éthylène.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,10.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : au minimum 95 pour cent distillent de 49 °C à 53 °C.

**Acétyleugénol.** $C_{12}H_{14}O_3$. ($M_r$ 206,2). *1100700.* [93-28-7]. 2-Méthoxy-4-(2-propényl)phénylacétate.

Liquide huileux, jaune, facilement soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, pratiquement insoluble dans l'eau.

$n_D^{20}$ : environ 1,521.

F : 281 °C à 282 °C.

*L'acétyleugénol utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de clou de girofle (1091).*

*Solution à examiner.* L'acétyleugénol à examiner.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

***N*-Acétylglucosamine.** $C_8H_{15}NO_6$. ($M_r$ 221,2). *1133600.* [7512-17-6]. 2-(Acétylamino)-2-désoxy-D-glucopyranose.

F : environ 202 °C.

***N*-Acétylneuraminique (acide).** $C_{11}H_{19}NO_9$. ($M_r$ 309,3). *1001100.* [131-48-6]. Acide *O*-sialique.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs aciculaires, solubles dans l'eau et dans le méthanol, peu solubles dans l'éthanol anhydre, pratiquement insolubles dans l'acétone.

$[\alpha]_D^{20}$ : environ – 36, déterminé avec une solution à 10 g/L.

F : environ 186 °C, avec décomposition.

***N*-Acétyltryptophane.** $C_{13}H_{14}N_2O_3$. ($M_r$ 246,3). *1102800.* [1218-34-4]. Acide 2-acétylamino-3-(indol-3-yl)propanoïque.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, ou cristaux incolores, peu solubles dans l'eau. Le *N*-acétyltryptophane se dissout dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins.

F : environ 205 °C.

*Dosage*. Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications données dans la monographie *Tryptophane (1272).*

*Solution à examiner*. Dissolvez 10,0 mg de *N*-acétyltryptophane dans un mélange de 10 volumes d'*acétonitrile R* et de 90 volumes d'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec le même mélange de solvants.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Acétyltyrosine (ester éthylique d').** $C_{13}H_{17}NO_4,H_2O$. ($M_r$ 269,3). *1001200.* [36546-50-6]. Ester éthylique de *N*-acétyl-L-tyrosine monohydraté. (*S*)-2-Acétamido-3-(4-hydroxyphényl)propionate d'éthyle monohydraté.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, convenant au dosage de la chymotrypsine.

$[\alpha]_D^{20}$ : + 21 à + 25, déterminé avec une solution à 10 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R.*

$A_{1\,cm}^{1\%}$ : 60 à 68, déterminé à 278 nm dans l'*éthanol à 96 pour cent R.*

**Solution d'ester éthylique d'acétyltyrosine 0,2 M.** *1001201.* Dissolvez 0,54 g d'*ester éthylique d'acétyltyrosine R* dans de l'*éthanol à 96 pour cent R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

**Acrylamide.** $C_3H_5NO$. ($M_r$ 71,1). *1001500.* [79-06-1]. Propénamide.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, ou écailles incolores ou blanches, très solubles dans l'eau et dans le méthanol, facilement solubles dans l'éthanol anhydre.

F : environ 84 °C.

**Solution d'acrylamide/bisacrylamide (29:1) à 30 pour cent.** *1001501.*

Préparez une solution contenant 290 g d'*acrylamide R* et 10 g de *méthylène bisacrylamide R* pour 1 L d'*eau R*. Filtrez.

**Solution d'acrylamide/bisacrylamide (36,5:1) à 30 pour cent.** *1001502.*

Préparez une solution contenant 292 g d'*acrylamide R* et 8 g de *méthylène bisacrylamide R* pour 1 L d'*eau R*. Filtrez.

**Acrylique (acide).** $C_3H_4O_2$. ($M_r$ 72,1). *1133700.* [79-10-7]. Acide prop-2-énoïque. Acide vinylformique.

*Teneur* : au minimum 99 pour cent. L'acide acrylique est stabilisé avec 0,02 pour cent de monométhyléther d'hydroquinone.

Liquide corrosif, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent. L'acide acrylique se polymérise rapidement en présence d'oxygène.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,05.

$n_D^{20}$ : environ 1,421.

Eb : environ 141 °C.

F : 12 °C à 15 °C.

**Actéoside.** $C_{29}H_{36}O_{15}$. ($M_r$ 624,6). *1145100.* [61276-17-3]. 3-*O*-(6-Désoxy-α-L-mannopyranosyl)-4-*O*[(2*E*)-3-(3,4-dihydroxyphényl)prop-2-énoyl]β–D-glucopyranoside de 2-(3,4-dihydroxyphényl)éthyle.

Poudre légèrement jaunâtre, facilement soluble dans l'eau et dans le méthanol.

F : environ 140 °C, avec décomposition.

**Adénine.** *1172800.* [73-24-5].

Voir *Adénine (0800).*

**Adénosine.** $C_{10}H_{13}N_5O_4$. ($M_r$ 267,2). *1001600.* [58-61-7]. 6-Amino-9-β-D-ribofuranosyl-9*H*-purine.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, peu soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 pour cent. L'adénosine se dissout dans les solutions diluées d'acides.

F : environ 234 °C.

**Adipique (acide).** $C_6H_{10}O_4$. ($M_r$ 146,1). *1095600.* [124-04-9].

Prismes, facilement solubles dans le méthanol, solubles dans l'acétone, pratiquement insolubles dans l'éther de pétrole.

F : environ 152 °C.

**Adrénaline.** $C_9H_{13}NO_3$. ($M_r$ 183,2). *1155000.* [51-43-4]. (1*R*)-1-(3,4-Dihydroxyphényl)-2-(méthylamino)éthanol. 4-[(1*R*)-1-hydroxy-2(méthylamino)éthyl]benzène-1,2-diol.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, virant progressivement au brun lorsqu'elle est exposée à la lumière et à l'air, très peu soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent, pratiquement insoluble dans l'acétone. L'adrénaline se dissout dans les solutions diluées d'acides minéraux et d'hydroxydes alcalins.

F : environ 215 °C.

**Adrénalone (chlorhydrate d').** $C_9H_{12}ClNO_3$. ($M_r$ 217,7). *1155100.* [62-13-5]. Chlorhydrate de 1-(3,4-dihydroxyphényl)-2-(méthylamino)éthanone. Chlorhydrate de 3′,4′-dihydroxy-2-(méthylamino)acétophénone.

Cristaux jaune pâle, facilement solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 244 °C.

**Aescine.** *1001700.* [6805-41-0].

Mélange de saponosides apparentés, obtenu à partir des graines d'*Aesculus hippocastanum* L.

Poudre amorphe, fine, pratiquement blanche ou légèrement jaunâtre ou rougeâtre.

*Chromatographie*. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Racine de polygala (0202)* : déposez 20 µL de la solution ; après pulvérisation de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffage, le chromatogramme présente une bande principale dont le $R_F$ est environ 0,4.

**Aflatoxine $B_1$.** $C_{17}H_{12}O_6$. ($M_r$ 312,3). *1166000.* [1162-65-8]. (6a*R*,9a*S*)-4-Méthoxy-2,3,6a,9a-tétrahydrocyclopenta[*c*]furo[3′,2′:4,5]furo[2,3-*h*][1]benzopyrane-1,11-dione.

Cristaux blancs ou légèrement jaunes.

**Agarose pour chromatographie.** *1001800.* [9012-36-6].

Constitué par des billes gonflées d'un diamètre de 60-140 µm et présenté sous forme de suspension à 4 pour cent dans l'*eau R*.

Utilisé pour le fractionnement par chromatographie d'exclusion des protéines de masses moléculaires relatives de $6 \times 10^4$ à $20 \times 10^6$ et des polyosides de masses moléculaires relatives de $3 \times 10^3$ à $5 \times 10^6$.

**Agarose pour électrophorèse.** *1002000.* [9012-36-6].

Polysaccharide neutre, linéaire, dont le composant principal provient de l'agar-agar.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau froide, très peu soluble dans l'eau chaude.

**Agarose réticulé pour chromatographie.** *1001900.* [61970-08-9].

Préparé à partir d'agarose par réaction avec du 2,3-dibromopropanol dans des conditions fortement alcalines.

Constitué par des billes gonflées d'un diamètre de 60-140 µm et est présenté sous forme de suspension à 4 pour cent dans l'*eau R*.

Utilisé pour le fractionnement par chromatographie d'exclusion des protéines de masses moléculaires relatives de $6 \times 10^4$ à $20 \times 10^6$ et des polyosides de masses moléculaires relatives de $3 \times 10^3$ à $5 \times 10^6$.

**Agarose réticulé pour chromatographie R1.** *1001901.* [65099-79-8].

Préparé à partir d'agarose par réaction avec du 2,3-dibromopropanol dans des conditions fortement alcalines.

Constitué par des billes gonflées d'un diamètre de 60-140 µm et est présenté sous forme de suspension à 4 pour cent dans l'*eau R*.

Utilisé pour le fractionnement par chromatographie d'exclusion des protéines de masses moléculaires relatives de $7 \times 10^4$ à $40 \times 10^6$ et des polyosides de masses moléculaires relatives de $1 \times 10^5$ à $2 \times 10^7$.

**Agarose-DEAE pour chromatographie à échange d'ions.** *1002100.* [57407-08-6].

Agarose réticulé portant des groupements diéthylaminoéthyle et présenté sous forme de billes.

**Agarose-polyacrylamide réticulé.** *1002200.*

Agarose retenu dans un réseau de polyacrylamide réticulé adapté à la séparation de protéines globulaires de masse moléculaire relative de $2 \times 10^4$ à $35 \times 10^4$.

**Agnuside.** $C_{22}H_{26}O_{11}$. ($M_r$ 466,4). *1162000.* [11027-63-7]. β-D-Glucopyranoside de (1*RS*,4a*SR*,5*RS*, 7a*RS*)-5-hydroxy-7-[[(4-hydroxybenzoyl)oxy]méthyl]-1,4a,5,7a-tétrahydrocyclopenta[*c*]pyran-1-yle.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs.

**Alanine.** *1102900.* [56-41-7].

Voir *Alanine (0752).*

**β-Alanine.** *1004500.* [107-95-9].

Voir *3-Aminopropionique (acide) R.*

**Albumine bovine.** *1002300.* [9048-46-8].

Sérum-albumine bovine contenant environ 96 pour cent de protéines.

Poudre blanche ou jaune-brun pâle.

*Eau* (*2.5.12*) : au maximum 3,0 pour cent, déterminé sur 0,800 g.

L'albumine bovine utilisée dans le titrage biologique du tétracosactide est exempte de pyrogènes, d'activité protéolytique (démontrée par une méthode appropriée, par exemple celle utilisant le substrat chromogénique) et d'activité corticostéroïdique (démontrée par la mesure de fluorescence décrite sous titrage dans la monographie *Tétracosactide (0644)*).

**Albumine humaine.** *1133800.*

Sérum albumine humaine contenant au minimum 96 pour cent d'albumine.

**Albumine humaine (solution d').** *1002400.* [9048-46-8].

Voir *Solution d'albumine humaine (0255).*

**Solution d'albumine humaine R1.** *1002401.*

Diluez de la *solution d'albumine humaine R* dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L jusqu'à une concentration de 1 g/L de protéines. Ajustez à pH 3,5-4,5 avec de l'*acide acétique glacial R*.

**Alcool.** *1002500.* [64-17-5].

Voir *Ethanol à 96 pour cent R.*

**Alcool à *x* pour cent *V/V*.** *1002502.*

Voir *Ethanol à x pour cent V/V R.*

**Alcool exempt d'aldéhyde.** *1002501.*

Mélangez 1 200 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* avec 5 mL d'une solution de *nitrate d'argent R* à 400 g/L. Ajoutez 10 mL d'une solution refroidie d'*hydroxyde de potassium R* à 500 g/L. Agitez, laissez reposer pendant quelques jours. Filtrez et distillez le filtrat au moment de l'emploi.

**Alcool amylique tertiaire.** *1062700.* [75-85-4].

Voir *tert-Pentylique (alcool) R.*

**Alcool butylique tertiaire.** *1056500.* [75-65-0].

Voir *2-Méthyl-2-propanol R.*

**Aldéhyde déshydrogénase.** *1103000.*

Enzyme obtenue à partir de la levure de boulanger, oxydant l'acétaldéhyde en acide acétique, en présence de nicotinamide-adénine dinucléotide, de sels de potassium et de thiols, à pH 8,0.

**Solution d'aldéhyde déshydrogénase.** *1103001.*

Dissolvez une quantité d'*aldéhyde déshydrogénase R* équivalente à 70 unités dans de l'*eau R* et complétez à 10 mL avec de l'*eau R*. Cette solution est stable pendant 8 h à 4 °C.

**Aldrine.** $C_{12}H_8Cl_6$. ($M_r$ 364,9). *1123100.* [309-00-2].

Eb : environ 145 °C.

F : environ 104 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Aleuritique (acide).** $C_{16}H_{32}O_5$. ($M_r$ 304,4). *1095700.* [533-87-9]. Acide (9*RS*,10*SR*)-9,10,16−trihydroxyhexadécanoïque.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, onctueuse au toucher, soluble dans le méthanol.

F : environ 101 °C.

**Alizarine S.** $C_{14}H_7NaO_7S,H_2O$. ($M_r$ 360,3). *1002600.* [130-22-3].

Schultz No. 1145.

Colour Index No. 58005.

1,2-Dihydroxyanthraquinone-3-sulfonate de sodium monohydraté. 3,4-Dihydroxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracène-2-sulfonate de sodium monohydraté.

Poudre jaune orangé, facilement soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution d'alizarine S.** *1002601.*

Solution à 1 g/L.

*Essai de sensibilité.* Si la solution d'alizarine S est utilisée pour la détermination du titre du *perchlorate de baryum 0,05 M*, ce réactif vire du jaune au rouge orangé lorsqu'il est examiné dans les conditions prescrites pour la détermination du titre du *perchlorate de baryum 0,05 M* (*4.2.2*).

*Zone de virage* : pH 3,7 (jaune) à pH 5,2 (violet).

**Alliage nickel-aluminium.** *1058100.*

*Teneur* : 48 pour cent à 52 pour cent d'aluminium (Al ; $A_r$ 26,98) et 48 pour cent à 52 pour cent de nickel (Ni ; $A_r$ 58,70).

Avant l'emploi, réduisez en poudre fine (180) (*2.9.12*).

Pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans les acides minéraux.

**Alliage nickel-aluminium (exempt d'halogènes).** *1118100.*

*Teneur* : 48 pour cent à 52 pour cent d'aluminium (Al ; $A_r$ 26,98) et 48 pour cent à 52 pour cent de nickel (Ni ; $A_r$ 58,71).

Poudre fine, grise, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans les acides minéraux avec formation de sel.

*Chlorures* : au maximum 10 ppm.

Dissolvez 0,400 g de substance à examiner dans 40 mL d'un mélange de 67 volumes d'*acide sulfurique R* et de 33 volumes d'*acide nitrique dilué R*, évaporez la solution à siccité quasi totale puis dissolvez le résidu dans de l'*eau R* et complétez à 20,0 mL avec le même solvant. A une demi-aliquote de cette solution, ajoutez 1,0 mL de *nitrate d'argent 0,1 M*. Filtrez après 15 min et ajoutez au filtrat 0,2 mL de solution de chlorure de sodium (contenant 10 µg de chlorures par millilitre). Après 5 min, la solution est plus opalescente qu'un mélange composé de l'autre demi-aliquote de solution et de 1,0 mL de *nitrate d'argent 0,1 M*.

**Aloïne.** *1008800.* [1415-73-2].

Voir *Barbaloïne R*.

**Aluminium.** Al. ($A_r$ 26,98). *1118200.* [7429-90-5].

Métal blanc ou sensiblement blanc, malléable, flexible, à teinte bleuâtre, sous forme de barres, de feuilles, de poudre, de lames ou de fils. A l'air humide il se forme un film d'oxyde qui protège le métal de la corrosion.

Qualité pour analyse.

**Aluminium (chlorure d').** $AlCl_3,6H_2O$. ($M_r$ 241,4). *1002700.* [7784-13-6]. Chlorure d'aluminium hexahydraté.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent de $AlCl_3,6H_2O$.

Poudre cristalline blanche ou faiblement jaunâtre, hygroscopique, facilement soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Réactif au chlorure d'aluminium.** *1002702.*

Dissolvez 2,0 g de *chlorure d'aluminium R* dans 100 mL d'une solution d'*acide acétique glacial R* à 5 pour cent *V/V* dans du *méthanol R*.

**Solution de chlorure d'aluminium.** *1002701.*

Dissolvez 65,0 g de *chlorure d'aluminium R* dans de l'*eau R* et complétez à 100 mL avec le même solvant. Ajoutez 0,5 g de *charbon activé R*, agitez pendant 10 min, filtrez et au filtrat ajoutez, en agitant continuellement, une quantité suffisante d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 10 g/L (environ 60 mL) pour ajuster le pH de la solution à 1,5.

**Aluminium (nitrate d').** $Al(NO_3)_3,9H_2O$. ($M_r$ 375,1). *1002800.* [7784-27-2]. Nitrate d'aluminium nonahydraté.

Cristaux déliquescents, très solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent, très peu solubles dans l'acétone.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Aluminium (oxyde d') anhydre.** *1002900.* [1344-28-1].

Hydroxyde d'aluminium, déshydraté et activé par chauffage, composé de $\gamma$-$Al_2O_3$.

Taille des particules : 75 µm à 150 µm.

**Aluminium (oxyde d') basique.** *1118300.*

*Oxyde d'aluminium anhydre R* de type basique, approprié à la chromatographie sur colonne.

*pH* (*2.2.3*). Agitez 1 g d'oxyde d'aluminium basique avec 10 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R* pendant 5 min. Le pH de la suspension est de 9 à 10.

**Aluminium (oxyde d') neutre.** *1118400.*

Voir *Oxyde d'aluminium hydraté (0311)*.

**Aluminium et de potassium (sulfate d').** *1003000.* [7784-24-9].

Voir *Alun (0006)*.

**Amidon soluble.** *1085100.* [9005-84-9].

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

Préparez une solution à 20 g/L dans l'*eau R* chaude. La solution est tout au plus légèrement opalescente et reste fluide après refroidissement.

**Papier amidonné à l'iodate de potassium.** *1085101.*

Plongez des bandelettes de papier filtre dans 100 mL de *solution d'amidon exempte d'iodure R* contenant 0,1 g d'*iodate de potassium R*. Laissez égoutter et sécher à l'abri de la lumière.

**Papier amidonné ioduré.** *1085106.*

Plongez des bandelettes de papier filtre dans 100 mL de *solution d'amidon R* contenant 0,5 g d'*iodure de potassium R*. Laissez égoutter et sécher à l'abri de la lumière.

*Essai de sensibilité.* Mélangez 0,05 mL de *nitrite de sodium 0,1 M* et 4 mL d'*acide chlorhydrique R*, et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*. Déposez 1 goutte de solution sur du papier amidonné ioduré ; il apparaît une tache bleue.

**Solution d'amidon.** *1085103.*

Triturez 1,0 g d'*amidon soluble R* avec 5 mL d'*eau R* et versez, en agitant continuellement, dans 100 mL d'*eau R* bouillante à laquelle ont été ajoutés 10 mg d'*iodure mercurique R*.

Effectuez l'essai de sensibilité avant chaque emploi du réactif.

*Essai de sensibilité.* A un mélange de 1 mL de solution d'amidon et de 20 mL d'*eau R*, ajoutez environ 50 mg d'*iodure de potassium R* et 0,05 mL de *solution d'iode R1*. La solution est bleue.

**Solution d'amidon exempte d'iodure.** *1085104.*

Préparez cette solution comme indiqué pour la *solution d'amidon R*, sans ajouter d'*iodure mercurique R*. Préparez extemporanément.

**Solution d'amidon R1.** *1085105.*

Mélangez 1 g d'*amidon soluble R* et une faible quantité d'*eau R* froide. Tout en agitant constamment, ajoutez ce mélange à 200 mL d'*eau R* bouillante. Ajoutez 0,25 g d'*acide salicylique R* et portez à ébullition pendant 3 min. Retirez immédiatement de la source de chaleur et refroidissez.

*Conservation* : en cas de conservation prolongée, la solution doit être conservée à une température de 4 °C à 10 °C. Il convient de préparer une solution d'amidon fraîche lorsque le point de fin de titrage, de bleu à incolore, n'est pas précis. En cas de conservation au réfrigérateur, la solution d'amidon est stable pendant environ 2 à 3 semaines.

*Essai de sensibilité.* Un mélange de 2 mL de *solution d'amidon R1*, de 20 mL d'*eau R*, d'environ 50 mg d'*iodure de potassium R* et de 0,05 mL de *solution d'iode R1* présente une coloration bleue.

**Solution d'amidon R2.** *1085107.*

Triturez 1,0 g d'*amidon soluble R* avec 5 mL d'*eau R* et versez, en agitant continuellement, dans 100 mL d'*eau R* bouillante. Utilisez une solution récemment préparée.

*Essai de sensibilité.* A un mélange de 1 mL de la solution d'amidon et de 20 mL d'*eau R*, ajoutez environ 50 mg d'*iodure de potassium R* et 0,05 mL de *solution d'iode R1*. La solution est bleue.

**Aminoacétique (acide).** *1040700.* [56-40-6].

Voir *Glycine R*.

**Aminoazobenzène.** $C_{12}H_{11}N_3$. ($M_r$ 197,2). *1003200.* [60-09-3].

Colour Index No. 11000.
4-(Phénylazo)aniline.

Aiguilles jaune-brun à reflet bleuâtre, peu solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 128 °C.

**2-Aminobenzoïque (acide).** $C_7H_7NO_2$. ($M_r$ 137,1). *1003400.* [118-92-3]. Acide anthranilique.

Poudre cristalline blanche ou jaune clair, assez soluble dans l'eau froide, facilement soluble dans l'eau chaude, dans l'éthanol à 96 pour cent et dans le glycérol. Les solutions dans l'éthanol à 96 pour cent ou dans l'éther et, plus particulièrement, dans le glycérol, présentent une fluorescence violette.

F : environ 145 °C.

**3-Aminobenzoïque (acide).** $C_7H_7NO_2$. ($M_r$ 137,1). *1147400.* [99-05-8].

Cristaux blancs ou sensiblement blancs. Une solution aqueuse devient marron au contact de l'air.

F : environ 174 °C.

*Conservation* : en récipient étanche et à l'abri de la lumière.

**4-Aminobenzoïque (acide).** $C_7H_7NO_2$. ($M_r$ 137,1). *1003300.* [150-13-0].

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, pratiquement insoluble dans l'éther de pétrole.

F : environ 187 °C.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Chlorhydrate de procaïne (0050)* ; le chromatogramme présente une seule tache principale.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Solution d'acide 4-aminobenzoïque.** *1003301.*

Dissolvez 1 g d'*acide 4-aminobenzoïque R* dans un mélange de 18 mL d'*acide acétique anhydre R*, de 20 mL d'*eau R* et de 1 mL d'*acide phosphorique R*. Immédiatement avant l'emploi, mélangez 2 volumes de la solution avec 3 volumes d'*acétone R*.

***N*-(4-Aminobenzoyl)-L-glutamique (acide).** $C_{12}H_{14}N_2O_5$. ($M_r$ 266,3). *1141700.* [4271-30-1]. ABGA. Acide (2*S*)-2-[(4-aminobenzoyl)amino]pentanedioïque.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche.

F : environ 175 °C, avec décomposition.

**4-Aminobutanoïque (acide).** $C_4H_9NO_2$. ($M_r$ 103,1). *1123200.* [56-12-2]. Acide γ-aminobutyrique. GABA.

Cristaux en forme de feuillets obtenus par cristallisation à partir de méthanol et d'éther, ou en forme d'aiguilles obtenues par cristallisation à partir d'eau et d'éthanol à 96 pour cent. Facilement solubles dans l'eau, pratiquement insolubles ou peu solubles dans d'autres solvants.

F : environ 202 °C (décroît en cas de chauffage rapide).

**Aminobutanol.** $C_4H_{11}NO$. ($M_r$ 89,1). *1003500.* [5856-63-3]. 2-Aminobutanol.

Liquide huileux, miscible à l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,94.

$n_D^{20}$ : environ 1,453.

Eb : environ 180 °C.

**Aminochlorobenzophénone.** $C_{13}H_{10}ClNO$. ($M_r$ 231,7). *1003600.* [719-59-5]. 2-Amino-5-chlorobenzophénone.

Poudre cristalline jaune, pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'acétone, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 97 °C.

*Teneur* : au minimum 95.0 pour cent.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Aminoéthanol (diphénylborate d').** *1032400.* [524-95-8]. Voir *Diphénylborate d'aminoéthanol R*.

**4-Aminofolique (acide).** $C_{19}H_{20}N_8O_5$. ($M_r$ 440,4). *1163700.* [54-62-6]. Acide (2*S*)-2-[[4-[[(2,4-diaminoptéridin-6-yl)méthyl]amino]benzoyl]amino]pentanedioïque. Acide *N*-[4-[[(2,4-diaminoptéridin-6-yl)méthyl]amino]benzoyl]-L-glutamique. Aminoptérine.

Poudre jaunâtre.

F : environ 230 °C.

**6-Aminohexanoïque (acide).** $C_6H_{13}NO_2$. ($M_r$ 131,2). *1103100.* [60-32-2].

Cristaux incolores, facilement solubles dans l'eau, assez solubles dans le méthanol, pratiquement insolubles dans l'éthanol anhydre.

F : environ 205 °C.

**Aminohippurique (acide).** $C_9H_{10}N_2O_3$. ($M_r$ 194,2). *1003700.* [61-78-9]. Acide (4-aminobenzamido)acétique.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, assez soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 200 °C.

**Réactif à l'acide aminohippurique.** *1003701.*

Dissolvez 3 g d'*acide phtalique R* et 0,3 g d'*acide aminohippurique R* dans de l'*éthanol à 96 pour cent R*, puis complétez à 100 mL avec le même solvant.

**Aminohydroxynaphtalènesulfonique (acide).** $C_{10}H_9NO_4S$. ($M_r$ 239,3). *1112400.* [116-63-2]. Acide 4-amino-3-hydroxynaphtalène-1-sulfonique.

Aiguilles blanches ou grises, virant au rose par exposition à la lumière, en particulier à l'état humide, pratiquement insolubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent, solubles dans les solutions d'hydroxydes alcalins et les solutions chaudes de métabisulfite de sodium.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Solution d'acide aminohydroxynaphtalènesulfonique.** *1112401.*

Mélangez 5,0 g de *sulfite de sodium anhydre R* avec 94,3 g de *bisulfite de sodium R* et 0,7 g d'*acide aminohydroxynaphtalènesulfonique R*. Dissolvez 1,5 g du mélange dans de l'*eau R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant. Préparez la solution chaque jour.

***cis*-Aminoindanol.** $C_9H_{11}NO$. ($M_r$ 149,2). *1168300.* [126456-43-7]. (1*S*,2*R*)-1-Amino-2,3-dihydro-1*H*-indén-2-ol. (–)-*cis*-1-Aminoindan-2-ol.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent (somme des énantiomères, déterminée par chromatographie en phase gazeuse).

$[\alpha]_D^{20}$ : – 69 à – 59, déterminé avec une solution à 2 g/L dans le *chloroforme R*.

F : 118 °C à 122 °C.

**Aminométhylalizarinediacétique (acide).** $C_{19}H_{15}NO_8,2H_2O$. ($M_r$ 421,4). *1003900.* [3952-78-1]. Acide 2,2′-[(3,4-dihydroxyanthraquinon-3-yl)méthylènenitrilo]diacétique dihydraté. Alizarine-complexone dihydratée.

Poudre fine, brun-jaune pâle ou brun orangé, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans les solutions d'hydroxydes alcalins.

F : environ 185 °C.

*Perte à la dessiccation* (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé sur 1,000 g.

**Réactif à l'acide aminométhylalizarinediacétique.** *1003901.*

*Solution A.* Dissolvez 0,36 g de *nitrate céreux R* dans de l'*eau R* et complétez à 50 mL avec le même solvant.

*Solution B.* Préparez une suspension de 0,7 g d'*acide aminométhylalizarinediacétique R* dans 50 mL d'*eau R*. Dissolvez la substance en ajoutant environ 0,25 mL d'*ammoniaque concentrée R*. Ajoutez 0,25 mL d'*acide acétique glacial R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

*Solution C.* Dissolvez 6 g d'*acétate de sodium R* dans 50 mL d'*eau R*. Ajoutez 11,5 mL d'*acide acétique glacial R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

A 33 mL d'*acétone R*, ajoutez 6,8 mL de solution C, 1,0 mL de solution B et 1,0 mL de solution A, puis complétez à 50 mL avec de l'*eau R*.

*Essai de sensibilité.* A 1,0 mL de *solution à 10 ppm de fluorure (F) R*, ajoutez 19,0 mL d'*eau R* et 5,0 mL du réactif à l'acide aminométhylalizarinediacétique. Après 20 min, la solution présente une coloration bleue.

*Conservation* : pendant 5 jours.

**Solution d'acide aminométhylalizarinediacétique.** *1003902.*

Dissolvez 0,192 g d'*acide aminométhylalizarine-diacétique R* dans 6 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* récemment préparé. Ajoutez 750 mL d'*eau R*, 25 mL de *solution tampon succinate pH 4,6 R*, puis goutte à goutte, de l'*acide chlorhydrique 0,5 M* jusqu'à début de virage du rouge-violet au jaune (pH compris entre 4,5 et 5). Ajoutez 100 mL d'*acétone R*. Puis complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

**4-Aminométhylbenzoïque (acide).** $C_8H_9NO_2$. ($M_r$ 151,2). *1167800.* [56-91-7].

**Aminonitrobenzophénone.** $C_{13}H_{10}N_2O_3$. ($M_r$ 242,2). *1004000.* [1775-95-7]. 2-Amino-5-nitrobenzophénone.

Poudre cristalline jaune, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans le tétrahydrofurane, peu soluble dans le méthanol.

F : environ 160 °C.

$A_{1\,cm}^{1\%}$ : 690 à 720, déterminé à 233 nm avec une solution à 0,01 g/L dans le *méthanol R*.

**6-Aminopénicillanique (acide).** $C_8H_{12}N_2O_3S$. ($M_r$ 216,3). *1162100.* [551-16-6]. Acide (2*S*,5*R*,6*R*)-6-amino3,3-diméthyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylique.

*Aspect* : poudre blanche ou sensiblement blanche.

F : environ 205 °C, avec décomposition.

**Aminophénazone.** $C_{13}H_{17}N_3O$. ($M_r$ 231,3). *1133900.* [58-15-1]. 4-(Diméthylamino)-1,5-diméthyl-2-phényl-1,2-dihydro-3*H*-pyrazol-3-one.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores, solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 108 °C.

**2-Aminophénol.** $C_6H_7NO$. ($M_r$ 109,1). *1147500.* [95-55-6].

Cristaux brun-jaune pâle qui deviennent marron rapidement, assez solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 172 °C.

*Conservation* : en récipient étanche et à l'abri de la lumière.

**3-Aminophénol.** $C_6H_7NO$. ($M_r$ 109,1). *1147600.* [591-27-5].

Cristaux brun-jaune pâle, assez solubles dans l'eau.

F : environ 122 °C.

**4-Aminophénol.** $C_6H_7NO$. ($M_r$ 109,1). *1004300.* [123-30-8].

*Teneur* : au minimum 95 pour cent.

Poudre cristalline blanche ou légèrement colorée, se colorant par exposition à l'air et à la lumière, assez soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol anhydre.

F : environ 186 °C, avec décomposition.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Aminopolyéther.** $C_{18}H_{36}N_2O_6$. ($M_r$ 376,5). *1112500.* [23978-09-8]. 4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8,8,8]hexacosane.

F : 70 °C à 73 °C.

**3-Aminopropanol.** $C_3H_9NO$. ($M_r$ 75,1). *1004400.* [156-87-6]. 3-Aminopropan-1-ol. Propanolamine.

Liquide limpide, visqueux et incolore.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,99.

$n_D^{20}$ : environ 1,461.

F : environ 11 °C.

**3-Aminopropionique (acide).** $C_3H_7NO_2$. ($M_r$ 89,1). *1004500.* [107-95-9]. β-Alanine.

*Teneur* : au minimum 99 pour cent.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, facilement soluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, pratiquement insoluble dans l'acétone.

F : environ 200 °C, avec décomposition.

**Aminopyrazolone.** $C_{11}H_{13}N_3O$. ($M_r$ 203,2). *1004600.* [83-07-8]. 4-Amino-2,3-diméthyl-1-phénylpyrazolin-5-one.

Poudre ou aiguilles jaune pâle, assez solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 108 °C.

**Solution d'aminopyrazolone.** *1004601.*

Solution à 1 g/L dans la *solution tampon pH 9,0 R*.

**Ammoniaque concentrée.** *1004700.*

Voir *Solution concentrée d'ammoniaque (0877).*

**Ammoniaque.** *1004701.*

*Teneur* : 170 g/L à 180 g/L de gaz ammoniac $NH_3$ ($M_r$ 17,03).

Prélevez 67 g d'*ammoniaque concentrée R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

$d_{20}^{20}$ : 0,931 à 0,934.

Lorsque l'ammoniaque est utilisée dans l'essai du fer, elle satisfait à l'essai suivant : évaporez à siccité au bain-marie 5 mL d'ammoniaque, ajoutez 10 mL d'*eau R*, 2 mL d'une solution d'*acide citrique R* à 200 g/L et 0,1 mL d'*acide thioglycolique R*. Alcalinisez en ajoutant de l'*ammoniaque R* et complétez à 20 mL avec de l'*eau R*. Il ne se développe pas de coloration rose.

*Conservation* : à l'abri du dioxyde de carbone de l'air et à une température inférieure à 20 °C.

**Ammoniaque concentrée R1.** *1004800.*

*Teneur* : au minimum 32,0 pour cent *m/m* de $NH_3$ ($M_r$ 17,03).

Liquide limpide et incolore.

$d_{20}^{20}$ : 0,883 à 0,889.

*Dosage.* Pesez exactement un flacon à bouchon rodé contenant 50,0 mL d'*acide chlorhydrique 1 M*. Introduisez 2 mL d'*ammoniaque concentrée R1* et pesez de nouveau. Titrez par l'*hydroxyde de sodium 1 M* en présence de 0,5 mL d'*indicateur mixte au rouge de méthyle R*.

1 mL d'*acide chlorhydrique 1 M* correspond à 17,03 mg de $NH_3$.

*Conservation* : à l'abri du dioxyde de carbone de l'air et à une température inférieure à 20 °C.

**Ammoniaque diluée R1.** *1004702.*

*Teneur* : 100 g/L à 104 g/L de $NH_3$ ($M_r$ 17,03).

Prélevez 41 g d'*ammoniaque concentrée R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

**Ammoniaque diluée R2.** *1004703.*

*Teneur* : 33 g/L à 35 g/L de $NH_3$ ($M_r$ 17,03).

Prélevez 14 g d'*ammoniaque concentrée R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

**Ammoniaque diluée R3.** *1004704.*

*Teneur* : 1,6 g/L à 1,8 g/L de $NH_3$ ($M_r$ 17,03).

Prélevez 0,7 g d'*ammoniaque concentrée R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

**Ammoniaque diluée R4.** *1004706.*

*Teneur* : 8,4 g/L à 8,6 g/L de $NH_3$ ($M_r$ 17,03).

Prélevez 3,5 g d'*ammoniaque concentrée R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

**Ammoniaque exempte de plomb.** *1004705.*

Satisfait aux spécifications de l'*ammoniaque diluée R1* et à la spécification supplémentaire suivante : à 20 mL d'ammoniaque exempte de plomb, ajoutez 1 mL de *solution de cyanure de potassium exempte de plomb R*, complétez à 50 mL avec de l'*eau R* et ajoutez 0,10 mL de *solution de sulfure de sodium R*. La solution n'est pas plus fortement colorée qu'une solution témoin préparée sans sulfure de sodium.

**Ammonium (acétate d').** $C_2H_7NO_2$. ($M_r$ 77,1). *1004900.* [631-61-8].

Cristaux incolores, très déliquescents, très solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Solution d'acétate d'ammonium.** *1004901.*

Dissolvez 150 g d'*acétate d'ammonium R* dans de l'*eau R*. Ajoutez 3 mL d'*acide acétique glacial R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

*Conservation* : pendant 1 semaine.

**Ammonium (bicarbonate d').** $NH_4HCO_3$. ($M_r$ 79,1). *1005500.* [1066-33-7].

*Teneur* : au minimum 99 pour cent.

**Ammonium ((1*R*)-(−)-10-camphorsulfonate d').** $C_{10}H_{19}NO_4S$. ($M_r$ 249,3). *1103200.*

*Teneur* : au minimum 97,0 pour cent de (1*R*)-(−)-10-camphorsulfonate d'ammonium.

$[\alpha]_D^{20}$ : − 18 ± 2, déterminé avec une solution à 50 g/L.

**Ammonium (carbamate d').** $CH_6N_2O_2$. ($M_r$ 78,1). *1168400.* [1111-78-0]. Sel d'ammonium de l'acide carbamique.

**Ammonium (carbonate d').** *1005200.* [506-87-6]. Mélange en proportions variables de bicarbonate d'ammonium ($NH_4HCO_3$ ; $M_r$ 79,1) et de carbamate d'ammonium ($NH_2COONH_4$ ; $M_r$ 78,1).

Masses blanches ou sensiblement blanches, translucides, lentement solubles dans environ 4 parties d'eau. L'eau bouillante décompose le carbonate d'ammonium.

Le carbonate d'ammonium libère au minimum 30 pour cent *m/m* de $NH_3$ ($M_r$ 17,03).

*Dosage.* Dissolvez 2,00 g de carbonate d'ammonium dans 25 mL d'*eau R*. Ajoutez lentement 50,0 mL d'*acide chlorhydrique 1 M* et titrez par l'*hydroxyde de sodium 1 M* en présence de 0,1 mL de *solution de méthylorange R*.

1 mL d'*acide chlorhydrique 1 M* correspond à 17,03 mg de $NH_3$.

*Conservation* : à une température inférieure à 20 °C.

**Solution de carbonate d'ammonium.** *1005201.*

Solution à 158 g/L.

**Solution de carbonate d'ammonium R1.** *1005202.*

Dissolvez 20 g de *carbonate d'ammonium R* dans 20 mL d'*ammoniaque diluée R1* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

**Ammonium (chlorure d').** *1005300.* [12125-02-9].

Voir *Chlorure d'ammonium (0007).*

**Solution de chlorure d'ammonium.** *1005301.*

Solution à 107 g/L.

**Ammonium (citrate d').** $C_6H_{14}N_2O_7$. ($M_r$ 226,2). *1103300.* [3012-65-5]. Hydrogénocitrate de diammonium.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores, facilement solubles dans l'eau, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

*pH* (*2.2.3*) : environ 4,3 pour une solution à 22,6 g/L.

**Ammonium (dihydrogénophosphate d').** $(NH_4)H_2PO_4$. ($M_r$ 115,0). *1005400.* [7722-76-1]. Phosphate d'ammonium monobasique.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores, facilement solubles dans l'eau.

*pH* (*2.2.3*) : environ 4,2 pour une solution à 23 g/L.

**Ammonium (formiate d').** $CH_5NO_2$. ($M_r$ 63,1). *1112600.* [540-69-2].

Cristaux ou granules déliquescents, très solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : 119 °C à 121 °C.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Ammonium (hexafluorogermanate(IV) d').** $(NH_4)_2GeF_6$. ($M_r$ 222,7). *1134000.* [16962-47-3].

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, facilement solubles dans l'eau.

**Ammonium (molybdate d').** $(NH_4)_6Mo_7O_{24},4H_2O$. ($M_r$ 1236). *1005700.* [12054-85-2].

Cristaux incolores ou légèrement jaunes ou verdâtres, solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Réactif au molybdate d'ammonium.** *1005701.*

Mélangez, en respectant l'ordre indiqué, 1 volume d'une solution de *molybdate d'ammonium R* à 25 g/L, 1 volume d'une solution d'*acide ascorbique R* à 100 g/L et 1 volume d'*acide sulfurique R* à 294,5 g/L en $H_2SO_4$. Ajoutez ensuite 2 volumes d'*eau R*.

*Conservation* : pendant 1 jour.

**Réactif au molybdate d'ammonium R1.** *1005706.*

Mélangez 10 mL d'une solution d'*arséniate disodique R* à 60 g/L, 50 mL de *solution de molybdate d'ammonium R*, 90 mL d'*acide sulfurique dilué R* et complétez à 200 mL avec de l'*eau R*.

*Conservation* : dans un flacon brun à 37 °C pendant 24 h.

**Réactif au molybdate d'ammonium R2.** *1005708.*

Dissolvez 50 g de *molybdate d'ammonium R* dans 600 mL d'*eau R*. A 250 mL d'*eau R* froide ajoutez 150 mL d'*acide sulfurique R* et refroidissez. Mélangez les 2 solutions ensemble.

*Conservation* : pendant 1 jour.

**Solution de molybdate d'ammonium.** *1005702.*

Solution à 100 g/L.

**Solution de molybdate d'ammonium R2.** *1005703.*

Dissolvez en chauffant 5,0 g de *molybdate d'ammonium R* dans 30 mL d'*eau R*, puis refroidissez. Ajustez à pH 7,0 avec de l'*ammoniaque diluée R2* et complétez à 50 mL avec de l'*eau R*.

**Solution de molybdate d'ammonium R3.** *1005704.*

*Solution A.* Dissolvez 5 g de *molybdate d'ammonium R* dans 20 mL d'*eau R*, en chauffant.

*Solution B.* Mélangez 150 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* avec 150 mL d'*eau R* et ajoutez en refroidissant 100 mL d'*acide sulfurique R*.

Immédiatement avant l'emploi, ajoutez 80 volumes de solution B à 20 volumes de solution A.

**Solution de molybdate d'ammonium R4.** *1005705.*

Dissolvez 1,0 g de *molybdate d'ammonium R* dans de l'*eau R* et complétez à 40 mL avec le même solvant. Ajoutez 3 mL d'*acide chlorhydrique R*, puis 5 mL d'*acide perchlorique R* et complétez à 100 mL avec de l'*acétone R*. *Conservation* : à l'abri de la lumière pendant 1 mois.

**Solution de molybdate d'ammonium R5.** *1005707.*

Dissolvez 1,0 g de *molybdate d'ammonium R* dans 40,0 mL d'une solution d'*acide sulfurique R* à 15 pour cent *V/V.* Préparez la solution chaque jour.

**Solution de molybdate d'ammonium R6.** *1005709.*

Ajoutez lentement 10 mL d'*acide sulfurique R* à environ 40 mL d'*eau R*. Mélangez et laissez refroidir. Complétez à 100 mL avec de l'*eau R* et mélangez. Ajoutez 2,5 g de *molybdate d'ammonium R* et 1 g de *sulfate de cérium R* puis agitez pendant 15 min pour dissoudre.

**Ammonium (nitrate d').** $NH_4NO_3$. ($M_r$ 80,0). *1005800.* [6484-52-2].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores, hygroscopiques, très solubles dans l'eau et facilement solubles dans le méthanol, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Ammonium (nitrate d') R1.** *1005801.*

Satisfait aux spécifications du *nitrate d'ammonium R* et aux essais supplémentaires suivants.

*Acidité.* La solution de la substance est faiblement acide (*2.2.4*).

*Chlorures* (*2.4.4*) : au maximum 100 ppm, déterminé sur 0,50 g de nitrate d'ammonium.

*Sulfates* (*2.4.13*) : au maximum 150 ppm, déterminé sur 1,0 g de nitrate d'ammonium.

*Cendres sulfuriques* (*2.4.14*) : au maximum 0,05 pour cent, déterminé sur 1,0 g de nitrate d'ammonium.

**Ammonium (oxalate d').** $C_2H_8N_2O_4,H_2O$. ($M_r$ 142,1). *1005900.* [6009-70-7].

Cristaux incolores, solubles dans l'eau.

**Solution d'oxalate d'ammonium.** *1005901.*

Solution à 40 g/L.

**Ammonium (persulfate d').** $(NH_4)_2S_2O_8$. ($M_r$ 228,2). *1006000.* [7727-54-0].

Poudre cristalline ou cristaux granulés, blancs ou sensiblement blancs, facilement solubles dans l'eau.

**Ammonium (phosphate d').** $(NH_4)_2HPO_4$. ($M_r$ 132,1). *1006100.* [7783-28-0]. Hydrogénophosphate de diammonium.

Cristaux ou granulés blancs ou sensiblement blancs, hygroscopiques, très solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

*pH* (*2.2.3*) : environ 8 pour une solution à 200 g/L.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Ammonium (pyrrolidinedithiocarbamate d').** $C_5H_{12}N_2S_2$. ($M_r$ 164,3). *1006200.* [5108-96-3]. 1-Pyrrolidinyldithioformiate d'ammonium.

Poudre cristalline blanche ou jaune pâle, assez soluble dans l'eau, très peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : dans un récipient contenant un morceau de carbonate d'ammonium enveloppé dans une étamine de coton.

**Ammonium (reineckate d').** $NH_4[Cr(NCS)_4(NH_3)_2],H_2O$. ($M_r$ 354,4). *1006300.* [13573-16-5]. Diamine-tétrakis(isothiocyanato)chromate(III) d'ammonium monohydraté. .

Poudre ou cristaux rouges, assez solubles dans l'eau froide, solubles dans l'eau chaude et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution de reineckate d'ammonium.** *1006301.*

Solution à 10 g/L. Préparez extemporanément.

**Ammonium (sulfamate d').** $NH_2SO_3NH_4$. ($M_r$ 114,1). *1006400.* [7773-06-0].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores, hygroscopiques, très solubles dans l'eau, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 130 °C.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Ammonium (sulfate d').** $(NH_4)_2SO_4$. ($M_r$ 132,1). *1006500.* [7783-20-2].

Cristaux incolores ou granulés blancs ou sensiblement blancs, très solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*pH* (*2.2.3*) : 4,5 à 6,0 pour une solution à 50 g/L dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R.*

*Cendres sulfuriques* (*2.4.14*) : au maximum 0,1 pour cent.

**Ammonium (sulfate ferreux et d').** *1038200.* [7783-85-9].

Voir *Ferreux et d'ammonium (sulfate) R.*

**Ammonium (sulfate ferrique et d').** *1037700.* [7783-83-7].

Voir *Ferrique et d'ammonium (sulfate) R.*

**Ammonium (sulfure d'), solution de.** *1123300.*

Dans 120 mL d'*ammoniaque diluée R1,* faites passer du *sulfure d'hydrogène R* jusqu'à saturation et ajoutez 80 mL d'*ammoniaque diluée R1.* Préparez extemporanément.

**Ammonium (thiocyanate d').** $NH_4SCN$. ($M_r$ 76,1). *1006700.* [1762-95-4].

Cristaux incolores, déliquescents, très solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Solution de thiocyanate d'ammonium.** *1006701.*

Solution à 76 g/L.

**Ammonium (vanadate d').** $NH_4VO_3$. ($M_r$ 117,0). *1006800.* [7803-55-6]. Trioxovanadate(V) d'ammonium.

Poudre cristalline blanche ou faiblement jaunâtre, peu soluble dans l'eau, soluble dans l'*ammoniaque diluée R1.*

**Solution de vanadate d'ammonium.** *1006801.*

Dissolvez 1,2 g de *vanadate d'ammonium R* dans 95 mL d'*eau R* et complétez à 100 mL avec de l'*acide sulfurique R.*

**Ammonium et de cérium (nitrate d').** $(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$. ($M_r$ 548,2). *1005000.* [16774-21-3].

Poudre cristalline jaune orangé ou cristaux orangés, transparents, solubles dans l'eau.

**Ammonium et de cérium (sulfate d').** $(NH_4)_4Ce(SO_4)_4,2H_2O$. ($M_r$ 633). *1005100.* [10378-47-9].

Poudre cristalline ou cristaux jaune orangé, lentement solubles dans l'eau.

**Amoxicilline trihydratée.** *1103400.*

Voir *Amoxicilline trihydratée (0260).*

**α-Amylase.** *1100800.* 1,4-α-D-glucane-glucanohydrolase (EC 3.2.1.1).

Poudre blanche ou brun clair.

**Solution d'α-amylase.** *1100801.*

Solution d'*α-amylase R* ayant une activité de 800 UAF/g.

**β-Amyrine.** $C_{30}H_{50}O$. ($M_r$ 426,7). *1141800.* [559-70-6]. Oléan-12-én-3β-ol.

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

F : 187 °C à 190 °C.

4. Réactifs

**Anéthole.** $C_{10}H_{12}O$. ($M_r$ 148,2). *1006900.* [4180-23-8]. 1-Méthoxy-4-(propén-1-yl)benzène.

Masse blanche ou sensiblement blanche, cristalline jusqu'à 20-21 °C, liquide au-dessus de 23 °C, pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol anhydre, soluble dans l'acétate d'éthyle et dans l'éther de pétrole.

$n_D^{25}$ : environ 1,56.

Eb : environ 230 °C.

*L'anéthole utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle d'anis (0804).*

*Solution à examiner.* L'anéthole à examiner.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent de *trans-anéthole* (temps de rétention = environ 41 min), calculé par le procédé de normalisation.

**Aniline.** $C_6H_7N$. ($M_r$ 93,1). *1007100.* [62-53-3]. Benzènamine.

Liquide incolore ou légèrement jaunâtre, soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,02.

Eb : 183 °C à 186 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Aniline (chlorhydrate d').** $C_6H_8ClN$. ($M_r$ 129,6). *1147700.* [142-04-1]. Chlorhydrate de benzènamine.

Cristaux. Le chlorhydrate d'aniline fonce au contact de l'air et de la lumière.

F : environ 198 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

***p*-Anisidine.** $C_7H_9NO$. ($M_r$ 123,2). *1103500.* [104-94-9]. 4-Méthoxyaniline.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, assez solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol anhydre.

*Attention : la p-anidisine irrite et sensibilise la peau.*

*Teneur* : au minimum 97,0 pour cent.

*Conservation* : à l'abri de la lumière, à une température de 0 °C à 4 °C.

La coloration de la *p*-anisidine tend à s'intensifier en cours de conservation en raison de l'oxydation. Un réactif décoloré peut être réduit et décoloré de la manière suivante : dissolvez 20 g de *p-anisidine R* dans 500 mL d'*eau R* à 75 °C. Ajoutez 1 g de *sulfite de sodium R* et 10 g de *charbon activé R* et mélangez pendant 5 min. Filtrez, refroidissez le filtrat à environ 0 °C et laissez reposer à cette température pendant au moins 4 h. Filtrez, lavez les cristaux avec une petite quantité d'*eau R* à environ 0 °C et séchez les cristaux sous vide sur du *pentoxyde de diphosphore R.*

**Anisique (aldéhyde).** $C_8H_8O_2$. ($M_r$ 136,1). *1007300.* [123-11-5]. 4-Méthoxybenzaldéhyde.

Liquide huileux, très peu soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

Eb : environ 248 °C.

*L'aldéhyde anisique utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle d'anis (0804).*

*Solution à examiner.* L'aldéhyde anisique à examiner.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Solution d'aldéhyde anisique.** *1007301.*

Mélangez, dans l'ordre, 0,5 mL d'*aldéhyde anisique R* avec 10 mL d'*acide acétique glacial R*, 85 mL de *méthanol R* et 5 mL d'*acide sulfurique R.*

**Solution d'aldéhyde anisique R1.** *1007302.*

Mélangez dans l'ordre 10 mL d'*aldéhyde anisique R*, 90 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et 10 mL d'*acide sulfurique R.*

**Anthracène.** $C_{14}H_{10}$. ($M_r$ 178,2). *1007400.* [120-12-7].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, peu soluble dans le chloroforme.

F : environ 218 °C.

**Anthrone.** $C_{14}H_{10}O$. ($M_r$ 194,2). *1007500.* [90-44-8]. 9(10*H*)-Anthracénone.

Poudre cristalline, jaune pâle.

F : environ 155 °C.

**Antimoine (trichlorure d').** $SbCl_3$. ($M_r$ 228,1). *1007700.* [10025-91-9].

Cristaux incolores ou masses cristallines transparentes, hygroscopiques, facilement solubles dans l'éthanol anhydre. Le trichlorure d'antimoine est hydrolysé par l'eau.

*Conservation* : en récipient étanche, à l'abri de l'humidité.

**Solution de trichlorure d'antimoine.** *1007701.*

Lavez rapidement 30 g de *trichlorure d'antimoine R* avec 2 fois 15 mL de *chloroforme exempt d'éthanol R*. Décantez complètement les liquides de lavage. Dissolvez aussitôt les cristaux lavés, en chauffant légèrement, dans 100 mL de *chloroforme exempt d'éthanol R.*

*Conservation* : sur quelques grammes de *sulfate de sodium anhydre R.*

**Solution de trichlorure d'antimoine R1.** *1007702.*

*Solution A.* Dissolvez 110 g de *trichlorure d'antimoine R* dans 400 mL de *chlorure d'éthylène R*. Ajoutez 2 g d'*oxyde d'aluminium anhydre R*, mélangez et filtrez sur un filtre de verre fritté (40) (*2.1.2*). Complétez à 500,0 mL avec du *chlorure d'éthylène R* et mélangez. L'absorbance de la solution (*2.2.25*), déterminée à 500 nm sous une épaisseur de 2 cm, est au maximum de 0,07.

*Solution B.* Sous une hotte, mélangez 100 mL de *chlorure d'acétyle R* récemment distillé avec 400 mL de *chlorure d'éthylène R.*

Mélangez 90 mL de solution A avec 10 mL de solution B.

*Conservation* : dans un récipient de verre brun à bouchon rodé pendant 7 jours. Rejetez toute solution colorée.

**Antithrombine III.** *1007800.* [90170-80-2].

L'antithrombine III est purifiée à partir du plasma humain par chromatographie agarose héparine et doit posséder une activité spécifique d'au moins 6 UI/mg.

**Solution d'antithrombine III R1.** *1007801.*

Reconstituez l'*antithrombine III R* selon les indications du fabricant et diluez à 1 UI/mL dans une *solution tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane-chlorure de sodium pH 7,4 R.*

**Solution d'antithrombine III R2.** *1007802.*

Reconstituez l'*antithrombine III R* selon les indications du fabricant et diluez avec la *solution tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane-chlorure de sodium pH 7,4 R*, pour obtenir une solution à 0,5 UI/mL.

**Solution d'antithrombine III R3.** *1007803.*

Reconstituez l'*antithrombine III R* selon les indications du fabricant et diluez à 0,3 UI/mL avec de la *solution tampon phosphate pH 6,5 R.*

**Solution d'antithrombine III R4.** *1007804.*

Reconstituez l'*antithrombine III R* selon les indications du fabricant et diluez à 0,1 UI/mL avec de la *solution tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane-EDTA pH 8,4 R.*

**Apigénine.** $C_{15}H_{10}O_5$. ($M_r$ 270,2). *1095800.* [520-36-5]. 4′,5,7-Trihydroxyflavone.

Poudre, faiblement jaunâtre, pratiquement insoluble dans l'eau, assez soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 310 °C, avec décomposition.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Fleur de camomille romaine (0380)* : déposez 10 µL d'une solution d'apigénine à 0,25 g/L dans du *méthanol R* ; le chromatogramme présente dans son tiers supérieur une bande principale de fluorescence vert-jaune.

**Apigénine-7-glucoside.** $C_{21}H_{20}O_{10}$. ($M_r$ 432,4). *1095900.* [578-74-5]. Apigétrine. 7-(β-D-Glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphényl)-4*H*-1-benzopyran-4-one.

Poudre, faiblement jaunâtre, pratiquement insoluble dans l'eau, assez soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : 198 °C à 201 °C.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Fleur de camomille romaine (0380)* : déposez 10 µL d'une solution d'apigénine-7-glucoside à 0,25 g/L dans du *méthanol R* ; le chromatogramme présente dans son tiers médian une bande principale de fluorescence jaunâtre.

*L'apigénine-7-glucoside utilisée en chromatographie liquide satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications données dans la monographie *Fleur de Matricaire (0404).*

*Solution à examiner.* Dissolvez 10,0 mg d'apigénine-7-glucoside dans du *méthanol R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Aprotinine.** *1007900.* [9087-70-1].

Voir *Aprotinine (0580).*

**Arabinose.** $C_5H_{10}O_5$. ($M_r$ 150,1). *1008000.* [87-72-9]. L-(+)-Arabinose.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, facilement soluble dans l'eau.

$[\alpha]_D^{20}$ : + 103 à + 105, déterminé avec une solution à 50 g/L dans de l'*eau R* contenant environ 0,05 pour cent de $NH_3$.

**Arachidique (alcool).** $C_{20}H_{42}O$. ($M_r$ 298,5). *1156300.* [629-96-9]. 1-Eicosanol.

F : environ 65 °C.

*Teneur* : au minimum 96 pour cent.

**Arbutine.** *1008100.*

Voir *Arbutoside R.*

**Arbutoside.** $C_{12}H_{16}O_7$. ($M_r$ 272,3). *1008100.* [497-76-7]. Arbutine. 4-Hydroxyphényl-β-D-glucopyranoside.

Aiguilles fines, blanches ou sensiblement blanches, brillantes, facilement solubles dans l'eau, très solubles dans l'eau chaude, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Feuille de busserole (1054)* ; le chromatogramme présente une seule tache principale.

**Argent (diéthyldithiocarbamate d').** $C_5H_{10}AgNS_2$. ($M_r$ 256,1). *1110400.* [1470-61-7].

Poudre jaune pâle ou gris-jaune, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans la pyridine.

Le diéthyldithiocarbamate d'argent peut être préparé comme suit : dissolvez 1,7 g de *nitrate d'argent R* dans 100 mL d'*eau R* et dissolvez séparément 2,3 g de *diéthyldithiocarbamate de sodium R* dans 100 mL d'*eau R*. Refroidissez les 2 solutions à 10 °C, mélangez et, en agitant, recueillez le précipité jaune sur un filtre de verre fritté (*2.1.2*) ; lavez avec 200 mL d'*eau R* froide. Séchez le précipité sous vide pendant 2-3 h.

Le diéthyldithiocarbamate d'argent peut être utilisé tant qu'il n'a pas changé d'aspect et ne dégage pas d'odeur forte.

**Argent (nitrate d').** *1078300.* [7761-88-8].

Voir *Nitrate d'argent (0009).*

**Réactif au nitrate d'argent.** *1078305.*

A un mélange de 3 mL d'*ammoniaque concentrée R* et de 40 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M*, ajoutez goutte à goutte, en agitant, 8 mL d'une solution de *nitrate d'argent R* à 200 g/L. Complétez à 200 mL avec de l'*eau R.*

**Solution ammoniacale de nitrate d'argent.** *1078303.*

Dissolvez 2,5 g de *nitrate d'argent R* dans 80 mL d'*eau R* ; ajoutez, goutte à goutte en agitant, de l'*ammoniaque diluée R1* jusqu'à dissolution du précipité. Complétez à 100 mL avec de l'*eau R*. Préparez extemporanément.

**Solution de nitrate d'argent R1.** *1078301.*

Solution à 42,5 g/L.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Solution de nitrate d'argent R2.** *1078302.*

Solution à 17 g/L.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Solution de nitrate d'argent dans la pyridine.** *1078304.*

Solution à 85 g/L dans la *pyridine R*.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Argent (oxyde d').** $Ag_2O$. ($M_r$ 231,7). *1078400.* [20667-12-3]. Oxyde de diargent.

Poudre noir-brun, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent, facilement soluble dans l'acide nitrique dilué et dans l'ammoniaque.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Arginine.** *1103600.* [74-79-3].

Voir *Arginine (0806).*

**Argon.** Ar. ($A_r$ 39,95). *1008200.* [7440-37-1].

*Teneur* : au minimum 99,995 pour cent *V/V.*

*Monoxyde de carbone* (*2.5.25, Procédé I*) : au maximum 0,6 ppm *V/V* ; le titrage effectué sur 10 L d'*argon R* à un débit de 4 L/h ne consomme pas plus de 0,05 mL de *thiosulfate de sodium 0,002 M.*

**Argon R1.** Ar. ($A_r$ 39,95). *1176000.* [7440-37-1].

*Teneur* : au minimum 99,99990 pour cent *V/V.*

**Argon pour chromatographie.** Ar. ($A_r$ 39,95). *1166200.* [7440-37-1].

*Teneur* : au minimum 99,95 pour cent *V/V.*

**Aromadendrène.** $C_{15}H_{24}$. ($M_r$ 204,4). *1139100.* [489-39-4]. (1*R*,2*S*,4*R*,8*R*,11*R*)-3,3,11-Triméthyl-7-méthylènetricyclo-[6.3.0.0$^{2,4}$]undécane.

Liquide limpide, presque incolore.

$d_4^{20}$ : environ 0,911.

$n_D^{20}$ : environ 1,497.

$[\alpha]_D^{20}$ : environ + 12.

Eb : environ 263 °C.

*L'aromadendrène utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de mélaleuca (1837).*

*Teneur* : au minimum 92 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Arséniate disodique.** $Na_2HAsO_4,7H_2O$. ($M_r$ 312,0). *1102500.* [10048-95-0]. Hydrogénoarséniate disodique heptahydraté. Arséniate sodique dibasique.

Cristaux efflorescents dans l'air chaud, facilement solubles dans l'eau, solubles dans le glycérol, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent. La solution aqueuse est alcaline au tournesol.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,87.

F : environ 57 °C quand le chauffage est rapide.

**Arsénieux (anhydride).** $As_2O_3$. ($M_r$ 197,8). *1008300.* [1327-53-3]. Trioxyde de diarsenic.

Poudre cristalline ou masses blanches ou sensiblement blanches, peu solubles dans l'eau, solubles dans l'eau bouillante.

**Solution d'arsénite.** *1008301.*

Dissolvez 0,50 g d'*anhydride arsénieux R* dans 5 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R*, ajoutez 2,0 g de *bicarbonate de sodium R* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*.

**Ascorbique (acide).** *1008400.* [50-81-7].

Voir *Acide ascorbique (0253).*

**Solution d'acide ascorbique.** *1008401.*

Dissolvez 50 mg d'*acide ascorbique R* dans 0,5 mL d'*eau R* et complétez à 50 mL dans du *diméthylformamide R*.

**Asiaticoside.** $C_{48}H_{78}O_{19}$. ($M_r$ 959). *1123500.* [16830-15-2]. 2α,3β,23-Trihydroxy-4α-urs-12-én-28-oate de *O*-6-désoxy-α-L-mannopyranosyl-(1→4)-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-*O*-β-D-glucopyranosyle.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique, soluble dans le méthanol, peu soluble dans l'éthanol anhydre, insoluble dans l'acétonitrile.

F : environ 232 °C, avec décomposition.

*Eau* (*2.5.12*) : 6,0 pour cent.

*L'asiaticoside utilisé en chromatographie liquide satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications données dans la monographie *Hydrocotyle (1498).*

*Teneur* : au minimum 97,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

*Conservation* : à l'abri de l'humidité.

**Aspartique (acide).** *1134100.* [56-84-8].

Voir *Acide aspartique (0797).*

**L-Aspartyl-L-phénylalanine.** $C_{13}H_{16}N_2O_5$. ($M_r$ 280,3). *1008500.* [13433-09-5]. Acide (*S*)-3-amino-*N*-[(*S*)-1-carboxy-2-phényléthyl]succinamique.

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

F : environ 210 °C, avec décomposition.

**Astragaloside IV.** $C_{41}H_{68}O_{14}$. ($M_r$ 785). *1178200.* [84687-43-4]. β-D-Glucopyranoside de (20*R*,24*S*)-20,24-époxy-16β,25-dihydroxy-3β-(β-D-xylopyranosyloxy)-9,19-cyclolanostan-6α-yle.

**Atropine (sulfate d').** *1159000.* [5908-99-6]. Voir *Sulfate d'atropine (0068).*

**Aucubine.** $C_{15}H_{22}O_9$. ($M_r$ 346,3). *1145200.* [479-18-1]. β-D-Glucopyranoside de [1*S*,4a*R*,5*S*,7a*S*)-5-hydroxy-7-(hydroxyméthyl)-1,4a,5,7a-tétrahydrocyclopenta[*c*]pyran-1-yle.

Cristaux, solubles dans l'eau, dans l'éthanol à 96 pour cent et dans le méthanol, pratiquement insolubles dans l'éther de pétrole.

$[\alpha]_D^{20}$ : environ − 163.

F : environ 181 °C.

**Azométhine H.** $C_{17}H_{12}NNaO_8S_2$. ($M_r$ 445,4). *1008700.* [5941-07-1]. Hydrogéno-4-hydroxy-5-(2-hydroxybenzylidéneamino)-2,7-naphtalènedisulfonate de sodium.

**Solution d'azométhine H.** *1008701.*

Dissolvez en chauffant doucement 0,45 g d'*azométhine H R* et 1 g d'*acide ascorbique R* dans de l'*eau R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

**Azote.** $N_2$. ($M_r$ 28,01). *1059300.* [7727-37-9].

Azote lavé et desséché.

**Azote exempt d'oxygène.** *1059600.*

Faites passer l'*azote R* à travers la *solution alcaline de pyrogallol R*.

**Azote R1.** $N_2$. ($M_r$ 28,01). *1059400.* [7727-37-9].

*Teneur* : au minimum 99,999 pour cent *V/V*.

*Monoxyde de carbone* : moins de 5 ppm.

*Oxygène* : moins de 5 ppm.

**Azote (monoxyde d').** NO. ($M_r$ 30,01). *1108300.*

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent *V/V*.

**Azote pour chromatographie.** $N_2$. ($M_r$ 28,01). *1059500.* [7727-37-9].

*Teneur* : au minimum 99,95 pour cent *V/V*.

**Azote (protoxyde d').** $N_2O$. ($M_r$ 44,01). *1108500.*

*Teneur* : au minimum 99,99 pour cent *V/V*.

*Monoxyde d'azote* : moins de 1 ppm.

*Monoxyde de carbone* : moins de 1 ppm.

**Bandelette indicatrice de pH.** *1178900.*

Bandelette en plastique comportant plusieurs segments de papier imprégné d'un colorant indicateur permettant une détermination visuelle du pH, dans l'intervalle prescrit, par comparaison avec une échelle de référence.

**Bandelettes réactives pour peroxydes.** *1147800.*

Utilisez des bandelettes du commerce avec une échelle appropriée couvrant un intervalle de concentration en peroxydes de 0 ppm à 25 ppm.

**Barbaloïne.** $C_{21}H_{22}O_9,H_2O$. ($M_r$ 436,4). *1008800.* [1415-73-2]. Aloïne. 1,8-Dihydroxy-3-hydroxyméthyl-10-β-D-glucopyranosyl-10*H*-anthracén-9-one.

Poudre cristalline jaune ou jaune foncé ou aiguilles jaunes noircissant par exposition à l'air et à la lumière, assez solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent, solubles dans l'acétone, dans l'ammoniaque et dans les hydroxydes alcalins.

$A_{1\,\mathrm{cm}}^{1\%}$ : 192 environ à 269 nm, 226 environ à 296,5 nm et 259 environ à 354 nm, déterminé dans le *méthanol R* et calculé par rapport à la substance anhydre.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Bourdaine (0025)* ; le chromatogramme présente une seule tache principale.

**Barbital.** *1008900.* [57-44-3].

Voir *Barbital (0170).*

**Barbital sodique.** $C_8H_{11}N_2NaO_3$. ($M_r$ 206,2). *1009000.* [144-02-5]. Dérivé sodique de la 5,5-diéthyl-1*H*,3*H*,5*H*-pyrimidine-2,4,6-trione.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores, facilement solubles dans l'eau, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Barbiturique (acide).** $C_4H_4N_2O_3$. ($M_r$ 128,1). *1009100.* [67-52-7]. 1*H*,3*H*,5*H*-pyrimidine-2,4,6-trione.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'eau bouillante et dans les acides dilués.

F : environ 253 °C.

**Baryum (acétate de).** $C_4H_6BaO_4$. ($M_r$ 255,4). *1162700.* [543-80-6]. Diacétate de baryum.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, soluble dans l'eau.

$d_{20}^{20}$ : 2,47.

**Baryum (carbonate de).** $BaCO_3$. ($M_r$ 197,3). *1009200.* [513-77-9].

Poudre ou masses friables blanches ou sensiblement blanches, pratiquement insolubles dans l'eau.

**Baryum (chlorure de).** $BaCl_2,2H_2O$. ($M_r$ 244,3). *1009300.* [10326-27-9]. Dichlorure de baryum.

Cristaux incolores, facilement solubles dans l'eau, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution de chlorure de baryum R1.** *1009301.*

Solution à 61 g/L.

**Solution de chlorure de baryum R2.** *1009302.*

Solution à 36,5 g/L.

**Baryum (hydroxyde de).** $Ba(OH)_2,8H_2O$. ($M_r$ 315,5). *1009400.* [12230-71-6]. Dihydroxyde de baryum.

Cristaux incolores, solubles dans l'eau.

**Solution d'hydroxyde de baryum.** *1009401.*

Solution à 47,3 g/L.

**Baryum (nitrate de).** $Ba(NO_3)_2$. ($M_r$ 261,3). *1163800.* [10022-31-8].

Cristaux ou poudre cristalline, facilement soluble dans l'eau, très peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans l'acétone.

F : environ 590 °C.

**Baryum (sulfate de).** *1009500.* [7727-43-7].

Voir *Sulfate de baryum (0010).*

**Benzalacétone.** $C_{10}H_{10}O$. ($M_r$ 146,2). *1168500.* [122-57-6]. (3*E*)-4-phénylbut-3-én-2-one.

Masse blanche ou jaune pâle.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent.

Eb : environ 261 °C.

F : environ 39 °C.

**Benzaldéhyde.** $C_7H_6O$. ($M_r$ 106,1). *1009600.* [100-52-7].

Liquide incolore ou faiblement coloré en jaune, peu soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,05.

$n_D^{20}$ : environ 1,545.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : au minimum 95 pour cent distillent de 177 °C à 180 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Benzène.** $C_6H_6$. ($M_r$ 78,1). *1009800.* [71-43-2].

Liquide incolore, limpide, inflammable, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

Eb : environ 80 °C.

**Benzène-1,2,4-triol.** $C_6H_6O_3$. ($M_r$ 126,1). *1177500.* [533-73-3]. Hydroxyhydroquinone. Hydroxyquinol.

Facilement soluble dans l'eau, dans l'éthanol à 96 pour cent et dans l'acétate d'éthyle.

F : environ 140 °C.

**Benzéthonium (chlorure de).** $C_{27}H_{42}ClNO_2,H_2O$. ($M_r$ 466,1). *1009900.* [121-54-0]. Chlorure de benzyldiméthyl[2-[2-[4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phénoxy]éthoxy]éthyl]ammonium monohydraté.

Poudre fine, blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores, solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 163 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Benzidine.** $C_{12}H_{12}N_2$. ($M_r$ 184,2). *1145300.* [92-87-5]. Biphényle-4,4′-diamine.

*Teneur* : au minimum 95 pour cent.

Poudre blanche ou légèrement jaunâtre ou rougeâtre, noircissant par exposition à l'air et à la lumière.

F : environ 120 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Benzile.** $C_{14}H_{10}O_2$. ($M_r$ 210,2). *1117800.* [134-81-6]. Diphényléthanedione.

Poudre cristalline jaune, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, l'acétate d'éthyle et le toluène.

F : 95 °C.

**Benzocaïne.** $C_9H_{11}NO_2$. ($M_r$ 165,2). *1123600.* [94-09-7].

Voir *Benzocaïne (0011).*

**Benzoïne.** $C_{14}H_{12}O_2$. ($M_r$ 212,3). *1010200.* [579-44-2]. 2-Hydroxy-1,2-diphényléthanone.

Cristaux faiblement jaunâtres, très peu solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'acétone, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent chaud.

F : environ 137 °C.

**Benzoïque (acide).** *1010100.* [65-85-0].

Voir *Acide benzoïque (0066).*

**Benzophénone.** $C_{13}H_{10}O$. ($M_r$ 182,2). *1010300.* [119-61-9]. Diphénylméthanone.

Cristaux prismatiques, pratiquement insolubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 48 °C.

**1,4-Benzoquinone.** $C_6H_4O_2$. ($M_r$ 108,1). *1118500.* [106-51-4]. Cyclohexa-2,5-diène-1,4-dione.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent.

**Benzoylarginine (chlorhydrate d'ester éthylique de).** $C_{15}H_{23}ClN_4O_3$. ($M_r$ 342,8). *1010500.* [2645-08-1]. Chlorhydrate de l'ester éthylique de *N*-benzoyl-L-arginine. Chlorhydrate de (*S*)-2-benzamido-5-guanidinovalérate d'éthyle.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, très soluble dans l'eau et dans l'éthanol anhydre.

$[\alpha]_D^{20}$ : – 15 à – 18, déterminé avec une solution à 10 g/L.

F : environ 129 °C.

$A_{1\,cm}^{1\%}$ : 310 à 340, déterminé à 227 nm avec une solution à 0,01 g/L.

**Benzoyle (chlorure de).** $C_7H_5ClO$. ($M_r$ 140,6). *1010400.* [98-88-4].

Liquide incolore, lacrymogène, décomposé par l'eau et par l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,21.

Eb : environ 197 °C.

***N*-Benzoyl-L-prolyl-L-phénylalanyl-L-arginine 4-nitroanilide (acétate de).** $C_{35}H_{42}N_8O_8$. ($M_r$ 703). *1010600.*

**3-Benzoylpropionique (acide).** $C_{10}H_{10}O_3$. ($M_r$ 178,2). *1171000.* [2051-95-8]. Acide 4-oxo-4-phénylbutanoïque.

F : environ 118 °C.

**2-Benzoylpyridine.** $C_{12}H_9NO$. ($M_r$ 183,2). *1134300.* [91-02-1]. Phényl(pyridin-2-yl)méthanone.

Cristaux incolores, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 43 °C.

**Benzyle (benzoate de).** *1010800.* [120-51-4].

Voir *Benzoate de benzyle (0705).*

*Chromatographie*. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Baume du Pérou (0754)* : déposez 20 µL d'une solution de benzoate de

4. Réactifs

benzyle à 0,3 pour cent *V/V* dans l'*acétate d'éthyle R*. Après pulvérisation et chauffage, le chromatogramme présente une bande principale dont le $R_F$ est environ 0,8.

**Benzyle (cinnamate de).** *1010900.* [103-41-3].

Voir *Cinnamate de benzyle R*.

**Benzyle (cyanure de).** $C_8H_7N$. ($M_r$ 117,2). *1171100.* [140-29-4]. Phénylacétonitrile.

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent

Liquide limpide, incolore ou jaune clair.

$n_D^{20}$ : environ 1,523.

Eb : environ 233 °C.

**Benzylique (alcool).** *1010700.* [100-51-6].

Voir *Alcool benzylique (0256).*

**Benzylpénicilline sodique.** *1011000.* [69-57-8].

Voir *Benzylpénicilline sodique (0114).*

**2-Benzylpyridine.** $C_{12}H_{11}N$. ($M_r$ 169,2). *1112900.* [101-82-6]. *Teneur* : au minimum 98,0 pour cent.

Liquide jaune.

F : 13 °C à 16 °C.

**Benzyltriméthylammonium (chlorure de).** $C_{10}H_{16}ClN$. ($M_r$ 185,7). *1155700.* [56-93-9]. Chlorure de *N,N,N*-triméthylphénylméthanaminium. Chlorure de *N,N,N*-triméthylbenzèneméthanaminium.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, soluble dans l'eau.

F : environ 230 °C, avec décomposition.

**Berbérine (chlorure de).** $C_{20}H_{18}ClNO_4,2H_2O$. ($M_r$ 407,8). *1153400.* [5956-60-5]. Chlorure de 9,10-diméthoxy-5,6-dihydrobenzo[*g*]-1,3-benzodioxolo[5,6-*a*]quinolizinium.

Cristaux jaunes, peu solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : 204 °C à 206 °C.

*Le chlorure de berbérine utilisé en chromatographie liquide satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage*. Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications données dans la monographie *Hydrastis (1831).*

*Teneur* : au minimum 95 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Bergaptène.** $C_{12}H_8O_4$. ($M_r$ 216,2). *1103700.* [484-20-8]. 5-Méthoxypsoralène.

Cristaux incolores, pratiquement insolubles dans l'eau, assez solubles dans l'éthanol à 96 pour cent et peu solubles dans l'acide acétique glacial.

F : environ 188 °C.

**Bétuline.** $C_{30}H_{50}O_2$. ($M_r$ 442,7). *1011100.* [473-98-3]. Lup-20(39)-ène-3β,28-diol.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche.

F : 248 °C à 251 °C.

**Bibenzyle.** $C_{14}H_{14}$. ($M_r$ 182,3). *1011200.* [103-29-7]. 1,2-Diphényléthane.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, très soluble dans le chlorure de méthylène, facilement soluble dans l'acétone, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : 50 °C à 53 °C.

**Bicinchoninate disodique.** $C_{20}H_{10}N_2Na_2O_4$. ($M_r$ 388,3). *1126600.* [979-88-4]. 2,2′-Biquinoléine-4,4′-dicarboxylate disodique.

**Biphényle.** $C_{12}H_{10}$. ($M_r$ 154,2). *1168600.* [92-52-4].

F : 68 °C à 70 °C.

**Biphényl-4-ol.** $C_{12}H_{10}O$. ($M_r$ 170,2). *1011300.* [90-43-7]. 4-Phénylphénol.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau.

F : 164 °C à 167 °C.

**(– )-α-Bisabolol.** $C_{15}H_{26}O$. ($M_r$ 222,4). *1128800.* [23089-26-1]. (2*S*)-6-Méthyl-2-[(1*S*)-4-méthylcyclohex-3-ényl]hept-5-èn-2-ol. Lévoménol.

Liquide visqueux, incolore, à légère odeur caractéristique, pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, le méthanol, le toluène, les huiles grasses et les huiles essentielles.

$d_{20}^{20}$ : 0,925 à 0,935.

$n_D^{20}$ : 1,492 à 1,500.

$[\alpha]_D^{20}$ : – 54,5 à – 58,0, déterminé avec une solution à 50 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*.

*Le (– )-α-bisabolol utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage*. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications de la monographie *Huile essentielle de matricaire (1836).*

*Solution à examiner*. Une solution de (– )-α-bisabolol à 4 g/L dans le *cyclohexane R*.

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Bisbenzimide.** $C_{25}H_{27}Cl_3N_6O,5H_2O$. ($M_r$ 624). *1103800.* [23491-44-3]. Trichlorhydrate de 4-[5-[5-(4-méthylpipérazin-1-yl)benzimidazol-2-yl]benzimidazol-2-yl]phénol pentahydraté.

**Solution mère de bisbenzimide.** *1103801.*

Dissolvez 5 mg de *bisbenzimide R* dans de l'*eau R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

*Conservation* : à l'obscurité.

**Solution de travail de bisbenzimide.** *1103802.*

Immédiatement avant emploi, prélevez 100 µL de *solution mère de bisbenzimide R* et complétez à 100 mL avec de la *solution saline tamponnée phosphate pH 7,4 R*.

**Bis(méthylphényloxazolyl)benzène.** *1056200.* [3073-87-8].

Voir *Méthylphényloxazolylbenzène R*.

**Bismuth (nitrate de) pentahydraté.** $Bi(NO_3)_3,5H_2O$. ($M_r$ 485,1). *1165600.* [10035-06-0].

F : environ 30 °C.

**Bismuth (sous-nitrate de).** $4BiNO_3(OH)_2,BiO(OH)$. ($M_r$ 1462). *1011500.* [1304-85-4].

Poudre blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau.

**Bismuth (sous-nitrate de) R1.** *1011501.*

*Teneur* : 71,5 pour cent à 74,0 pour cent de bismuth (Bi), et 14,5 pour cent à 16,5 pour cent de nitrate exprimé en pentoxyde d'azote ($N_2O_5$).

**Solution de sous-nitrate de bismuth.** *1011502.*

Dissolvez 5 g de *sous-nitrate de bismuth R1* dans un mélange de 8,4 mL d'*acide nitrique R* et de 50 mL d'*eau R* et complétez à 250 mL avec de l'*eau R*. Filtrez si nécessaire.

*Acidité*. A 10 mL de solution, ajoutez 0,05 mL de *solution de méthylorange R*. Le virage de l'indicateur nécessite entre 5,0 mL et 6,25 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M*.

**2,2′-Bis(octadécyloxy)-5,5′-spirobi[1,3,2-dioxaphosphorinane].** *1031800.*

Voir *2,2′-di(octadécyloxy)-5,5′-spirobi-1,3,2-dioxaphosphinane R*.

**Biuret.** $C_2H_5N_3O_2$. ($M_r$ 103,1). *1011600.* [108-19-0].

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, hygroscopiques, solubles dans l'eau, assez solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : 188 °C à 190 °C, avec décomposition.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Biuret (réactif au).** *1011601.*

Dissolvez 1,5 g de *sulfate de cuivre R* et 6,0 g de *tartrate de sodium et de potassium R* dans 500 mL d'*eau R*. Ajoutez 300 mL d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 100 g/L exempte de carbonate, complétez à 1000 mL avec la même solution et mélangez.

**Bleu acide 83.** $C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$. ($M_r$ 826). *1012200.* [6104-59-2].

Colour Index No. 42660.
Bleu brillant. Bleu brillant de Coomassie R 250.

Poudre brune insoluble dans l'eau froide, peu soluble dans l'eau bouillante et l'éthanol anhydre, soluble dans l'acide sulfurique, dans l'acide acétique glacial et dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins.

**Bleu acide 90.** $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$. ($M_r$ 854). *1001300.* [6104-58-1].
Colour Index No. 42655.
[4-[[4-[(4-Ethoxyphényl)amino]phényl][[4-(éthyl)(3-sulfonatobenzyl)amino]phényl]méthylène]cyclo-hexa-2,5-dién-1-ylidène](éthyl)(3- sulfonatobenzyl)ammonium sodique.

Poudre brun foncé à reflet violet et particules à reflet métallique, soluble dans l'eau et dans l'éthanol anhydre.

$A^{1\%}_{1\,\mathrm{cm}}$ : supérieur à 500, déterminé à 577 nm dans une solution tampon pH 7,0, à une concentration de 0,01 g/L et calculé par rapport à la substance desséchée.

*Perte à la dessiccation* (*2.2.32*) : au maximum 5,0 pour cent, déterminé par chauffage à l'étuve à 105 °C sur 0,500 g.

**Bleu acide 92.** $C_{26}H_{16}N_3Na_3O_{10}S_3$. ($M_r$ 696). *1001400.* [3861-73-2].

Colour Index No. 13390.
Bleu de Coomassie. Anazolène sodique. 8-Hydroxy-4′-(phénylamino)azonaphtalène-3,5′,6-trisulfonate de trisodium.

Cristaux bleu foncé, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent, solubles dans l'eau, dans l'acétone et dans l'éther monoéthylique d'éthylèneglycol.

**Solution de bleu acide 92.** *1001401.*

Dissolvez 0,5 g de *bleu acide 92 R* dans un mélange de 10 mL d'*acide acétique glacial R*, de 45 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et de 45 mL d'*eau R*.

**Bleu acide 93.** $C_{37}H_{27}N_3Na_2O_9S_3$. ($M_r$ 800). *1134200.* [28983-56-4].

Colour Index No. 42780.
Bleu de méthyle. Bleu de Poirrier.

Mélange de di- et trisulfonates, de triphénylrosaniline et de triphénylpararosaniline.

Poudre bleu foncé.

*Zone de virage* : pH 9,4 à pH 14,0.

**Solution de bleu acide 93.** *1134201.*

Dissolvez 0,2 g de *bleu acide 93 R* dans de l'*eau R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

**Bleu brillant.** *1012200.* [6104-59-2].

Voir *Bleu acide 83 R*.

**Bleu de bromophénol.** $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$. ($M_r$ 670). *1012800.* [115-39-9]. 3′,3″,5′,5″-Tétrabromophénolsulfonephtaléine. 4,4′-(3*H*-2,1-Benzoxathiole-3-ylidène)bis(2,6-dibromophénol) *S,S*-dioxyde.

Poudre jaune orangé clair, très peu soluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, facilement soluble dans les solutions d'hydroxydes alcalins.

**Solution de bleu de bromophénol.** *1012801.*

Dissolvez 0,1 g de *bleu de bromophénol R* dans 1,5 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M*, ajoutez 20 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

*Essai de sensibilité.* A 0,05 mL de solution de bleu de bromophénol, ajoutez 20 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R* et 0,05 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M*. La solution est jaune. Le virage au bleu-violet de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,1 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M*.

*Zone de virage* : pH 2,8 (jaune) à pH 4,4 (bleu-violet).

**Solution de bleu de bromophénol R1.** *1012802.*

Dissolvez, en chauffant doucement, 50 mg de *bleu de bromophénol R* dans 3,73 mL d'*hydroxyde de sodium 0,02 M* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

**Solution de bleu de bromophénol R2.** *1012803.*

Chauffez 0,2 g de *bleu de bromophénol R* avec 3 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* et 10 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Après dissolution, laissez refroidir et complétez à 100 mL avec de l'*éthanol à 96 pour cent R*.

**Bleu de bromothymol.** $C_{27}H_{28}Br_2O_5S$. ($M_r$ 624). *1012900.* [76-59-5]. 3′,3″-Dibromothymolsulfonephtaléine. 4,4′-(3*H*-2,1-Benzoxathiol-3-ylidène)bis(2-bromo-6-isopropyl-3-méthylphénol) *S,S*-dioxyde.

Poudre rose-rouge ou brunâtre, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins.

**Solution de bleu de bromothymol R1.** *1012901.*

Dissolvez 50 mg de *bleu de bromothymol R* dans un mélange de 4 mL d'*hydroxyde de sodium 0,02 M* et de 20 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*, puis complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

*Essai de sensibilité.* A 0,3 mL de *solution de bleu de bromothymol R1*, ajoutez 100 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R*. La solution est jaune. Le virage au bleu de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,1 mL d'*hydroxyde de sodium 0,02 M*.

*Zone de virage* : pH 5,8 (jaune) à pH 7,4 (bleu).

**Solution de bleu de bromothymol R2.** *1012902.*

Solution à 10 g/L dans le *diméthylformamide R*.

**Solution de bleu de bromothymol R3.** *1012903.*

Chauffez 0,1 g de *bleu de bromothymol R* avec 3,2 mL d'*hydroxyde de sodium 0,05 M* et 5 mL d'*éthanol à 90 pour cent V/V R*. Après dissolution, complétez à 250 mL avec de l'*éthanol à 90 pour cent V/V R*.

**Solution de bleu de bromothymol R4.** *1012904.*

Dissolvez 100 mg de *bleu de bromothymol R* dans un mélange à volumes égaux d'*éthanol à 96 pour cent R* et d'*eau R* et complétez à 100 mL avec le même mélange de solvants. Filtrez si nécessaire.

**Bleu de Coomassie.** *1001400.* [3861-73-2].

Voir *Bleu acide 92 R*.

**Solution de bleu de Coomassie.** *1001401.*

Voir *Solution de bleu acide 92 R*.

**Bleu dextran 2000.** *1011700.* [9049-32-5].

Préparé à partir de dextran de masse moléculaire relative moyenne de $2 \times 10^6$ par introduction d'un chromophore polycyclique colorant la substance en bleu. Le degré de substitution est de 0,017.

La substance est cryodesséchée et se dissout rapidement et complètement dans l'eau et dans les solutions salines aqueuses.

*Absorbance* (*2.2.25*). Une solution à 1 g/L dans une *solution tampon phosphate pH 7 R*, présente un maximum d'absorption à 280 nm.

**Bleu d'hydroxynaphtol (sel sodique de).** $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{11}S_3$. ($M_r$ 620). *1044500.* [63451-35-4]. 2,2′-Dihydroxy-1,1′-azonaphtalène-3′,4,6′-trisulfonate de trisodium.

**Bleu de méthylène.** $C_{16}H_{18}ClN_3S,xH_2O$. ($M_r$ 319,9 pour la substance anhydre). *1055800.* [7220-79-3].

Schultz No. 1038.

Colour Index No. 52015.
Chlorure de 3,7-diméthylaminophénothiazin-5-ium.

Le bleu de méthylène se présente sous des degrés différents d'hydratation et peut contenir jusqu'à 22 pour cent d'eau.

Poudre cristalline vert foncé ou poudre de couleur bronze, facilement soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Bleu de méthylthymol.** $C_{37}H_{40}N_2Na_4O_{13}S$. ($M_r$ 845). *1158500.* [1945-77-3]. 2,2′,2″,2‴-[1,1-Dioxo-6-3*H*-2,1-Benzoxathiol-3-ylidènebis[[6-hydroxy-2-méthyl-5-(1-méthyléthyl)-3,1-phénylène]méthylènenitrilo]]tétraacétate de tétrasodium.

Il se produit une coloration bleue en présence de calcium dans les solutions alcalines.

**Mélange de bleu de méthylthymol.** *1158501.*

Mélangez 1 partie de *bleu de méthylthymol R* et 100 parties de *nitrate de potassium R.*

**Bleu Nil A.** $C_{20}H_{21}N_3O_5S$. ($M_r$ 415,5). *1058200.* [3625-57-8].

Schultz No. 1029.

Colour Index No. 51180.
Hydrogénosulfate de 5-amino-9-(diéthylamino)benzo-[*a*]phénoxazinylium.

Poudre cristalline verte, à reflets bronze, assez soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, dans l'acide acétique glacial et dans la pyridine.

*Absorbance* (*2.2.25*). Une solution à 0,005 g/L dans l'*éthanol à 50 pour cent V/V R* présente un maximum d'absorption à 640 nm.

**Solution de bleu Nil A.** *1058201.*

Solution à 10 g/L dans l'*acide acétique anhydre R.*

*Essai de sensibilité.* A 50 mL d'*acide acétique anhydre R,* ajoutez 0,25 mL de solution de bleu Nil A. La solution est bleue. Elle vire au bleu-vert après addition de 0,1 mL d'*acide perchlorique 0,1 M.*

*Zone de virage* : pH 9,0 (bleu) à pH 13,0 (rouge).

**Bleu de nitrotétrazolium.** $C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$. ($M_r$ 818). *1060000.* [298-83-9]. Dichlorure de 3,3′-(3,3′-diméthoxy-4,4′-diphénylène)di[2-(4-nitrophényl)-5-phényl-2*H*-tétrazolinum]. Bleu de *p*-nitrotétrazolium.

Cristaux solubles dans le méthanol en donnant une solution limpide, jaune.

F : environ 189 °C, avec décomposition.

**Bleu oracet 2R.** $C_{20}H_{14}N_2O_2$. ($M_r$ 314,3). *1061100.* [4395-65-7].

Colour Index No. 61110.
1-Amino-4-(phénylamino)anthracène-9,10-dione.

F : environ 194 °C.

**Bleu solide B (sel de).** $C_{14}H_{12}Cl_2N_4O_2$. ($M_r$ 339,2). *1037400.* [84633-94-3].

Schultz No. 490.

Colour Index No. 37235.
Dichlorure de 3,3′-diméthoxy(biphényl)-4,4′-bisdiazonium.

Poudre vert foncé, soluble dans l'eau. Le sel de bleu solide B est stabilisé par le chlorure de zinc.

*Conservation* : en récipient étanche, à une température de 2 °C à 8 °C.

**Bleu sulfan.** $C_{27}H_{31}N_2NaO_6S_2$. ($M_r$ 566,6). *1086000.* [129-17-9].
Schultz No. 769.

Colour Index No. 42045.
Bleu acide 1. Bleu patenté VF. Bleu de disulfine. Bleu VS. [[[(4-Diéthylamino)phényl](2,4-disulfonatophényl)méthylène]cyclohexa-2,5-dièn-1-ylidène]diéthylammonium sodique.

Poudre violette, soluble dans l'eau. Les solutions diluées de bleu sulfan sont bleues et virent au jaune par addition d'acide chlorhydrique concentré.

**Bleu de tétrazolium.** $C_{40}H_{32}Cl_2N_8O_2$. ($M_r$ 728). *1089000.* [1871-22-3]. Dichlorure de 3,3′-(3,3′-diméthoxy[1,1′-biphényl]-4,4′-diyl)bis[2,5-diphényl-2*H*-tétrazolium].

Cristaux jaunes, peu solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent et dans le méthanol, pratiquement insolubles dans l'acétone.

F : environ 245 °C, avec décomposition.

**Bleu de thymol.** $C_{27}H_{30}O_5S$. ($M_r$ 466,6). *1090600.* [76-61-9]. Thymolsulfonephtaléine. 4,4′-(3*H*-2,1-Benzoxathiol-3-ylidène)bis(2-isopropyl-5-méthylphénol) *S,S*-dioxyde.

Poudre cristalline, bleu-vert ou vert-brun, peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans les solutions alcalines diluées.

**Solution de bleu de thymol.** *1090601.*

Dissolvez 0,1 g de *bleu de thymol R* dans un mélange de 2,15 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* et de 20 mL d'*éthanol à 96 pour cent R.* Complétez à 100 mL avec de l'*eau R.*

*Essai de sensibilité.* A 0,1 mL de solution de bleu de thymol, ajoutez 100 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R* et 0,2 mL d'*hydroxyde de sodium 0,02 M.* La solution est bleue. Le virage au jaune de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,15 mL d'*acide chlorhydrique 0,02 M.*

*Zones de virage* : pH 1,2 (rouge) à pH 2,8 (jaune) ; pH 8,0 (vert-jaune) à pH 9,6 (bleu).

**Bleu de toluidine.** $C_{15}H_{16}ClN_3S$. ($M_r$ 305,8). *1091900.* [92-31-9].

Schultz No. 1041.

Colour Index No. 52040.
Bleu de toluidine O. Chlorure de 3-amino-7-diméthylamino-2-méthylphénothiazin-5-ium.

Poudre vert foncé, soluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Boldine.** $C_{19}H_{21}NO_4$. ($M_r$ 327,3). *1118800.* [476-70-0]. 1,10-Diméthoxy-6aα-aporphine-2,9-diol.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, très faiblement soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et les solutions diluées d'acides.

$[\alpha]_D^{25}$ : environ + 127, déterminé avec une solution à 1 g/L dans l'*éthanol anhydre R.*

F : environ 163 °C.

**Bore (trichlorure de).** $BCl_3$. ($M_r$ 117,2). *1112000.* [10294-34-5].

Gaz incolore. Le trichlorure de bore réagit violemment avec l'eau ; il est disponible sous forme de solutions dans un solvant approprié (2-chloroéthanol, chlorure de méthylène, hexane, heptane, méthanol).

$n_D^{20}$ : environ 1,420.

Eb : environ 12,6 °C.

*Attention : toxique et corrosif.*

**Solution méthanolique de trichlorure de bore.** *1112001.*

Solution à 120 g/L de $BCl_3$ dans le *méthanol R.*

*Conservation* : à l'abri de la lumière à une température de – 20 °C, de préférence dans des tubes scellés.

**Bore (trifluorure de).** $BF_3$. ($M_r$ 67,8). *1012100.* [7637-07-2].

Gaz incolore.

**Solution méthanolique de trifluorure de bore.** *1012101.*

Solution à 140 g/L de *trifluorure de bore R* dans le *méthanol R.*

**Borique (acide).** *1011800.* [10043-35-3].

Voir *Acide borique (0001).*

**Solution saturée d'acide borique froide.** *1011801.*

A 3 g d'*acide borique R,* ajoutez 50 mL d'*eau R* et agitez pendant 10 min. Placez la solution au réfrigérateur pendant 2 h.

**Bornéol.** $C_{10}H_{18}O$. ($M_r$ 154,3). *1011900.* [507-70-0]. *endo*-1,7,7-Triméthylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol.

Cristaux incolores, facilement sublimables, pratiquement insolubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent et dans l'éther de pétrole.

F : environ 208 °C.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) en utilisant une plaque recouverte de *gel de silice G R.* Déposez 10 µL d'une solution de bornéol à 1 g/L dans le *toluène R.* Développez sur un parcours de 10 cm avec du *chloroforme R.* Laissez sécher la plaque à l'air. Pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* en utilisant 10 mL de réactif pour une plaque de 200 mm de côté. Chauffez à 100-105 °C pendant 10 min. Le chromatogramme présente une seule tache principale.

**Bornyle (acétate de).** $C_{12}H_{20}O_2$. ($M_r$ 196,3). *1012000.* [5655-61-8]. Acétate d'*endo*-1,7,7-triméthylbicyclo[2.2.1]hept-2-yle.

Cristaux incolores ou liquide incolore, très peu solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 28 °C.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) en utilisant une plaque recouverte de *gel de silice G R.* Déposez 10 µL d'une solution d'acétate de bornyle à 2 g/L dans le *toluène R.* Développez sur un parcours de 10 cm avec du *chloroforme R.* Laissez sécher la plaque à l'air. Pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* en utilisant 10 mL de réactif pour une plaque de 200 mm de côté. Chauffez à 100-105 °C pendant 10 min. Le chromatogramme présente une seule tache principale.

**Borotrifluorure.** *1012100.*

Voir *Bore (trifluorure de) R.*

**Brome.** $Br_2$. ($M_r$ 159,8). *1012400.* [7726-95-6].

Liquide rouge-brun, fumant, peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 3,1.

**Eau de brome.** *1012402.*

Agitez 3 mL de *brome R* avec 100 mL d'*eau R* jusqu'à saturation.

*Conservation* : sur un excès de *brome R* et à l'abri de la lumière.

**Eau de brome R1.** *1012403.*

Agitez 0,5 mL de *brome R* avec 100 mL d'*eau R.*

*Conservation* : à l'abri de la lumière pendant 1 semaine.

**Solution de brome.** *1012401.*

Dissolvez 30 g de *brome R* et 30 g de *bromure de potassium R* dans de l'*eau R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

**Bromélaïnes.** *1012300.* [37189-34-7].

Concentrat d'enzymes protéolytiques obtenu à partir d'*Ananas comosus* Merr.

Poudre jaune terne.

*Activité.* 1 g de bromélaïnes libère environ 1,2 g d'azote aminé d'une solution de *gélatine R* en 20 min à 45 °C et à pH 4,5.

**Solution de bromélaïnes.** *1012301.*

Solution de *bromélaïnes R* à 10 g/L dans un mélange de 1 volume de *solution tampon phosphate pH 5,5 R* et de 9 volumes d'une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L.

**Bromhydrique (acide) à 30 pour cent.** *1098700.* [10035-10-6].

Solution d'acide bromhydrique à 30 pour cent dans de l'*acide acétique glacial R.*

Dégazez avec précaution.

**Acide bromhydrique dilué.** *1098701.*

Dans des flacons inactiniques munis de bouchons en polyéthylène, introduisez 5,0 mL d'*acide bromhydrique à 30 pour cent R.* Fermez sous *argon R* et conservez à l'obscurité. Au moment de l'emploi, ajoutez 5,0 mL d'*acide acétique glacial R.* Agitez.

*Conservation* : à l'obscurité.

**Bromhydrique (acide) à 47 pour cent.** *1118900.*

Solution d'acide bromhydrique à 47 pour cent *m/m.*

**Acide bromhydrique dilué R1.** *1118901.*

Contient 7,9 g/L de HBr. Dissolvez 16,81 g d'*acide bromhydrique à 47 pour cent R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000 mL avec le même solvant.

**5-Bromo-2′-désoxyuridine.** $C_9H_{11}BrN_2O_5$. ($M_r$ 307,1). *1012500.* [59-14-3]. 5-Bromo-1-(2-désoxy-β-d-*érythro*-pentofuranosyl)-1*H,*3*H*-pyrimidine-2,4-dione.

F : environ 194 °C.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Idoxuridine (0669)* : déposez 5 µL d'une solution de 5-bromo-2′-désoxyuridine à 0,25 g/L ; le chromatogramme présente une seule tache principale.

**Bromométhoxynaphtalène.** $C_{11}H_9BrO$. ($M_r$ 237,1). *1159100.* [5111-65-9]. 2-Bromo-6-méthoxynaphtalène.

F : environ 109 °C.

**Bromophos.** $C_8H_8BrCl_2O_3PS$. ($M_r$ 366,0). *1123700.* [2104-96-3].

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans l'isooctane) peut être utilisée.

**Bromophos-éthyle.** $C_{10}H_{12}BrCl_2O_3PS$. ($M_r$ 394,0). *1123800.* [4824-78-6].

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans l'isooctane) peut être utilisée.

**BRP (solution d'indicateurs).** *1013000.*

Dissolvez 0,1 g de *bleu de bromothymol R,* 20 mg de *rouge de méthyle R* et 0,2 g de *phénolphtaléine R* dans de l'*éthanol à 96 pour cent R,* puis complétez à 100 mL avec le même solvant. Filtrez.

**Brucine.** $C_{23}H_{26}N_2O_4,2H_2O$. ($M_r$ 430,5). *1013100.* [357-57-3]. 10,11-Diméthoxystrychnine.

Cristaux incolores, peu solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 178 °C.

**Butanal.** $C_4H_8O$. ($M_r$ 72,1). *1134400.* [123-72-8]. Butyraldéhyde.

$d_{20}^{20}$ : 0,806.

$n_D^{20}$ : 1,380.

Eb : 75 °C.

**Butane-1,4-diol.** $HO(CH_2)_4OH$. ($M_r$ 90,12). *1174800.* [110-63-4].

**Butanol.** $C_4H_{10}O$. ($M_r$ 74,1). *1013200.* [71-36-3]. *n*-Butanol. 1-Butanol.

Liquide limpide et incolore, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,81.

Eb : 116 °C à 119 °C.

**2-Butanol R1.** $C_4H_{10}O$. ($M_r$ 74,1). *1013301.* Alcool *sec*-butylique.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent.

Liquide limpide et incolore, soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,81.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : au minimum 95 pour cent distillent de 99 °C à 100 °C.

*Dosage*. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Alcool isopropylique (0970)*.

**Butylamine.** $C_4H_{11}N$. ($M_r$ 73,1). *1013600.* [109-73-9]. 1-Butanamine.

Distillez et utilisez dans le mois qui suit.

Liquide incolore, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent.

$n_D^{20}$ : environ 1,401.

Eb : environ 78 °C.

***tert*-Butylamine.** *1100900.* [75-64-9].

Voir *(1,1-Diméthyl)éthylamine R.*

**Butylboronique (acide).** $C_4H_{11}BO_2$. ($M_r$ 101,9). *1013700.* [4426-47-5].

*Teneur* : au minimum 98 pour cent.

F : 90 °C à 92 °C.

**Butyle (acétate de).** $C_6H_{12}O_2$. ($M_r$ 116,2). *1013400.* [123-86-4].

Liquide limpide, incolore, inflammable, peu soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,88.

$n_D^{20}$ : environ 1,395.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : au minimum 95 pour cent distillent de 123 °C à 126 °C.

**Butyle (acétate de) R1.** *1013401.*

*Teneur* : au minimum 99,5 pour cent de $C_6H_{12}O_2$, déterminé par chromatographie en phase gazeuse.

Liquide limpide, incolore, inflammable, peu soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,883.

$n_D^{20}$ : environ 1,395.

*Butanol* : au maximum 0,2 pour cent, déterminé par chromatographie en phase gazeuse.

*Formiate de n-butyle* : au maximum 0,1 pour cent, déterminé par chromatographie en phase gazeuse.

*Propionate de n-butyle* : au maximum 0,1 pour cent, déterminé par chromatographie en phase gazeuse.

*Eau* : au maximum 0,1 pour cent.

**Butyle (4-hydroxybenzoate de).** *1103900.* [94-26-8].

Voir *Parahydroxybenzoate de butyle R.*

**Butyle (méthacrylate de).** $C_8H_{14}O_2$. ($M_r$ 142,2). *1145400.* [97-88-1]. 2-Méthylpropénoate de butyle.

Solution limpide et incolore.

$d_4^{20}$ : environ 0,894.

$n_D^{20}$ : environ 1,424.

Eb : environ 163 °C.

**Butyle (parahydroxybenzoate de).** *1103900.* [94-26-8].

Voir *Parahydroxybenzoate de butyle (0881).*

**di-Butyle (phtalate de).** *1026800.* [84-74-2].

Voir *Dibutyle (phtalate de) R.*

***tert*-Butylhydroperoxyde.** $C_4H_{10}O_2$. ($M_r$ 90,1). *1118000.* [75-91-2]. 1,1-Diméthyléthylhydroperoxyde.

Liquide inflammable, soluble dans les solvants organiques.

$d_{20}^{20}$ : 0,898.

$n_D^{20}$ : 1,401.

Eb : 35 °C.

**Butylhydroxytoluène.** *1013800.* [128-37-0].

Voir *Butylhydroxytoluène (0581).*

***tert*-Butylméthyléther.** *1013900.* [1634-04-4].

Voir *(1,1-Diméthyléthyl)méthyléther R.*

**Butyrique (acide).** $C_4H_8O_2$. ($M_r$ 88,1). *1014000.* [107-92-6]. Acide butanoïque.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent.

Liquide huileux, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,96.

$n_D^{20}$ : environ 1,398.

Eb : environ 163 °C.

**Butyrolactone.** $C_4H_6O_2$. ($M_r$ 86,1). *1104000.* [96-48-0]. Dihydro-2(3*H*)-furanone. γ-Butyrolactone.

Liquide huileux, miscible à l'eau, soluble dans le méthanol.

$n_D^{25}$ : environ 1,435.

Eb : environ 204 °C.

**Cadmium.** Cd. ($A_r$ 112,4). *1014100.* [7440-43-9].

Métal blanc argent brillant, pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'acide nitrique et dans l'acide chlorhydrique chaud.

**Cadmium (nitrate de) tétrahydraté.** $Cd(NO_3)_2,4H_2O$. ($M_r$ 308,5). *1174900.* [10022-68-1].

Cristaux orthorhombiques hygroscopiques, très solubles dans l'eau, solubles dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 59,5 °C.

**Caféine.** *1014400.* [58-08-2].

Voir *Caféine (0267).*

**Caféique (acide).** $C_9H_8O_4$. ($M_r$ 180,2). *1014300.* [331-39-5]. Acide (*E*)-3-(3,4-dihydroxyphényl)propénoïque.

Cristaux ou plaques, blancs ou sensiblement blancs, facilement solubles dans l'eau chaude, dans l'éthanol à 96 pour cent, assez solubles dans l'eau froide.

F : environ 225 °C, avec décomposition.

*Absorbance* (*2.2.25*). Une solution à pH 7,6, récemment préparée, présente 2 maximums d'absorption à 293 nm et à 329 nm respectivement.

**Calcium (carbonate de).** *1014500.* [471-34-1].

Voir *Carbonate de calcium (0014).*

**Calcium (carbonate de) R1.** *1014501.*

Satisfait aux spécifications du *carbonate de calcium R* et à la spécification supplémentaire suivante.

*Chlorures* (*2.4.4*) : au maximum 50 ppm.

**Calcium (chlorure de).** *1014600.* [10035-04-8].

Voir *Chlorure de calcium (0015).*

**Solution de chlorure de calcium.** *1014601.*

Solution à 73,5 g/L.

**Solution de chlorure de calcium 0,01 M.** *1014602.*

Dissolvez 0,147 g de *chlorure de calcium R* dans de l'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

**Solution de chlorure de calcium 0,02 M.** *1014603.*

Dissolvez 2,94 g de *chlorure de calcium R* dans 900 mL d'*eau R*, ajustez à pH 6,0-6,2 et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Conservation* : à une température de 2 °C à 8 °C.

**Solution de chlorure de calcium 0,025 M.** *1014604.*

Dissolvez 0,368 g de *chlorure de calcium R* dans de l'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

**Calcium (chlorure de) R1.** $CaCl_2,4H_2O$. ($M_r$ 183,1). *1014700.* Chlorure de calcium tétrahydraté.

*Fer* : au maximum 0,05 ppm.

**Calcium (chlorure de) anhydre.** $CaCl_2$. ($M_r$ 111,0). *1014800.* [10043-52-4].

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent (substance desséchée).

Granulés blancs sensiblement blancs, déliquescents, très solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent et dans le méthanol.

*Perte à la dessiccation* (*2.2.32*) : au maximum 5,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 200 °C.

*Conservation* : en récipient étanche à l'abri de l'humidité.

**Calcium édétate de sodium.** *1174000.* [62-33-9].

Voir *Calcium édétate de sodium (0231).*

**Calcium (hydroxyde de).** $Ca(OH)_2$. ($M_r$ 74,1). *1015000.* [1305-62-0]. Dihydroxyde de calcium.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, presque entièrement soluble dans 600 parties d'eau.

**Solution d'hydroxyde de calcium.** *1015001.*

Solution saturée récemment préparée.

**Calcium (lactate de).** *1015100.* [41372-22-9].

Voir *Lactate de calcium pentahydraté (0468).*

**Calcium (phosphate de) monobasique monohydraté.** $CaH_4O_8P_2,H_2O$. ($M_r$ 252,1). *1157200.* [10031-30-8]. Tétrahydrogénobisphosphate de calcium monohydraté. Phosphate de calcium (2:1) monohydraté.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, soluble dans l'eau.

**Calcium (sulfate de).** $CaSO_4,{}^1/_2H_2O$. ($M_r$ 145,1). *1015200.* [10034-76-1]. Sulfate de calcium hémihydraté.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, soluble dans environ 1500 parties d'eau, pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 pour cent. Additionné de la moitié de sa masse d'eau, le sulfate de calcium hémihydraté se transforme rapidement en une masse dure et poreuse.

**Solution de sulfate de calcium.** *1015201.*

Agitez 5 g de *sulfate de calcium R* avec 100 mL d'*eau R* pendant 1 h et filtrez.

**Calcone-acide carboxylique.** $C_{21}H_{14}N_2O_7S,3H_2O$. ($M_r$ 492,5). *1015300.* [3737-95-9]. Acide 2-hydroxy-1-(2-hydroxy-4-sulfo-1-naphtylazo)naphtalène-3-carboxylique.

Poudre brun-noir, peu soluble dans l'eau, très peu soluble dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 pour cent, assez soluble dans les solutions diluées d'hydroxyde de sodium.

**Mélange composé au calcone-acide carboxylique.** *1015301.*

Mélangez 1 partie de *calcone-acide carboxylique R* et 99 parties de *chlorure de sodium R.*

*Essai de sensibilité.* Dissolvez 50 mg de mélange composé au calcone-acide carboxylique dans un mélange de 2 mL de *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R* et de 100 mL d'*eau R.* La solution est bleue et devient violette par addition de 1 mL d'une solution de *sulfate de magnésium R* à 10 g/L et de 0,1 mL d'une solution de *chlorure de calcium R* à 1,5 g/L ; elle vire au bleu franc par addition de 0,15 mL d'*édétate de sodium 0,01 M.*

**Camphène.** $C_{10}H_{16}$. ($M_r$ 136,2). *1139200.* [79-92-5]. 2,2-Diméthyl-3-méthylènebicyclo[2.2.1]heptane.

*Le camphène utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de romarin (1846).*

*Teneur* : au minimum 90 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**(1*S*)-(+)-10-Camphorsulfonique (acide).** $C_{10}H_{16}O_4S$. (($M_r$ 232,3)). *1104100.* [3144-16-9]. Acide [(1*S*)-7,7-diméthyl-2-oxobicyclo[2.2.1]hept-1-yl]méthanesulfonique. Acide (1*S*,4*R*)-(+)-2-oxo-10-bornènesulfonique. Acide de Reychler.

Cristaux prismatiques, hygroscopiques, solubles dans l'eau.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent d'acide (1*S*)-(+)-10-camphorsulfonique.

$[\alpha]_D^{20}$ : + 20 ± 1, déterminé avec une solution à 43 g/L.

F : environ 194 °C, avec décomposition.

$\Delta A$ (*2.2.41*) : 10,2 × $10^3$, déterminé à 290,5 nm avec une solution à 1,0 g/L.

**Camphre.** *1113000.* [76-22-2]. Voir *Camphre racémique (0655).*

*Le camphre utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de lavande (1338).*

*Solution à examiner.* Solution de camphre à 10 g/L dans de l'*hexane R.*

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Caprique (acide).** $C_{10}H_{20}O_2$. ($M_r$ 172,3). *1142000.* [334-48-5]. Acide décanoïque.

Solide cristallin, très peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol anhydre.

Eb : environ 270 °C.

F : environ 31,4 °C.

*L'acide caprique utilisé dans le dosage des acides gras totaux du Fruit de sabal (1848) satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Fruit de sabal (1848).*

*Teneur* : au minimum 98 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Caprique (alcool).** *1024700.*

Voir *Décanol R.*

**Caproïque (acide).** $C_6H_{12}O_2$. ($M_r$ 116,2). *1142100.* [142-62-1]. Acide hexanoïque.

Liquide huileux, assez soluble dans l'eau.

$d_4^{20}$ : environ 0,926.

$n_D^{20}$ : environ 1,417.

Eb : environ 205 °C.

*L'acide caproïque utilisé dans le dosage des acides gras totaux du Fruit de sabal (1848) satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Fruit de sabal (1848).*

*Teneur* : au minimum 98 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**ε-Caprolactame.** $C_6H_{11}NO$. ($M_r$ 113,2). *1104200.* [105-60-2]. Hexane-6-lactame.

Paillettes hygroscopiques, facilement solubles dans l'eau, dans l'éthanol anhydre et dans le méthanol.

F : environ 70 °C.

**Caprylique (acide).** $C_8H_{16}O_2$. ($M_r$ 144,2). *1142200.* [124-07-2]. Acide octanoïque.

Liquide huileux, légèrement jaune.

$d_4^{20}$ : environ 0,910.

$n_D^{20}$ : environ 1,428.

Eb : environ 239,7 °C.

F : environ 16,7 °C.

*L'acide caprylique utilisé dans le dosage des acides gras totaux du Fruit de sabal (1848) satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Fruit de sabal (1848).*

4. Réactifs

*Teneur* : au minimum 98 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Capsaïcine.** $C_{18}H_{27}NO_3$. ($M_r$ 305,4). *1147900.* [404-86-4]. (*E*)-*N*-[(4-Hydroxy-3-méthoxyphényl)méthyl]-8-méthylnon-6-énamide.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol anhydre.

F : environ 65 °C.

*La capsaïcine utilisée dans le dosage du Piment de Cayenne (1859) satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de la monographie *Piment de Cayenne (1859).*

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Carbazol.** $C_{12}H_9N$. ($M_r$ 167,2). *1015400.* [86-74-8]. Dibenzopyrrole.

Cristaux, pratiquement insolubles dans l'eau, facilement solubles dans l'acétone, assez solubles dans l'éthanol anhydre.

F : environ 245 °C.

**Carbomère.** *1015500.* [9007-20-9].

Polymère réticulé de l'acide acrylique de très haute masse moléculaire relative, contenant une large proportion de groupes carboxyliques (56 pour cent à 68 pour cent de groupes $CO_2H$ calculés par rapport à la substance séchée à 80 °C pendant 1 h). La masse moléculaire relative moyenne est de $3 \times 10^6$.

*pH* (*2.2.3*) : environ 3 pour une suspension à 10 g/L.

**Carbone (dioxyde de).** *1015600.* [124-38-9].

Voir *Dioxyde de carbone (0375).*

**Carbone (dioxyde de) R1.** $CO_2$. ($M_r$ 44,01). *1015700.* [124-38-9].

*Teneur* : au minimum 99,995 pour cent *V/V.*

*Monoxyde de carbone* : moins de 5 ppm.

*Oxygène* : moins de 25 ppm.

*Monoxyde d'azote* : moins de 1 ppm.

**Carbone (dioxyde de) R2.** $CO_2$. ($M_r$ 44,01). *1134500.* [124-38-9].

*Teneur* : au minimum 99 pour cent *V/V.*

**Carbone graphité pour chromatographie.** *1015900.*

Chaînes carbonées d'une longueur supérieure à $C_9$.

*Taille des particules* : 400 µm à 850 µm.

*Densité* : 0,72.

*Surface spécifique* : 10 $m^2$/g.

Ne pas utiliser à une température supérieure à 400 °C.

**Carbone graphité pour chromatographie R1.** *1153500.*

Particules de carbone sphériques et poreuses constituées de couches d'atomes de carbone disposés en hexagone.

*Taille des particules* : 5 µm à 7 µm.

*Volume des pores* : 0,7 $cm^3$/g.

**Carbone (monoxyde de).** CO. ($M_r$ 28,01). *1016000.* [630-08-0].

*Teneur* : au minimum 99,97 pour cent *V/V.*

**Carbone (monoxyde de) R1.** CO. ($M_r$ 28,01). *1134600.* [630-08-0].

*Teneur* : au minimum 99 pour cent *V/V.*

**Carbone (sulfure de).** $CS_2$. ($M_r$ 76,1). *1015800.* [75-15-0]. Disulfure de carbone.

Liquide incolore ou jaunâtre, inflammable, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol anhydre.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,26.

Eb : 46 °C à 47 °C.

**Carbone (tétrachlorure de).** $CCl_4$. ($M_r$ 153,8). *1016100.* [56-23-5]. Tétrachlorométhane.

Liquide limpide et incolore, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : 1,595 à 1,598.

Eb : 76 °C à 77 °C.

**Carbonique (anhydride).** *1015600.* [124-38-9].

Voir *Carbone (dioxyde de) R.*

**Carbophénothion.** $C_{11}H_{16}ClO_2PS_3$. ($M_r$ 342,9). *1016200.* [786-19-6]. *S*-[[(4-Chlorophényl)thio]méthyl]phosphorodithioate de *O,O*-diéthyle.

Liquide jaunâtre, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible avec les solvants organiques.

$d_{4}^{25}$ : environ 1,27.

Pour la monographie *Graisse de laine (0134),* une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans l'isooctane) peut être utilisée.

**Car-3-ène.** $C_{10}H_{16}$. ($M_r$ 136,2). *1124000.* [498-15-7]. 3,7,7-Triméthylbicyclo[4.1.0]hept-3-ène. 4,7,7-Triméthyl-3-norcarène.

Liquide à odeur piquante, peu soluble dans l'eau, soluble dans les solvants organiques.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,864.

$n_D^{20}$ : 1,473 à 1,474.

$[\alpha]_D^{20}$ : + 15 à + 17.

Eb : 170 °C à 172 °C.

*Le car-3-ène utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de noix muscade (1552).*

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Carmin d'indigo.** $C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$. ($M_r$ 466,3). *1045600.* [860-22-0].

Schultz No. 1309.

Colour Index No. 73015.

3,3′-Dioxo-2,2′-bisindolinylidène-5,5′-disulfonate disodique. E 132.

Le carmin d'indigo contient normalement du chlorure de sodium.

Poudre bleue ou bleu-violet ou granulés bleus à reflet cuivré assez solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent. Le carmin d'indigo précipite en solution aqueuse par addition de chlorure de sodium.

**Solution de carmin d'indigo.** *1045601.*

A un mélange de 10 mL d'*acide chlorhydrique R* et de 990 mL d'une solution d'*acide sulfurique exempt d'azote R* à 200 g/L, ajoutez 0,2 g de *carmin d'indigo R.*

*La solution satisfait à l'essai suivant* : à une solution de 1,0 mg de *nitrate de potassium R* dans 10 mL d'*eau R,* ajoutez 10 mL de solution de carmin d'indigo, puis rapidement 20 mL d'*acide sulfurique exempt d'azote R* et chauffez à ébullition ; la coloration bleue disparaît en 1 min.

**Solution de carmin d'indigo R1.** *1045602.*

Dissolvez 4 g de *carmin d'indigo R* dans 900 mL d'*eau R* ajoutés par quantités successives. Ajoutez 2 mL d'*acide sulfurique R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R.*

*Dosage.* Dans une fiole conique de 100 mL à col large, introduisez 10,0 mL de *solution à 100 ppm de nitrate ($NO_3$) R,* 10 mL d'*eau R,* 0,05 mL de la *solution de carmin d'indigo R1,* puis en une seule fois avec précaution 30 mL d'*acide sulfurique R.* Titrez immédiatement par la *solution de carmin d'indigo R1* jusqu'à coloration bleu stable.

Le nombre de millilitres (*n*) utilisés correspond à 1 mg de $NO_3$.

**Carminique (acide).** $C_{22}H_{20}O_{13}$. ($M_r$ 492,4). *1156700.* [1260-17-9]. Acide 7-α-D-glucopyranosyl-3,5,6,8-tétrahydroxy-1-méthyl-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracène-2-carboxylique.

Poudre rouge sombre, très peu soluble dans l'eau, soluble dans le diméthylsulfoxyde, très peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Carvacrol.** $C_{10}H_{14}O$. ($M_r$ 150,2). *1016400.* [499-75-2]. 5-Isopropyl-2-méthylphénol.

Liquide brunâtre, pratiquement insoluble dans l'eau, très soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,975.

$n_D^{20}$ : environ 1,523.

Eb : environ 237 °C.

*Le carvacrol utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de menthe poivrée (0405).*

*Solution à examiner.* Dissolvez 0,1 g de carvacrol dans environ 10 mL d'*acétone R*.

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Carvéol.** $C_{10}H_{16}O$. ($M_r$ 152,2). *1160400.* [99-48-9]. *p*-Mentha-1(6),8-dién-2-ol. 2-Méthyl-5-(1-méthyléthényl)cyclohex-2-énol.

Le carvéol contient des teneurs variables de *cis*- et *trans*-carvéol.

*Le carvéol utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans l'essai du profil chromatographique de la monographie *Huile essentielle de carvi (1817).*

*Teneur* : au minimum 97 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Carvone.** $C_{10}H_{14}O$. ($M_r$ 150,2). *1016500.* [2244-16-8]. (+)-*p*-Mentha-6,8-dién-2-one. (5*S*)-2-Méthyl-5-(1-méthyléthényl)cyclohex-2-énone.

Liquide pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,965.

$n_D^{20}$ : environ 1,500.

$[\alpha]_D^{20}$ : environ + 61.

Eb : environ 230 °C.

*La carvone utilisée en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de menthe poivrée (0405).*

*Solution à examiner.* La carvone à examiner.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Carvone R1.** *1016501.*

Satisfait aux spécifications de la *carvone R* et également à l'essai suivant.

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans l'essai pureté chirale de la monographie *Huile essentielle de carvi (1817).*

*Teneur* : au minimum 98 pour cent.

**(–)-Carvone.** $C_{10}H_{14}O$. ($M_r$ 150,2). *1160500.* [6485-40-1]. (−)-*p*-Mentha-1(6),8-dién-2-one. (5*R*)-2-Méthyl-5-(1-méthyléthényl)cyclohex-2-énone.

Liquide.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,965.

$n_D^{20}$ : environ 1,4988.

$[\alpha]_D^{20}$ : environ – 62.

Eb : environ 230 °C.

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans l'essai de pureté chirale de la monographie *Huile essentielle de carvi (1817).*

*Teneur* : au minimum 99 pour cent.

**β-Caryophyllène.** $C_{15}H_{24}$. ($M_r$ 204,4). *1101000.* [87-44-5]. (*E*)-(1*R*,9*S*)-4,11,11-Triméthyl-8-méthylènebicyclo[7.2.0]undéc-4-ène.

Liquide huileux, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

*Le β-caryophyllène utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de clou de girofle (1091).*

*Solution à examiner.* Le β-caryophyllène à examiner.

*Teneur* : au minimum 90,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Caryophyllène (oxyde de).** $C_{15}H_{24}O$. ($M_r$ 220,4). *1149000.* [1139-30-6]. Epoxyde de (−)-β-caryophyllène. (1*R*,4*R*,6*R*,10*S*)-4,12,12-Triméthyl-9-méthylène-5-oxatricyclo[8.2.0.0$^{4,6}$]dodécane.

Cristaux fins et incolores accompagnés de morceaux.

F : 62 °C à 63 °C.

*L'oxyde de caryophyllène utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de térébenthine type Pinus pinaster (1627).*

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Caséine.** *1016600.* [9000-71-9].

Mélange de phosphoprotéines apparentées obtenu à partir du lait.

Poudre blanche ou sensiblement blanche amorphe ou granules, très peu solubles dans l'eau et dans les solvants organiques non polaires. La caséine se dissout dans l'acide chlorhydrique concentré en donnant une coloration violet clair. La caséine forme des sels avec les acides et avec les bases. Le point isoélectrique est situé à environ pH 4,7. En solution alcaline, la caséine présente un pouvoir rotatoire lévogyre.

**Casticine.** $C_{19}H_{18}O_8$. ($M_r$ 374,3). *1162200.* [479-91-4]. 5-Hydroxy-2-(3-hydroxy-4-méthoxyphényl)-3,6,7-triméthoxy-4*H*-1-benzopyran-4-one.

Cristaux jaunes.

**Catalpol.** $C_{15}H_{22}O_{10}$. ($M_r$ 362,3). *1142300.* [2415-24-9]. β-D-Glucopyranoside de (1a*S*,1b*S*,2*S*,5a*R*,6*S*,6a*S*)-6-hydroxy-1a-(hydroxyméthyl)-1a,1b,2,5a,6,6a-hexahydrooxiréno[4,5]cyclopenta[1,2-*c*]pyran-2-yle.

F : 203 °C à 205 °C.

**Catéchine.** $C_{15}H_{14}O_6,xH_2O$. ($M_r$ 290,3 pour la substance anhydre). *1119000.* [154-23-4]. (+)-(2*R*,3*S*)-2-(3,4-Dihydroxyphényl)-3,4-dihydro-2*H*-chromène-3,5,7-triol. Catéchol. Cianidanol. Cyanidol.

**Cellulose pour chromatographie.** *1016800.* [9004-34-6].

Poudre fine, blanche ou sensiblement blanche et homogène. La taille moyenne des particules est inférieure à 30 µm.

*Préparation de la couche mince.* Préparez une suspension de 15 g de *cellulose pour chromatographie R* dans 100 mL d'*eau R* et homogénéisez pendant 60 s au moyen d'un agitateur électrique. A l'aide d'un dispositif approprié, étalez sur les plaques soigneusement nettoyées, en couche de 0,1 mm d'épaisseur. Laissez sécher à l'air.

4. Réactifs

**Cellulose pour chromatographie R1.** *1016900.*

Cellulose microcristalline. Poudre fine, blanche ou sensiblement blanche et homogène. La taille moyenne des particules est inférieure à 30 µm.

*Préparation de la couche mince.* Préparez une suspension de 25 g de *cellulose pour chromatographie R1* dans 90 mL d'*eau R* et homogénéisez pendant 60 s au moyen d'un agitateur électrique. A l'aide d'un dispositif approprié, étalez sur les plaques soigneusement nettoyées, en couche de 0,1 mm d'épaisseur. Laissez sécher à l'air.

**Cellulose pour chromatographie $F_{254}$.** *1017000.* Cellulose microcristalline $F_{254}$.

Poudre fine, blanche ou sensiblement blanche, homogène, contenant un indicateur de fluorescence dont l'intensité est optimale en lumière ultraviolette à 254 nm. La taille moyenne des particules est inférieure à 30 µm.

*Préparation de la couche mince.* Préparez une suspension de 25 g de *cellulose pour chromatographie $F_{254}$ R* dans 100 mL d'*eau R* et homogénéisez pendant 60 s au moyen d'un agitateur électrique. A l'aide d'un dispositif approprié, étalez sur les plaques soigneusement nettoyées, en couche de 0,1 mm d'épaisseur. Laissez sécher à l'air.

**Céreux (nitrate).** $Ce(NO_3)_3,6H_2O$. ($M_r$ 434,3). *1017400.* [10294-41-4]. Trinitrate de cérium hexahydraté.

Poudre cristalline, incolore ou jaune pâle, facilement soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Cérium (nitrate d'ammonium et de).** *1005000.* [16774-21-3].

Voir *Ammonium et de cérium (nitrate d') R.*

**Cérium (sulfate de).** $Ce(SO_4)_2,4H_2O$. ($M_r$ 404,3). *1017300.* [123333-60-8]. Sulfate de cérium(IV). Sulfate cérique.

Poudre cristalline ou cristaux jaunes ou jaune orangé, très peu solubles dans l'eau, lentement solubles dans les acides dilués.

**Cérium (sulfate d'ammonium et de).** *1005100.* [18923-36-9].

Voir *Ammonium et de cérium (sulfate d') R.*

**Cerveau de boeuf desséché à l'acétone (poudre de).** *1061300.*

Découpez en petits morceaux un cerveau frais de boeuf exempt de tissus vasculaires et conjonctifs. Déshydratez en plaçant le matériau dans l'*acétone R*. Complétez la déshydratation en broyant dans un mortier 30 g du matériau et en y ajoutant des quantités successives de 75 mL d'*acétone R* jusqu'à obtention d'une poudre sèche après filtration. Séchez à 37 °C pendant 2 h ou jusqu'à disparition de l'odeur d'acétone.

**Césium (chlorure de).** CsCl. ($M_r$ 168,4). *1014200.* [7647-17-8].

Poudre blanche ou sensiblement blanche, très soluble dans l'eau, facilement soluble dans le méthanol, pratiquement insoluble dans l'acétone.

**11-Céto-β-boswellique (acide).** $C_{30}H_{46}O_4$. ($M_r$ 470,7). *1167600.* [17019-92-0]. Acide 3α-hydroxy-11-oxours-12-én-24-oïque. Acide (4β)-3α-hydroxy-11-oxours-12-én-23-oïque.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, insoluble dans l'eau, soluble dans l'acétone, dans l'éthanol anhydre et dans le méthanol.

F : 195 °C à 197 °C.

*L'acide 11-céto-β-boswellique utilisé en chromatographie liquide satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications données dans la monographie *Encens indien (2310).*

*Teneur* : au minimum 90 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Cétone anisique.** $C_{10}H_{12}O_2$. ($M_r$ 164,2). *1174700.* [122-84-9]. 1-(4-Méthoxyphényl)propan-2-one.

**Cétostéaryle sodique (sulfate de).** *1079400.*

Voir *Sulfate de cétostéaryle sodique (0847).*

**Cétostéarylique (alcool).** *1017500.* [67762-27-0].

Voir *Alcool cétostéarylique (0702).*

**Cétrimide.** *1017600.* [8044-71-1].

Voir *Cétrimide (0378).*

**Cétylique (alcool).** $C_{16}H_{34}O$. ($M_r$ 242,4). *1160600.* [36653-82-4]. Hexadécan-1-ol.

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent.

F : environ 48 °C.

**Cétylpyridinium (chlorure de) monohydraté.** $C_{21}H_{38}ClN,H_2O$. ($M_r$ 358,0). *1162800.* [6004-24-6]. Chlorure de 1-hexadécylpyridinium monohydraté.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, facilement soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : 80 °C à 83 °C.

**Cétyltriméthylammonium (bromure de).** $C_{19}H_{42}BrN$. ($M_r$ 364,5). *1017700.* [57-09-0]. Bromure de cétrimonium. Bromure de *N*-hexadécyl-*N,N,N*-triméthylammonium.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 240 °C.

**Chamazulène.** $C_{14}H_{16}$. ($M_r$ 184,3). *1148000.* [529-05-5]. 7-Ethyl-1,4-diméthylazulène.

Liquide bleu, très peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, miscible aux huiles grasses, aux huiles essentielles et à la paraffine liquide, soluble avec décoloration dans l'acide phosphorique à 85 pour cent *m/m* et dans l'acide sulfurique à 50 pour cent *V/V*.

*Aspect de la solution.* 50 mg de chamazulène sont solubles dans 2,5 mL d'*hexane R*. La solution bleue produite est limpide dans la couche mince obtenue en inclinant le tube à essai.

*Le chamazulène utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de matricaire (1836).*

*Solution à examiner.* Solution de chamazulène à 4 g/L dans le *cyclohexane R*.

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Charbon activé.** *1017800.* [64365-11-3].

Voir *Charbon activé (0313).*

**Chloracétique (acide).** $C_2H_3ClO_2$. ($M_r$ 94,5). *1018200.* [79-11-8].

Cristaux blancs ou sensiblement blancs ou incolores, déliquescents, très solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Chloral (hydrate de).** *1017900.* [302-17-0].

Voir *Hydrate de chloral (0265).*

**Solution d'hydrate de chloral.** *1017901.*

Dissolvez 80 g d'*hydrate de chloral R* dans 20 mL d'*eau R.*

**Chloramine.** *1018000.* [7080-50-4].

Voir *Tosylchloramide sodique (0381).*

**Solution de chloramine.** *1018001.*

Solution à 20 g/L. Préparez extemporanément.

**Solution de chloramine R1.** *1018002.*

Solution à 0,1 g/L. Préparez extemporanément.

**Solution de chloramine R2.** *1018003.*

Solution à 0,2 g/L. Préparez extemporanément.

**Chloraniline.** $C_6H_6ClN$. ($M_r$ 127,6). *1018300.* [106-47-8]. 4-Chloroaniline.

Cristaux solubles dans l'eau chaude, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 71 °C.

**Chlordane.** $C_{10}H_6Cl_8$. ($M_r$ 409,8). *1124100.* [12789-03-6].

Eb : environ 175 °C.

F : environ 106 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée pour usage technique (10 ng/µL dans l'isooctane) peut être utilisée.

**Chlordiazépoxide.** *1113200.* [58-25-3].

Voir *Chlordiazépoxide (0656).*

**Chlorfenvinphos.** $C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$. ($M_r$ 359,6). *1124200.* [470-90-6].

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Chlorhydrique (acide).** *1043500.* [7647-01-0].

Voir *Acide chlorhydrique concentré (0002).*

**Acide chlorhydrique 2 M.** *3001700.*

Prélevez 206,0 g d'*acide chlorhydrique R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

**Acide chlorhydrique 3 M.** *3001600.*

Prélevez 309,0 g d'*acide chlorhydrique R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

**Acide chlorhydrique 6 M.** *3001500.*

Prélevez 618,0 g d'*acide chlorhydrique R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

**Acide chlorhydrique R1.** *1043501.*

Contient 250 g/L de HCl.

Prélevez 70 g d'*acide chlorhydrique R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R.*

**Acide chlorhydrique bromé.** *1043507.*

A 1 mL de *solution de brome R,* ajoutez 100 mL d'*acide chlorhydrique R.*

**Acide chlorhydrique dilué.** *1043503.*

Contient 73 g/L de HCl.

Prélevez 20 g d'*acide chlorhydrique R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R.*

**Acide chlorhydrique dilué R1.** *1043504.*

Contient 0,37 g/L de HCl.

Prélevez 1,0 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et complétez à 200,0 mL avec de l'*eau R.*

**Acide chlorhydrique dilué R2.** *1043505.*

Prélevez 30 mL d'*acide chlorhydrique 1 M,* complétez à 1000 mL avec de l'*eau R,* puis ajustez à pH 1,6 ± 0,1.

**Acide chlorhydrique dilué exempt de métaux lourds.** *1043509.*

Satisfait aux spécifications de l'*acide chlorhydrique dilué R* et aux teneurs maximales en métaux lourds suivantes.

As : 0,005 ppm.

Cd : 0,003 ppm.

Cu : 0,003 ppm.

Fe : 0,05 ppm.

Hg : 0,005 ppm.

Ni : 0,004 ppm.

Pb : 0,001 ppm.

Zn : 0,005 ppm.

**Acide chlorhydrique éthanolique.** *1043506.*

Prélevez 5,0 mL d'*acide chlorhydrique 1 M* et complétez à 500,0 mL avec de l'*éthanol à 96 pour cent R.*

**Acide chlorhydrique exempt de métaux lourds.** *1043510.*

Satisfait aux spécifications de l'*acide chlorhydrique R* et aux teneurs maximales en métaux lourds suivantes.

As : 0,005 ppm.

Cd : 0,003 ppm.

Cu : 0,003 ppm.

Fe : 0,05 ppm.

Hg : 0,005 ppm.

Ni : 0,004 ppm.

Pb : 0,001 ppm.

Zn : 0,005 ppm.

**Acide chlorhydrique exempt de plomb.** *1043508.*

Satisfait aux spécifications de l'*acide chrlorhydrique R* et à la spécification supplémentaire suivante.

*Plomb* : au maximum 20 ppb.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.22, Procédé I*).

*Solution à examiner.* Dans un creuset de silice, évaporez 200 g d'acide à examiner presque à siccité. Reprenez le résidu par 5 mL d'acide nitrique préparé par distillation sous le point d'ébullition de l'*acide nitrique R* et évaporez à siccité. Reprenez le résidu dans 5 mL d'acide nitrique préparé par distillation sous le point d'ébullition de l'*acide nitrique R.*

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 0,1 ppm de plomb (Pb) R* diluée avec de l'acide nitrique préparé par distillation sous le point d'ébullition de l'*acide nitrique R.*

*Longueur d'onde* : 220,35 nm.

**Acide chlorhydrique méthanolique.** *1043511.*

Prélevez 4,0 mL d'*acide chlorhydrique R* et complétez à 1000,0 mL avec du *méthanol R2.*

**Chloroacétanilide.** $C_8H_8ClNO$. ($M_r$ 169,6). *1018100.* [539-03-7]. 4′-Chloroacétanilide.

*Teneur* : au minimum 95 pour cent.

Poudre cristalline, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 178 °C.

**4-Chlorobenzènesulfonamide.** $C_6H_6ClNO_2S$. ($M_r$ 191,6). *1097400.* [98-64-6].

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

F : environ 145 °C.

**2-Chlorobenzoïque (acide).** $C_7H_5ClO_2$. ($M_r$ 156,6). *1139300.* [118-91-2].

Soluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol anhydre.

Eb : environ 285 °C.

F : environ 140 °C.

**Chlorobutanol.** *1018400.* [57-15-8].

Voir *Chorobutanol anhydre (0382).*

**2-Chloro-2-désoxy-D-glucose.** $C_6H_{11}ClO_5$. ($M_r$ 198,6). *1134700.* [14685-79-1].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, très hygroscopique, soluble dans l'eau et dans le diméthylsulfoxyde, pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**2-Chloroéthanol.** $C_2H_5ClO$. ($M_r$ 80,5). *1097500.* [107-07-3].

Liquide incolore, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,197.

4. Réactifs

$n_D^{20}$ : environ 1,442.

Eb : environ 130 °C.

F : environ – 89 °C.

**Solution de 2-chloroéthanol.** *1097501.*

Dissolvez 125 mg de *2-chloroéthanol R* dans du *2-propanol R* et complétez à 50 mL avec le même solvant. Prélevez 5 mL de solution et complétez à 50 mL avec du *2-propanol R.*

**Chloroéthylamine (chlorhydrate de).** $C_2H_7Cl_2N$. ($M_r$ 116,0). *1124300.* [870-24-6]. Chlorhydrate de 2-chloroéthanamine.

F : environ 145 °C.

**(2-Chloroéthyl)diéthylamine (chlorhydrate de).** $C_6H_{15}Cl_2N$. ($M_r$ 172,1). *1018500.* [869-24-9].

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, très soluble dans l'eau et dans le méthanol, facilement soluble dans le chlorure de méthylène, pratiquement insoluble dans l'hexane.

F : environ 211 °C.

**Chloroforme.** $CHCl_3$. ($M_r$ 119,4). *1018600.* [67-66-3]. Trichlorométhane.

Liquide limpide et incolore, peu soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : 1,475 à 1,481.

Eb : environ 60 °C.

*Ethanol* : 0,4 pour cent *m/m* à 1,0 pour cent *m/m*, déterminé comme suit. Dans une fiole à bouchon rodé, introduisez 1,00 g de chloroforme (*m* g), puis 15,0 mL de *réactif nitrochromique R.* Bouchez, agitez vivement pendant 2 min, puis laissez au repos pendant 15 min. Ajoutez 100 mL d'*eau R* et 5 mL d'une solution d'*iodure de potassium R* à 200 g/L. Après 2 min, titrez l'excès d'iode par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* en présence de 1 mL de *solution d'amidon R* jusqu'à virage au vert clair ($n_1$ le nombre de millilitres de *thiosulfate de sodium 0,1 M* utilisés). Effectuez un titrage à blanc ($n_2$ le nombre de millilitres de *thiosulfate de sodium 0,1 M* utilisés).

Calculez la teneur pour cent en éthanol à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{(n_2 - n_1) \times 0,115}{m}$$

**Chloroforme acidifié.** *1018601.*

A 100 mL de *chloroforme R*, ajoutez 10 mL d'*acide chlorhydrique R.* Agitez, laissez reposer la solution et séparez les 2 phases.

**Chloroforme exempt d'éthanol.** *1018602.*

Agitez 200 mL de *chloroforme R* avec 4 fois 100 mL d'*eau R.* Desséchez sur 20 g de *sulfate de sodium anhydre R* pendant 24 h. Distillez le filtrat sur 10 g de *sulfate de sodium anhydre R.* Rejetez les 20 premiers millilitres du distillat. Préparez extemporanément.

**Chloroforme deutérié.** $C^2HCl_3$. ($M_r$ 120,4). *1025000.* [865-49-6]. Chloroforme-*d.* ($^2$H)-Chloroforme.

*Degré de deutériation* : au minimum 99,7 pour cent.

Liquide limpide, incolore, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'acétone et à l'éthanol à 96 pour cent. Le chloroforme deutérié peut être stabilisé sur feuilles d'argent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,51.

$n_D^{20}$ : environ 1,445.

Eb : environ 60 °C.

*Eau et oxyde de deutérium* : au maximum 0,05 pour cent.

**Chloroforme stabilisé avec de l'amylène.** $CHCl_3$. ($M_r$ 119,4). *1018700.*

Liquide limpide et incolore, peu soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

*Eau* : au maximum 0,05 pour cent.

*Résidu à l'évaporation* : au maximum 0,001 pour cent.

*Transmittance minimale* (*2.2.25*) déterminée en utilisant de l'*eau R* comme liquide de compensation : 50 pour cent à 255 nm, 80 pour cent à 260 nm, 98 pour cent à 300 nm.

*Teneur* : au minimum 99,8 pour cent de $CHCl_3$, déterminé par chromatographie en phase gazeuse.

**Chlorogénique (acide).** $C_{16}H_{18}O_9$. ($M_r$ 354,3). *1104700.* [327-97-9]. Acide (1*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3-[(3,4-dihydroxycinnamoyl)oxy]-1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylique.

Poudre cristalline ou aiguilles, blanches ou sensiblement blanches, facilement solubles dans l'eau bouillante, dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 pour cent.

$[\alpha]_D^{26}$ : environ – 35,2.

F : environ 208 °C.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications de l'identification A dans la monographie *Extrait sec titré de feuille de belladone (1294)* ; le chromatogramme ne présente qu'une seule bande principale.

*L'acide chlorogénique utilisé en chromatographie liquide satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications données dans la monographie *Feuille d'artichaut (1866).*

*Teneur* : au minimum 97,0 pour cent.

**3-Chloro-2-méthylaniline.** $C_7H_8ClN$. ($M_r$ 141,6). *1139400.* [87-60-5]. 6-Chloro-2-toluidine.

Non miscible à l'eau, peu soluble dans l'éthanol anhydre.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,171.

$n_D^{20}$ : environ 1,587.

F : environ 2 °C.

Eb : environ 115 °C.

**2-Chloro-*N*-(2,6-diméthylphényl)acétamide.** $C_{10}H_{12}ClNO$. ($M_r$ 197,7). *1168700.* [1131-01-7].

**2-Chloronicotinique (acide).** $C_6H_4ClNO_2$. ($M_r$ 157,6). *1157300.* [2942-59-8]. Acide 2-chloropyridine-3-carboxylique.

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

F : environ 177 °C.

*Teneur* : au minimum 95 pour cent.

**2-Chloro-4-nitroaniline.** $C_6H_5ClN_2O_2$. ($M_r$ 172,6). *1018800.* [121-87-9].

Poudre cristalline, jaune, facilement soluble dans le méthanol.

F : environ 107 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**5-Chloroquinoléin-8-ol.** $C_9H_6ClNO$. ($M_r$ 179,6). *1156900.* [130-16-5]. 5-Chlorooxine.

Assez soluble dans l'acide chlorhydrique dilué froid.

F : environ 123 °C.

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent.

**Chlorophénol.** $C_6H_5ClO$. ($M_r$ 128,6). *1018900.* [106-48-9]. 4-Chlorophénol.

Cristaux incolores ou presque incolores, peu solubles dans l'eau, très solubles dans l'éthanol à 96 pour cent et dans les solutions d'hydroxydes alcalins.

F : environ 42 °C.

**Chloroplatinique (acide).** $H_2Cl_6Pt,6H_2O$. ($M_r$ 517,9). *1019000.* [18497-13-7]. Hexachloroplatinate(IV) d'hydrogène hexahydraté.

*Teneur* : au minimum 37,0 pour cent *m/m* de platine ($A_r$ 195,1).

Cristaux ou masses cristallines rouge-brun, très solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Dosage.* Calcinez 0,200 g d'acide chloroplatinique à 900 ± 50 °C jusqu'à masse constante, laissez refroidir et pesez le résidu (platine).

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**3-Chloropropane-1,2-diol.** $C_3H_7ClO_2$. ($M_r$ 110,5). *1097600.* [96-24-2].

Liquide incolore, soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,322.

$n_D^{20}$ : environ 1,480.

Eb : environ 213 °C.

**4-Chlororésorcinol.** $C_6H_5ClO_2$. ($M_r$ 144,6). *1177700.* [95-88-5]. 4-Chlorobenzène-1,3-diol. 1,3-Dihydroxy-4-chlorobenzène.

F : 106 °C à 108 °C.

**5-Chlorosalicylique (acide).** $C_7H_5ClO_3$. ($M_r$ 172,6). *1019100.* [321-14-2].

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, soluble dans le méthanol.

F : environ 173 °C.

**Chlorothiazide.** *1112100.* [58-94-6].

Voir *Chlorothiazide (0385).*

**Chlorotriméthylsilane.** $C_3H_9ClSi$. ($M_r$ 108,6). *1019300.* [75-77-4].

Liquide limpide, incolore, fumant à l'air.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,86.

$n_D^{20}$ : environ 1,388.

Eb : environ 57 °C.

**Chlorpyriphos.** $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$. ($M_r$ 350,6). *1124400.* [2921-88-2].

Eb : environ 200 °C.

F : 42 °C à 44 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Chlorpyriphos-méthyle.** $C_7H_7Cl_3NO_3PS$. ($M_r$ 322,5). *1124500.* [5598-13-0].

F : 45 °C à 47 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Chlortétracycline (chlorhydrate de).** *1145500.*

Voir *Chlorhydrate de chlortétracycline (0173).*

**(5α)-Cholestane.** $C_{27}H_{48}$. ($M_r$ 372,7). *1167900.* [481-21-0].

Peu soluble dans l'éthanol anhydre.

F : environ 81 °C.

**Cholestérol.** *1019400.* [57-88-5].

Voir *Cholestérol (0993).*

**Choline (chlorure de).** $C_5H_{14}ClNO$. ($M_r$ 139,6). *1019500.* [67-48-1]. Chlorure de 2-(hydroxyéthyl)trimethylammonium.

Cristaux déliquescents, très solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Chlorure de Suxaméthonium (0248)* : déposez 5 µL d'une solution de chlorure de choline à 0,2 g/L dans du *méthanol R* ; le chromatogramme ne présente qu'une seule tache principale.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Chondroïtinase ABC.** *1162900.*

Enzyme de type pectine-lyase, sécrétée par *Flavobacterium heparinum*, clivant à la fois les disaccharides contenant du glucuronate, par exemple le sulfate de chondroïtine, et ceux contenant de l'iduronate, par exemple le sulfate de dermatan. Disponible en ampoules de 5-10 unités.

**Chondroïtinase AC.** *1163000.*

Enzyme de type pectine-lyase, sécrétée par *Flavobacterium heparinum*, ne clivant que les disaccharides contenant du glucuronate, par exemple le sulfate de chondroïtine. Disponible en ampoules de 5-10 unités.

**Chromazurol S.** $C_{23}H_{13}Cl_2Na_3O_9S$. ($M_r$ 605). *1019600.* [1667-99-8].

Schultz No. 841.

Colour Index No. 43825.
5-[(3-Carboxylato-5-méthyl-4-oxocyclohexa-2,5-diène-1-ylidène)(2,6-dichloro-3-sulfonatophényl)méthyl]-2-hydroxy-3-méthylbenzoate de trisodium.

Poudre noir-brun, soluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Chrome(III) (acétylacétonate de).** $C_{15}H_{21}CrO_6$. ($M_r$ 349,3). *1172900.* [21679-31-2]. (*OC*-6-11)-Tris(2,4-pentanedionato-κ*O*, κ*O′*)chrome.

**Chrome(III) (trichlorure de) hexahydraté.** $[Cr(H_2O)_4Cl_2]Cl,2H_2O$. ($M_r$ 266,5). *1104800.* [10060-12-5].

Poudre cristalline vert foncé, hygroscopique.

*Conservation* : à l'abri de l'humidité et des agents oxydants.

**Chrome (trioxyde de).** $CrO_3$. ($M_r$ 100,0). *1019900.* [1333-82-0].

Aiguilles ou granules rouge-brun foncé, déliquescents, très solubles dans l'eau.

*Conservation* : en récipient de verre étanche.

**Chromique et de potassium (sulfate).** $CrK(SO_4)_2,12H_2O$. ($M_r$ 499,4). *1019800.* [7788-99-0]. Alun de chrome.

Gros cristaux, rouge violacé ou noir, facilement solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Chromotrope II B.** $C_{16}H_9N_3Na_2O_{10}S_2$. ($M_r$ 513,4). *1020200.* [548-80-1].

Schultz No. 67.

Colour Index No. 16575.
4,5-Dihydroxy-3-(4-nitrophénylazo)naphtalène-2,7-disulfonate disodique.

Poudre brun-rouge, soluble dans l'eau en donnant une solution rouge-jaune, pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution de chromotrope II B.** *1020201.*

Solution à 0,05 g/L dans l'*acide sulfurique R*.

**Chromotropique (sel sodique d'acide).** $C_{10}H_6Na_2O_8S_2,2H_2O$. ($M_r$ 400,3). *1020300.* [5808-22-0].

Schultz No. 1136.
4,5-Dihydroxynaphtalène-2,7-disulfonate disodique dihydraté. 1,8-Dihydroxynaphtalène-3,6-disulfonate disodique dihydraté.

Poudre blanc-jaune, soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution acide chromotropique-acide sulfurique.** *1020302.*

Dissolvez 5 mg de *sel sodique d'acide chromotropique R* dans 10 mL d'un mélange de 9 mL d'*acide sulfurique R* et de 4 mL d'*eau R*.

**Solution de sel sodique d'acide chromotropique.** *1020301.*

Dissolvez 0,60 g de *sel sodique d'acide chromotropique R* dans 80 mL environ d'*eau R* et complétez à 100 mL avec le même solvant. Utilisez cette solution dans les 24 h.

**Chrysanthémine.** $C_{21}H_{21}ClO_{11}$. ($M_r$ 485,8). *1134800.* [7084-24-4]. Chlorure de cyanidine 3-*O*-glucoside. Chlorure de kuromanine. Chlorure de 2-(3,4-dihydroxyphényl)-3-(β-D-glucopyranosyl)oxy-5,7-dihydroxy-1-benzopyrylium.

Poudre cristalline brun-rouge, soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Absorbance* (*2.2.25*). Une solution à 0,01 g/L dans un mélange de 1 volume d'*acide chlorhydrique R* et de 999 volumes de *méthanol R* présente un maximum d'absorption à 528 nm.

**α-Chymotrypsine pour cartographie peptidique.** *1142400.*

α-Chymotrypsine hautement purifiée, ayant subi un traitement destiné à éliminer l'activité tryptique.

**Cinchonidine.** $C_{19}H_{22}N_2O$. ($M_r$ 294,4)). *1020400.* [485-71-2]. (*R*)-(Quinol-4-yl)[(2*S*,4*S*,5*R*)-5-vinylquinuclidin-2-yl]méthanol.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, très peu soluble dans l'eau et dans l'éther de pétrole, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$[\alpha]_D^{20}$ : – 105 à – 110, déterminé avec une solution à 50 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*.

F : environ 208 °C, avec décomposition.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Cinchonine.** $C_{19}H_{22}N_2O$. ($M_r$ 294,4). *1020500.* [118-10-5]. (*S*)-(Quinol-4-yl)[(2*R*,4*S*,5*R*)-5-vinylquinuclidin-2-yl]méthanol.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, très peu soluble dans l'eau, assez soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans le méthanol.

$[\alpha]_D^{20}$ : + 225 à + 230, déterminé avec une solution à 50 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*.

F : environ 263 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Cinéole.** $C_{10}H_{18}O$. ($M_r$ 154,3). *1020600.* [470-82-6]. 1,8-Cinéole. Eucalyptol. 1,8-Epoxy-*p*-menthane.

Liquide incolore, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol anhydre.

$d_{20}^{20}$ : 0,922 à 0,927.

$n_D^{20}$ : 1,456 à 1,459.

*Point de solidification* (*2.2.18*) : 0 °C à 1 °C.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : 174 °C à 177 °C.

*Phénol.* Agitez 1 g de cinéole avec 20 mL d'*eau R*. Laissez reposer et, à 10 mL de la phase aqueuse, ajoutez 0,1 mL de *solution de chlorure ferrique R1*. Il ne se développe pas de coloration violette.

*Essence de térébenthine.* Dissolvez 1 g de cinéole dans 5 mL d'*éthanol à 90 pour cent V/V R*. Ajoutez, goutte à goutte, de l'*eau de brome R* récemment préparée. Le virage au jaune, persistant pendant 30 min, ne nécessite pas plus de 0,5 mL d'*eau de brome R*.

*Résidu à l'évaporation* : au maximum 0,05 pour cent.

A 10,0 mL de cinéole, ajoutez 25 mL d'*eau R*, évaporez au bain-marie et desséchez le résidu à 100-105 °C jusqu'à masse constante.

*Le cinéole utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de menthe poivrée (0405)*.

*Solution à examiner.* Le cinéole à examiner.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**1,4-Cinéole.** $C_{10}H_{18}O$. ($M_r$ 154,3). *1142500.* [470-67-7]. 1-Méthyl-4-(1-méthyléthyl)-7-oxabicyclo[2.2.1]heptane. 1-Isopropyl-4-méthyl-7-oxabicyclo[2.2.1]heptane.

Liquide incolore.

$d_4^{20}$ : environ 0,900.

$n_D^{20}$ : environ 1,445.

Eb : environ 173 °C.

**Cinnamamide.** $C_9H_9NO$. ($M_r$ 147,2). *1154800.* [621-79-4]. (*E*)-3-Phénylprop-2-énamide.

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

F : environ 149 °C.

**Cinnamate de benzyle.** $C_{16}H_{14}O_2$. ($M_r$ 238,3). *1010900.* [103-41-3]. 3-Phénylprop-2-énoate de benzyle.

Cristaux jaunâtres ou incolores, pratiquement insolubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 39 °C.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Baume du Pérou (0754)* : déposez 20 µL d'une solution de cinnamate de benzyle à 3 g/L dans l'*acétate d'éthyle R*. Après pulvérisation et chauffage, le chromatogramme présente une bande principale dont le $R_F$ est d'environ 0,6.

***trans*-Cinnamique (acide).** $C_9H_8O_2$. ($M_r$ 148,2). *1159200.* [140-10-3]. Acide *trans*-3-phénylacrylique. Acide (2*E*)-3-phénylprop-2-énoïque.

Cristaux incolores, très peu solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : 133 °C.

**Cinnamique (aldéhyde).** $C_9H_8O$. ($M_r$ 132,2). *1020700.* [104-55-2]. 3-Phénylpropénal.

Liquide huileux, de coloration jaunâtre ou jaune-vert, peu soluble dans l'eau, très soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : 1,048 à 1,051.

$n_D^{20}$ : environ 1,620.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

***trans*-Cinnamique (aldéhyde).** $C_9H_8O$. ($M_r$ 132,2). *1124600.* [14371-10-9]. (*E*)-3-Phénylprop-2-énal.

*L'aldéhyde trans-cinnamique utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de cannelier (1496)*.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Cinnamyle (acétate de).** $C_{11}H_{12}O_2$. ($M_r$ 176,2). *1124700.* [103-54-8]. Acétate de 3-phénylprop-2-én-1-yl.

$n_D^{20}$ : environ 1,542.

Eb : environ 262 °C.

*L'acétate de cinnamyle utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de cannelier (1496)*.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Citral.** $C_{10}H_{16}O$. ($M_r$ 152,2). *1020800.* [5392-40-5]. Mélange de (2*E*)- et (2*Z*)-3,7-diméthylocta-2,6-diénal.

Liquide jaune clair, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent et au propylène glycol.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) en utilisant une plaque recouverte de *gel de silice* $GF_{254}$ *R* : déposez sur la plaque 10 µL d'une solution de citral à 1 g/L dans le *toluène R*. Développez sur un parcours de 15 cm avec un mélange de 15 volumes d'*acétate d'éthyle R* et de 85 volumes de *toluène R*. Laissez sécher la plaque à l'air et examinez en lumière ultraviolette à 254 nm. Le chromatogramme présente une seule tache principale.

*Le citral utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*), selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de citronnelle (1609)*.

*Teneur* (néral + géranial) : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Citrique (acide).** *1021000.* [5949-29-1].

Voir *Acide citrique monohydraté (0456)*.

*L'acide citrique utilisé dans l'essai du fer satisfait également à l'essai suivant.*

Dissolvez 0,5 g d'acide citrique dans 10 mL d'*eau R* et ajoutez 0,1 mL d'*acide thioglycolique R*. Mélangez, alcalinisez avec de l'*ammoniaque R* et complétez à 20 mL avec de l'*eau R*. Il ne se développe pas de coloration rose.

**Citrique (acide) anhydre.** *1021200.* [77-92-9].

Voir *Acide citrique anhydre (0455).*

**Citron (huile essentielle de).** *1101700.*

Voir *Huile essentielle de citron (0620).*

**Citronellal.** $C_{10}H_{18}O$. ($M_r$ 154,3). *1113300.* [106-23-0]. 3,7-Diméthyl-6-octénal.

Liquide très peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : 0,848 à 0,856.

$n_D^{20}$ : environ 1,446.

*Le citronellal utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage*. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*), selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de citronnelle (1609).*

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Citronellol.** $C_{10}H_{20}O$. ($M_r$ 156,3). *1134900.* [106-22-9]. 3,7-Diméthyloct-6-én-1-ol.

Liquide limpide, incolore, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : 0,857.

$n_D^{20}$ : 1,456.

Eb : 220 °C à 222 °C.

*Le citronellol utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage*. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de citronnelle (1609).*

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

*Conservation* : en récipient étanche, à l'abri de la lumière.

**Citronellyle (acétate de).** $C_{12}H_{22}O_2$. ($M_r$ 198,3). *1135000.* [150-84-5]. Acétate de 3,7-diméthyl-6-octén-1-yle.

$d_{20}^{20}$ : 0,890.

$n_D^{20}$ : 1,443.

Eb : 229 °C.

*L'acétate de citronellyle utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage*. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de citronnelle (1609).*

*Teneur* : au minimum 97,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

*Conservation* : en récipient étanche, à l'abri de la lumière.

**Citroptène.** $C_{11}H_{10}O_4$. ($M_r$ 206,2). *1021300.* [487-06-9]. Limettine. 5,7-Diméthoxy-2*H*-1-benzopyran-2-one.

Cristaux en aiguilles, pratiquement insolubles dans l'eau, et dans l'éther de pétrole, facilement solubles dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 145 °C.

*Chromatographie*. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) en utilisant une plaque recouverte de *gel de silice $GF_{254}$ R* : déposez sur la plaque 10 µL d'une solution de citroptène à 1 g/L dans le *toluène R*. Développez sur un parcours de 15 cm avec un mélange de 15 volumes d'*acétate d'éthyle R* et de 85 volumes de *toluène R*. Laissez sécher la plaque à l'air et examinez en lumière ultraviolette à 254 nm. Le chromatogramme présente une seule tache principale.

**Clobétasol (propionate de).** $C_{25}H_{32}ClFO_5$. ($M_r$ 467,0). *1097700.* [25122-46-7]. 17-Propionate de 21-chloro-9-fluoro-11β,17-dihydroxy-16β-méthylprégna-1,4-diène-3,20-dione.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et l'acétone.

$[\alpha]_D^{20}$ : environ + 104 (dans le dioxane).

F : environ 196 °C.

**Cobalt (chlorure de).** $CoCl_2,6H_2O$. ($M_r$ 237,9). *1021600.* [7791-13-1].

Poudre cristalline rouge ou cristaux rouge foncé, très solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Cobalt (nitrate de).** $Co(NO_3)_2,6H_2O$. ($M_r$ 291,0). *1021700.* [10026-22-9].

Petits cristaux grenat, très solubles dans l'eau.

**Codéine.** *1021800.* [6059-47-8].

Voir *Codéine (0076).*

**Codéine (phosphate de).** *1021900.* [52-28-8].

Voir *Phosphate de codéine hémihydraté (0074).*

**Colonne concentrique pour CPG.** *1135100.*

Système disponible dans le commerce et constitué de 2 tubes disposés concentriquement. Le tube extérieur est rempli de tamis moléculaires et le tube intérieur d'un mélange de polymères poreux. Son domaine principal d'application est la séparation des gaz.

**Colza (huile de).** *1074600.*

Voir *Huile de colza raffinée (1369).*

**Cortisone.** $C_{21}H_{28}O_5$. ($M_r$ 360,4). *1175000.* [53-06-5].

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent.

F : 223-228 °C.

**Cortisone (acétate de).** *1097800.* [50-04-4].

Voir *Acétate de cortisone (0321).*

**Coumaphos.** $C_{14}H_{16}ClO_5PS$. ($M_r$ 362,8). *1124800.* [56-72-4].

F : 91 °C à 92 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans l'isooctane) peut être utilisée.

**Coumarine.** $C_9H_6O_2$. ($M_r$ 146,1). *1124900.* [91-64-5]. 2*H*-Chromén-2-one. 2*H*-1-Benzopyran-2-one.

Poudre cristalline incolore ou cristaux orthorhombiques ou rectangulaires, très solubles dans l'eau bouillante, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent. La coumarine se dissout dans les solutions d'hydroxydes alcalins.

F : 68 °C à 70 °C.

*La coumarine utilisée en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage*. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de cannelier (1496).*

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

***o*-Coumarique (acide).** $C_9H_8O_3$. ($M_r$ 164,2). *1157400.* [614-60-8]. Acide (*E*)-2-hydroxycinnamique. Acide (2*E*)-3-(2-hydroxyphényl)prop-2-énoïque.

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

F : environ 217 °C.

4. Réactifs

***p*-Coumarique (acide).** $C_9H_8O_3$. ($M_r$ 164,2). *1157500.* [7400-08-0]. Acide 4-hydroxycinnamique. Acide 3-(4-hydroxyphényl)-prop-2-énoïque.

Aiguilles blanches ou sensiblement blanches, pratiquement insolubles dans l'eau, solubles dans l'acétone et dans le méthanol.

F : 214 °C à 217 °C.

*L'acide p-coumarique utilisé dans le dosage de la Feuille d'ortie (1897) satisfait également aux essais suivants.*

*Perte à la dessiccation* (*2.2.32*) : au maximum 5,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 0,200 g d'acide *p*-coumarique.

*Dosage*. Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications données dans la monographie *Feuille d'ortie (1897)*.

*Teneur* : au minimum 95 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Crésol.** $C_7H_8O$. ($M_r$ 108,1). *1022700.* [95-48-7]. *o*-Crésol. 2-Méthylphénol.

Cristaux ou liquide en surfusion, se colorant progressivement à la lumière et à l'air, miscibles à l'éthanol anhydre, solubles dans environ 50 parties d'eau, solubles dans les solutions d'hydroxydes alcalins.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,05.

$n_D^{20}$ : 1,540 à 1,550.

Eb : environ 190 °C.

*Point de solidification (2.2.18)* : au minimum 30,5 °C.

*Résidu à l'évaporation* : au maximum 0,1 pour cent *m/m*, déterminé par évaporation au bain-marie et dessiccation à l'étuve à 100-105 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière, de l'humidité et de l'oxygène.

Distillez avant emploi.

***m*-Crésol.** *1177100.* [108-39-4].

Voir *métacrésol (2077)*.

***p*-Crésol.** $C_7H_8O$. ($M_r$ 108,1). *1153100.* [106-44-5]. 4-Méthylphénol.

Cristaux ou masse cristalline blanche ou sensiblement blanche ou incolore

$d_{20}^{20}$ : environ 1,02.

Eb : environ 202 °C.

**Cuivre.** Cu. ($A_r$ 63,55). *1022100.* [7440-50-8].

Lames décapées, tournures, fil ou poudre. Métal pur de qualité électrolytique.

**Cuivre (acétate de).** $C_4H_6CuO_4,H_2O$. ($M_r$ 199,7). *1022200.* [142-71-2].

Poudre bleu-vert ou cristaux, facilement solubles dans l'eau bouillante, solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent, peu solubles dans le glycérol à 85 pour cent.

**Cuivre (chlorure de).** $CuCl_2,2H_2O$. ($M_r$ 170,5). *1023000.* [10125-13-0]. Dichlorure de cuivre dihydraté.

Poudre ou cristaux vert-bleu, déliquescents à l'air humide, efflorescents en atmosphère sèche, facilement solubles dans l'eau, dans l'éthanol à 96 pour cent et dans le méthanol, assez solubles dans l'acétone.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Cuivre (édétate de), solution d'.** *1022300.*

A 2 mL d'une solution d'*acétate de cuivre R* à 20 g/L, ajoutez 2 mL d'*édétate de sodium 0,1 M* et complétez à 50 mL avec de l'*eau R*.

**Cuivre (nitrate de).** $Cu(NO_3)_2,3H_2O$. ($M_r$ 241,6). *1022400.* [10031-43-3]. Dinitrate de cuivre trihydraté.

Cristaux bleu foncé, hygroscopiques, très solubles dans l'eau, en donnant une solution à forte réaction acide, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent et dans l'acide nitrique dilué.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Cuivre (sulfate de).** $CuSO_4,5H_2O$. ($M_r$ 249,7). *1022500.* [7758-99-8]. Sulfate de cuivre pentahydraté.

Poudre bleue, ou cristaux bleu foncé, lentement efflorescents, très solubles dans l'eau, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution de sulfate de cuivre.** *1022501.*

Solution à 125 g/L.

**Cupri-citrique (solution).** *1023100.*

Dissolvez 25 g de *sulfate de cuivre R*, 50 g d'*acide citrique R* et 144 g de *carbonate de sodium anhydre R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000 mL avec le même solvant.

**Cupri-citrique (solution) R1.** *1023200.*

Dissolvez 25 g de *sulfate de cuivre R*, 50 g d'*acide citrique R* et 144 g de *carbonate de sodium anhydre R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000 mL avec le même solvant.

La solution doit être ajustée pour répondre aux spécifications suivantes.

a) A 25,0 mL du réactif, ajoutez 3 g d'*iodure de potassium R* et 25 mL d'une solution d'*acide sulfurique R* à 25 pour cent *m/m*, ajoutés avec précaution et par petites quantités. Titrez par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* en présence de 0,5 mL de *solution d'amidon R*, ajouté en fin de titrage.

24,5 mL à 25,5 mL de *thiosulfate de sodium 0,1 M* sont utilisés dans le titrage.

b) Prélevez 10,0 mL de réactif, complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R* et mélangez. Prélevez 10,0 mL de cette solution, ajoutez 25,0 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* et chauffez au bain-marie pendant 1 h. Refroidissez, ramenez au volume initial avec de l'*eau R* et titrez par l'*hydroxyde de sodium 0,1 M* en présence de 0,1 mL de *solution de phénolphtaléine R1*.

5,7 mL à 6,3 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* sont utilisés dans le titrage.

c) Prélevez 10,0 mL de réactif, complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R* et mélangez. Titrez 10,0 mL de cette solution par l'*acide chlorhydrique 0,1 M* en présence de 0,1 mL de *solution de phénolphtaléine R1*.

6,0 mL à 7,5 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* sont utilisés dans le titrage.

**Cupriéthylènediamine (hydroxyde de), solution d'.** *3008700.* [14552-35-3].

Le rapport molaire entre l'éthylènediamine et le cuivre est de 2,00 ± 0,04. Cette solution est disponible dans le commerce.

**Cupri-tartrique (solution).** *1023300.*

*Solution A.* Dissolvez 34,6 g de *sulfate de cuivre R* dans de l'*eau R* et complétez à 500 mL avec le même solvant.

*Solution B.* Dissolvez 173 g de *tartrate de sodium et de potassium R* et 50 g d'*hydroxyde de sodium R* dans 400 mL d'*eau R*. Chauffez à ébullition et complétez, après refroidissement, à 500 mL avec de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R*.

Mélangez des volumes égaux des 2 solutions au moment de l'emploi.

**Cupri-tartrique (solution) R2.** *1023302.*

A 50 mL de *solution de carbonate de sodium R1*, ajoutez 1 mL d'une solution à 5 g/L de *sulfate de cuivre R* et à 10 g/L de *tartrate de potassium R*. Préparez extemporanément.

**Cupri-tartrique (solution) R3.** *1023303.*

Préparez une solution contenant 10 g/L de *sulfate de cuivre R* et 20 g/L de *tartrate de sodium R*. A 1,0 mL de solution, ajoutez 50 mL de *solution de carbonate de sodium R2.* Préparez extemporanément.

**Cupri-tartrique (solution) R4.** *1023304.*

*Solution A.* Solution de *sulfate de cuivre R* à 150 g/L.

*Solution B.* Dissolvez 2,5 g de *carbonate de sodium anhydre R*, 2,5 g de *tartrate de sodium et de potassium R*, 2,0 g de *bicarbonate de sodium R* et 20,0 g de *sulfate de sodium anhydre R* dans de l'*eau R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

Mélangez 1 volume de solution A et 25 volumes de solution B immédiatement avant emploi.

**Curcumine.** $C_{21}H_{20}O_6$. ($M_r$ 368,4). *1023500.* [458-37-7]. 1,7-Bis(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)hepta-1,6-diène-3,5-dione.

Poudre cristalline, brun orangé, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'acide acétique glacial.

F : environ 183 °C.

**Cyanoacétique (acide).** $C_3H_3NO_2$. ($M_r$ 85,1). *1097900.* [372-09-8].

Cristaux blancs ou blanc-jaune, hygroscopiques, très solubles dans l'eau.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Cyanocobalamine.** *1023600.* [68-19-9].

Voir *Cyanocobalamine (0547).*

**Cyanogène (bromure de), solution de.** *1023700.* [506-68-3].

Ajoutez, goutte à goutte et en refroidissant, du *thiocyanate d'ammonium 0,1 M* à de l'*eau de brome R* jusqu'à disparition de la coloration jaune. Préparez extemporanément.

**Cyanoguanidine.** $C_2H_4N_4$. ($M_r$ 84,1). *1023800.* [461-58-5]. Dicyandiamide. 1-Cyanoguanidine.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, assez soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent, pratiquement insoluble dans le chlorure de méthylène.

F : environ 210 °C.

**α-Cyclodextrine.** $C_{36}H_{60}O_{30}$. ($M_r$ 972). *1176200.* [10016-20-3]. Cyclohexakis-(1→4)-(α-D-glucopyranosyl). Cyclomaltohexaose. Alfadex.

**β-Cyclodextrine modifiée pour chromatographie chirale.** *1154600.*

30 pour cent de 2,3-di-*O*-éthyl-6-*O*-*tert*-butyldiméthyl-silyl-β-cyclodextrine dissoute dans du *poly(diméthyl)(85)-(diphényl)(15)siloxane R.*

**β-Cyclodextrine modifiée pour chromatographie chirale R1.** *1160700.*

30 pour cent de 2,3-di-*O*-acétyl-6-*O*-*tert*-butylsilyl-β-cyclodextrine dissoute dans du *poly(diméthyl)(85)(diphényl)(15)siloxane R.*

**Cyclohexane.** $C_6H_{12}$. ($M_r$ 84,2). *1023900.* [110-82-7].

Liquide limpide et incolore, inflammable, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible aux solvants organiques.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,78.

Eb : environ 80,5 °C.

*Le cyclohexane utilisé en spectrophotométrie satisfait également aux exigences suivantes.*

*Transmittance minimale* (*2.2.25*) déterminée en utilisant l'*eau R* comme liquide de compensation : 45 pour cent à 220 nm, 70 pour cent à 235 nm, 90 pour cent à 240 nm, 98 pour cent à 250 nm.

**Cyclohexane R1.** *1023901.*

Satisfait aux spécifications du *cyclohexane R* et également à l'essai suivant : la fluorescence, mesurée à 460 nm sous illumination par un faisceau de lumière excitatrice à 365 nm, n'est pas plus intense que celle d'une solution contenant 0,002 ppm de *quinine R* dans l'*acide sulfurique 0,05 M.*

**Cyclohexylamine.** $C_6H_{13}N$. ($M_r$ 99,2). *1024000.* [108-91-8].

Liquide incolore, soluble dans l'eau, miscible aux solvants organiques usuels.

$n_D^{20}$ : environ 1,460.

Eb : 134 °C à 135 °C.

**Cyclohexylènedinitrilotétraacétique (acide).** $C_{14}H_{22}N_2O_8,H_2O$. ($M_r$ 364,4). *1024100.* Acide trans-cyclohexylène-1,2-dinitrilo-*N,N,N′,N′*-tétraacétique.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche.

F : environ 204 °C.

**Cyclohexylméthanol.** $C_7H_{14}O$. ($M_r$ 114,2). *1135200.* [100-49-2]. Cyclohexylcarbinol.

Liquide à légère odeur de camphre, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent

$n_D^{25}$ : environ 1,464.

Eb : environ 185 °C.

**3-Cyclohexylpropionique (acide).** $C_9H_{16}O_2$. ($M_r$ 156,2). *1119200.* [701-97-3].

Liquide limpide.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,998.

$n_D^{20}$ : environ 1,4648.

Eb : environ 130 °C.

**Cyhalothrine.** $C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$. ($M_r$ 449,9). *1125000.* [91465-08-6].

Eb : 187 °C à 190 °C.

F : environ 49 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/μL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

***p*-Cymène.** $C_{10}H_{14}$. ($M_r$ 134,2). *1113400.* [99-87-6]. 1-Isopropyl-4-méthylbenzène.

Liquide incolore à odeur de carotte, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,858.

$n_D^{20}$ : environ 1,4895.

Eb : 175 °C à 178 °C.

*Le p-cymène utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de menthe poivrée (0405).*

*Solution à examiner.* Le *p*-Cymène à examiner.

*Teneur* : au minimum 96,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Cynarine.** $C_{25}H_{24}O_{12}$. ($M_r$ 516,4). *1159300.* [30964-13-7]. Acide (1α,3α,4α,5β)-1,3-bis[[3-(3,4-dihydroxyphényl)-1-oxo-2-propényl]oxy]-4,5-dihydroxycyclohexanecarboxylique.

Masse amorphe blanche ou sensiblement blanche, inodore.

**Cyperméthrine.** $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$. ($M_r$ 416,3). *1125100.* [52315-07-8].

Eb : 170 °C à 195 °C.

F : 60 °C à 80 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/μL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**L-Cystéine.** $C_3H_7NO_2S$. ($M_r$ 121,1). *1024200.* [52-90-4].

Poudre facilement soluble dans l'eau, dans l'éthanol à 96 pour cent et dans l'acide acétique, pratiquement insoluble dans l'acétone.

**Cystéine (chlorhydrate de).** *1024300.* [7048-04-6].

Voir *Chlorhydrate de cystéine monohydraté (0895).*

**L-Cystine.** $C_6H_{12}N_2O_4S_2$. ($M_r$ 240,3). *1024400.* [56-89-3].

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent. La L-cystine se dissout dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins.

$[\alpha]_D^{20}$ : – 218 à – 224, déterminé dans l'*acide chlorhydrique 1 M.*

F : 250 °C, avec décomposition.

**Cytosine.** $C_4H_5N_3O$. ($M_r$ 111,1). *1160800.* [71-30-7].

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent.

**Daidzéine.** $C_{15}H_{10}O_4$. ($M_r$ 254,2). *1178400.* [486-66-8]. 7-Hydroxy-3-(4-hydroxyphényl)-4*H*-1-benzopyran-4-one.

**Daidzine.** $C_{21}H_{20}O_9$. ($M_r$ 416,4). *1178300.* [552-66-9]. 7-(β-D-Glucopyranosyloxy)-3-(4-hydroxyphényl)-4*H*-1-benzopyran-4-one.

**Dantrone.** $C_{14}H_8O_4$. ($M_r$ 240,2). *1024500.* [117-10-2]. 1,8-Dihydroxyanthraquin-9(10*H*)-one. 1,8-Dihydroxyanthracène-9,10-dione.

Poudre cristalline orange, pratiquement insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, soluble dans les solutions d'hydroxydes alcalins.

F : environ 195 °C.

*La dantrone utilisée dans le dosage des acides sesquiterpéniques de la Racine de valériane (0453) satisfait également aux essais suivants.*

$A_{1\,cm}^{1\%}$ : 355 à 375, déterminé à 500 nm dans l'*hydroxyde de potassium 1 M.*

*Dosage.* Chromatographie liquide (*2.2.29*), selon les indications données dans la monographie *Racine de valériane (0453),* à la concentration de la solution témoin.

*Teneur* : au minimum 95 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

***o,p′*-DDD.** $C_{14}H_{10}Cl_4$. ($M_r$ 320,0). *1125200.* [53-19-0]. 1-(2-Chlorophényl)-1-(4-chlorophényl)-2,2-dichloroéthane.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/μL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

***p,p′*-DDD.** $C_{14}H_{10}Cl_4$. ($M_r$ 320,0). *1125300.* [72-54-8]. 1,1-Bis(4-chlorophényl)-2,2-dichloroéthane.

Eb : environ 193 °C.

F : environ 109 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/μL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

***o,p′*-DDE.** $C_{14}H_8Cl_4$. ($M_r$ 318,0). *1125400.* [3424-82-6]. 1-(2-Chlorophényl)-1-(4-chlorophényl)-2,2-dichloroéthylène.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/μL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

***p,p′*-DDE.** $C_{14}H_8Cl_4$. ($M_r$ 318,0). *1125500.* [72-55-9]. 1,1-Bis(4-chlorophényl)-2,2-dichloroéthylène.

Eb : 316 °C à 317 °C.

F : 88 °C à 89 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/μL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

***o,p′*-DDT.** $C_{14}H_9Cl_5$. ($M_r$ 354,5). *1125600.* [789-02-6]. 1-(2-Chlorophényl)-1-(4-chlorophényl)-2,2,2-trichloroéthane.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/μL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

***p,p′*-DDT.** $C_{14}H_9Cl_5$. ($M_r$ 354,5). *1125700.* [50-29-3]. 1,1-Bis(4-chlorophényl)-2,2,2-trichloroéthane.

Eb : environ 260 °C.

F : 108 °C à 109 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/μL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Décanal.** $C_{10}H_{20}O$. ($M_r$ 156,3). *1149200.* [112-31-2]. Aldéhyde décylique.

Liquide huileux incolore à odeur caractéristique d'orange, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans le chloroforme.

$d_4^{20}$ : 0,825 à 0,829.

$n_D^{20}$ : 1,420 à 1,430.

Eb : 207 °C à 209 °C.

*Le décanal utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle d'orange douce (1811).*

*Teneur* : au minimum 99 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Décane.** $C_{10}H_{22}$. ($M_r$ 142,3). *1024600.* [124-18-5].

Liquide incolore, pratiquement insoluble dans l'eau.

$n_D^{20}$ : environ 1,411.

Eb : environ 174 °C.

**Décanol.** $C_{10}H_{22}O$. ($M_r$ 158,3). *1024700.* [112-30-1]. Alcool *n*-décylique.

Liquide visqueux, se solidifiant à environ 6 °C, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$n_D^{20}$ : environ 1,436.

Eb : environ 230 °C.

**Deltaméthrine.** $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$. ($M_r$ 505,2). *1125800.* [52918-63-5].

Eb : environ 300 °C.

F : environ 98 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/μL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Déméclocycline (chlorhydrate de).** *1145600.*

Voir *Chlorhydrate de déméclocycline (0176).*

**Déméthylflumazénil.** $C_{14}H_{12}FN_3O_3$. ($M_r$ 289,3). *1149300.* [79089-72-8]. 8-Fluoro-6-oxo-5,6-dihydro-4*H*-imidazo[1,5-*a*][1,4]benzodiazépine-3-carboxylate d'éthyle.

Aiguilles incolores, solubles dans le diméthylsulfoxyde et dans le méthanol chaud.

F : environ 288 °C.

**2-Désoxy-D-ribose.** $C_5H_{10}O_4$. ($M_r$ 134,1). *1163900.* [533-67-5]. Thyminose. 2-Désoxy-D-*érythro*-pentose.

**4-Désoxypyridoxine (chlorhydrate de).** $C_8H_{12}NO_2Cl$. ($M_r$ 189,6). *1175500.* [148-51-6]. 5-(Hydroxyméthyl)-2,4-diméthylpyridin-3-ol.

**2′-Désoxyuridine.** $C_9H_{12}N_2O_5$. ($M_r$ 228,2). *1024800.* [951-78-0]. 1-(2-Désoxy-β-d-*érythro*-pentofuranosyl)-1*H*,3*H*-pyrimidine-2,4-dione.

F : environ 165 °C.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Idoxuridine (0669)* : déposez 5 μL d'une solution de 2′-désoxyuridine à 0,25 g/L ; le chromatogramme présente une seule tache principale.

**Deutérium (chlorure de).** $^2HCl$. ($M_r$ 37,47). *1178800.* [7698-05-7]. Acide chlorhydrique deutérié.

Gaz.

*Degré de deutériation* : au minimum 99 pour cent.

*Attention* : *toxique*.

**Solution de chlorure de deutérium.** *1178801.*

Diluez 1 mL de *chlorure de deutérium R* à 38 pour cent *m/m* dans 5 mL d'*oxyde de deutérium R*.

**Deutérium (oxyde de).** $^2H_2O$. ($M_r$ 20,03). *1025300.* [7789-20-0]. Eau deutériée.

*Degré de deutériation* : au minimum 99,7 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,11.

$n_D^{20}$ : environ 1,328.

Eb : environ 101 °C.

**Deutérium (oxyde de) R1.** $^2H_2O$. ($M_r$ 20,03). *1025301.* [7789-20-0]. Eau deutériée.

*Degré de deutériation* : au minimum 99,95 pour cent.

**Dextrane réticulé pour chromatographie R2.** *1025500.*

Se présente sous forme de billes et possède une zone de fractionnement appropriée à la séparation de peptides et de protéines de masse moléculaire relative de $15 \times 10^2$ à $30 \times 10^3$. Les billes à l'état sec ont un diamètre de 20-80 µm.

**Dextrane réticulé pour chromatographie R3.** *1025600.*

Se présente sous forme de billes et possède une zone de fractionnement appropriée à la séparation de peptides et de protéines de masse moléculaire relative de $4 \times 10^3$ à $15 \times 10^4$. Les billes à l'état sec ont un diamètre de 40-120 µm.

**3,3′-Diaminobenzidine (tétrachlorhydrate de).** $C_{12}H_{18}Cl_4N_4,2H_2O$. ($M_r$ 396,1). *1098000.* [7411-49-6]. 3,3′,4,4′-Biphényltétramine.

Poudre sensiblement blanche ou faiblement rose, soluble dans l'eau.

Eb : environ 280 °C, avec décomposition.

**Diammonium (2,2′-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) de).** $C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$. ($M_r$ 548,7). *1153000.* [30931-67-0]. ABTS. 2,2′-(Diazanediylidène)bis[3-éthyl-2,3-dihydrobenzothiazole-6-sulfonate] de diammonium.

Substrat chromogène convenant pour utilisation dans les procédures ELISA.

Comprimés verts, facilement solubles dans l'eau.

pH (*2.2.3*) : 4,2 à 5,8 pour une solution à 0,1 g/L.

**Diazinon.** $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$. ($M_r$ 304,3). *1125900.* [333-41-5].

Eb : environ 306 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans l'isooctane) peut être utilisée.

**Diazobenzènesulfonique (acide), solution d' R1.** *1026500.*

Dissolvez 0,9 g d'*acide sulfanilique R* dans un mélange de 30 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et de 70 mL d'*eau R*. A 3 mL de cette solution, ajoutez 3 mL d'une *solution de nitrite de sodium R* à 50 g/L. Refroidissez dans de l'eau glacée pendant 5 min, ajoutez 12 mL de la solution de nitrite de sodium, refroidissez de nouveau, complétez à 100 mL avec de l'*eau R* et conservez le réactif dans de l'eau glacée. Préparez extemporanément, puis attendez 15 min avant l'utilisation.

**Dibutylamine.** $C_8H_{19}N$. ($M_r$ 129,3). *1126000.* [111-92-2]. *N*-Butylbutan-1-amine.

Liquide incolore.

$n_D^{20}$ : environ 1,417.

Eb : environ 159 °C.

**Dibutylammonium (phosphate de) pour appariement d'ions.** *1168800.*

Solution incolore, contenant 10 pour cent à 15 pour cent *V/V* de di-*n*-butylamine et 12 pour cent à 17 pour cent *V/V* d'acide phosphorique dans l'eau, appropriée pour l'appariement d'ions en chromatographie liquide.

**Dibutyle (phtalate de).** $C_{16}H_{22}O_4$. ($M_r$ 278,3). *1026800.* [84-74-2]. Benzène-1,2-dicarboxylate de dibutyle.

Liquide huileux, limpide, incolore ou légèrement coloré, très peu soluble dans l'eau, miscible à l'acétone et à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : 1,043 à 1,048.

$n_D^{20}$ : 1,490 à 1,495.

**Dicarboxidine (chlorhydrate de).** $C_{20}H_{26}Cl_2N_2O_6$. ($M_r$ 461,3). *1026900.* [56455-90-4]. Dichlorhydrate de l'acide 4,4′-[(4,4′-diaminobiphényl-3,3′-diyl)dioxy]dibutanoïque.

**Dichlofenthion.** $C_{10}H_{13}Cl_2O_3PS$. ($M_r$ 315,2). *1126100.* [97-17-6].

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Dichloracétique (acide).** $C_2H_2Cl_2O_2$. ($M_r$ 128,9). *1027000.* [79-43-6].

Liquide incolore, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,566.

$n_D^{20}$ : environ 1,466.

Eb : environ 193 °C.

**Solution d'acide dichloracétique.** *1027001.*

Diluez 67 mL d'*acide dichloracétique R* dans de l'*eau R* et complétez à 300 mL avec de l'*eau R*. Ajoutez de l'*ammoniaque R* jusqu'à neutralité au *papier tournesol bleu R*. Refroidissez, ajoutez 33 mL d'*acide dichloracétique R* et complétez à 600 mL avec de l'*eau R*.

**Dichloréthane.** *1036000.* [107-06-2].

Voir *Ethylène (chlorure d') R*.

**3,5-Dichloroaniline.** $C_6H_5Cl_2N$. ($M_r$ 162,0). *1177800.* [626-43-7]. 3,5-dichlorophénylamine.

F : 46 °C à 52 °C.

**Dichlorobenzène.** $C_6H_4Cl_2$. ($M_r$ 147,0). *1027100.* [95-50-1]. 1,2-Dichlorobenzène.

Liquide incolore et huileux, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol anhydre.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,31.

Eb : environ 180 °C.

**2,3-Dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone.** $C_8Cl_2N_2O_2$. ($M_r$ 227,0). *1153600.* [84-58-2]. 4,5-Dichloro-3,6-dioxo-cyclohexa-1,4-diène-1,2-dicarbonitrile.

Cristaux jaunes ou oranges, solubles dans le dioxane et dans l'acide acétique, peu solubles dans le chlorure de méthylène. La substance se décompose dans l'eau.

F : environ 214 °C.

*Conservation* : à une température de 2 °C à 8 °C.

**(*S*)-3,5-Dichloro-2,6-dihydroxy-*N*-[(1-éthylpyrrolidin-2-yl)méthyl]benzamide (bromhydrate de).** $C_{14}H_{19}BrCl_2N_2O_3$. ($M_r$ 414,1). *1142600.* [113310-88-6].

Poudre blanche ou sensiblement blanche, cristalline.

$[\alpha]_D^{22}$ : + 11,4, déterminé avec une solution à 15,0 g/L dans l'*éthanol anhydre R*.

F : environ 212 °C.

**Dichlorofluorescéine.** $C_{20}H_{10}Cl_2O_5$. ($M_r$ 401,2). *1027200.* [76-54-0]. 2,7-Dichlorofluorescéine. Acide 2-(2,7-dichloro-6-hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthén-9-yl)benzoïque.

Poudre brun-jaune ou jaune orangé, peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins en donnant une solution à fluorescence vert-jaune.

**Dichlorométhane.** *1055900.* [75-09-2].

Voir *Méthylène (chlorure de) R*.



4. Réactifs

**2,6-Dichlorophénol.** $C_6H_4Cl_2O$. ($M_r$ 163,0). *1177600.* [87-65-0].
F : 64 °C à 66 °C.

**Dichlorophénolindophénol (sel sodique de).** $C_{12}H_6Cl_2NNaO_2,2H_2O$. ($M_r$ 326,1). *1027300.* [620-45-1]. Dérivé sodique de la 2,6-dichloro-*N*-(4-hydroxyphényl)-1,4-benzoquinone monoimine dihydraté.

Poudre vert foncé, facilement soluble dans l'eau et dans l'éthanol anhydre. La solution aqueuse est bleu foncé ; acidifiée, elle se colore en rose.

**Solution étalon de dichlorophénolindophénol.** *1027301.*
Dissolvez 50,0 mg de *sel sodique de dichlorophénol-indophénol R* dans 100,0 mL d'*eau R* et filtrez.

*Dosage.* Dissolvez 20,0 mg d'*acide ascorbique R* dans 10 mL d'une solution récemment préparée d'*acide métaphosphorique R* à 200 g/L et complétez à 250,0 mL avec de l'*eau R*. Titrez rapidement 5,0 mL par la solution étalon de dichlorophénolindophénol ajoutée à l'aide d'une microburette graduée en 1/100 de millilitre, jusqu'à coloration rose persistant pendant 10 s, le titrage ne prenant pas plus de 2 min. Diluez la solution de dichlorophénolindophénol avec de l'*eau R* afin que 1 mL de la solution corresponde à 0,1 mg d'acide ascorbique ($C_6H_8O_6$).

*Conservation* : pendant 3 jours.

Etalonnez immédiatement avant l'emploi.

**5,7-Dichloroquinoléin-8-ol.** $C_9H_5Cl_2NO$. ($M_r$ 214,1). *1157000.* [773-76-2]. 5,7-Dichlorooxine.

Poudre cristalline jaune, soluble dans l'acétone, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 179 °C.

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent.

**Dichloroquinonechlorimide.** $C_6H_2Cl_3NO$. ($M_r$ 210,4). *1027400.* [101-38-2]. 2,6-Dichloro-*N*-chloro-1,4-benzoquinone monoimine.

Poudre cristalline jaune pâle ou jaune-vert, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans les solutions alcalines diluées.

F : environ 66 °C.

**Dichlorvos.** $C_4H_7Cl_2O_4P$. ($M_r$ 221). *1101200.* [62-73-7]. 2,2-Dichlorovinyl diméthyl phosphate.

Liquide incolore ou jaune-brun, soluble dans l'eau, miscible à la plupart des solvants organiques.

$n_D^{25}$ : environ 1,452.

**Dicyclohexylamine.** $C_{12}H_{23}N$. ($M_r$ 181,3). *1027500.* [101-83-7]. *N,N*-Dicyclohexylamine.

Liquide incolore, assez soluble dans l'eau, miscible aux solvants organiques usuels.

$n_D^{20}$ : environ 1,484.

Eb : environ 256 °C.

*Point de solidification* (*2.2.18*) : 0 °C à 1 °C.

**Dicyclohexyle.** $C_{12}H_{22}$. ($M_r$ 166,3). *1135300.* [92-51-3]. Bicyclohexyle.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,864.

Eb : environ 227 °C.

F : environ 4 °C.

**Dicyclohexylurée.** $C_{13}H_{24}N_2O$. ($M_r$ 224,4). *1027600.* [2387-23-7]. 1,3-Dicyclohexylurée.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche.

F : environ 232 °C.

**Didocosahexaénoïne.** $C_{47}H_{68}O_5$. ($M_r$ 713,0). *1142700.* [88315-12-2]. Diglycéride de l'acide docosahexaénoïque (C22:6). Didocosahexaénoate de glycérol. Diester de l'acide (*tout-Z*)-docosahexaénoïque avec le propane-1,2,3-triol.

**Didodécyle (3,3′-thiodipropionate de).** $C_{30}H_{58}O_4S$. ($M_r$ 514,8). *1027700.* [123-28-4].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'acétone et dans l'éther de pétrole, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 39 °C.

**Dieldrine.** $C_{12}H_8Cl_6O$. ($M_r$ 380,9). *1126200.* [60-57-1].

Eb : environ 385 °C.

F : environ 176 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Diéthanolamine.** $C_4H_{11}NO_2$. ($M_r$ 105,1). *1027800.* [111-42-2]. 2,2′-Iminodiéthanol.

Liquide visqueux limpide, faiblement jaunâtre ou cristaux déliquescents fondant vers 28 °C, très solubles dans l'eau, dans l'acétone et dans le méthanol.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,09.

*pH* (*2.2.3*) : 10,0 à 11,5 pour une solution à 50 g/L.

*La diéthanolamine utilisée dans l'essai de phosphatase alcaline satisfait également à l'essai suivant.*

*Ethanolamine.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*).

*Solution d'étalon interne.* Dissolvez 1,00 g de *3-aminopropanol R* dans de l'*acétone R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution à examiner (a).* Dissolvez 5,00 g de diéthanolamine dans de l'*acétone R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution à examiner (b).* Dissolvez 5,00 g de diéthanolamine dans de l'*acétone R*, ajoutez 1,0 mL de solution d'étalon interne et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solutions témoins.* Dissolvez 0,50 g d'*éthanolamine R* dans de l'*acétone R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant. Traitez des quantités aliquotes de cette solution de 0,5 mL, 1,0 mL et 2,0 mL comme suit : à chaque aliquote, ajoutez 1,0 mL de solution d'étalon interne et complétez à 10,0 mL avec de l'*acétone R*.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 1 m, Ø = 4 mm,
– *phase stationnaire* : *polymère d'oxyde de diphénylphénylène R* (180-250 µm).

*Gaz vecteur* : *azote pour chromatographie R*.

*Débit* : 40 mL/min.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 → 3 | 125 |
| | 3 → 17,6 | 125 → 300 |
| Chambre à injection | | 250 |
| Détecteur | | 280 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1,0 µL.

*Limite* :

– *éthanolamine* : au maximum 1,0 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Diéthoxytétrahydrofurane.** $C_8H_{16}O_3$. ($M_r$ 160,2). *1027900.* [3320-90-9]. 2,5-Diéthoxytétrahydrofurane. Mélange d'isomères *cis* et *trans*.

Liquide limpide, incolore ou légèrement jaunâtre, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans la plupart des solvants organiques.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,98.

$n_D^{20}$ : environ 1,418.

**Diéthylamine.** $C_4H_{11}N$. ($M_r$ 73,1). *1028000.* [109-89-7].

Liquide limpide et incolore, inflammable, fortement alcalin, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,71.

Eb : environ 55 °C.

**Diéthylaminoéthyldextrane.** *1028200.*

Résine échangeuse d'anions présentée sous forme de chlorhydrate.

Poudre formant des gels dans l'eau.

***N,N*-Diéthylaniline.** $C_{10}H_{15}N$. ($M_r$ 149,2). *1028400.* [91-66-7].

$d_{20}^{20}$ : environ 0,938.

Eb : environ 217 °C.

F : environ – 38 °C.

**Diéthylèneglycol.** $C_4H_{10}O_3$. ($M_r$ 106,1). *1028300.* [111-46-6]. 2,2′-Oxydiéthanol.

*Teneur* : au minimum 99,5 pour cent *m/m*.

Liquide limpide, incolore, hygroscopique, miscible à l'eau, à l'acétone et à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,118.

$n_D^{20}$ : environ 1,447.

Eb : 244 °C à 246 °C.

*Conservation* : en récipient étanche.

***N,N*-Diéthyléthane-1,2-diamine.** *1028500.* [100-36-7].

Voir *N,N-Diéthyléthylènediamine R.*

***N,N*-Diéthyléthylènediamine.** $C_6H_{16}N_2$. ($M_r$ 116,2). *1028500.* [100-36-7].

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent.

Liquide légèrement huileux, incolore ou légèrement jaune, à odeur forte d'ammoniaque, irritant par contact avec la peau, les yeux et les muqueuses.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,827.

Eb : 145 °C à 147 °C.

*Eau* (*2.5.12*) : au maximum 1,0 pour cent, déterminé sur 0,500 g.

**Di(2-éthylhexyle) (phtalate de).** $C_{24}H_{38}O_4$. ($M_r$ 390,5). *1028100.* Benzène-1,2-dicarboxylate de di(2-éthylhexyle).

Liquide incolore, huileux, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans les solvants organiques.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,98.

$n_D^{20}$ : environ 1,486.

*Viscosité* (*2.2.9*) : environ 80 mPa·s.

**Diéthylphénylènediamine (sulfate de).** $C_{10}H_{18}N_2O_4S$. ($M_r$ 262,3). *1028600.* [6283-63-2]. Sulfate de *N,N′*-diéthyl-*p*-phénylènediamine. Sulfate de *N,N′*-diéthylbenzène-1,4-diamine.

Poudre blanche ou légèrement jaunâtre, soluble dans l'eau.

F : environ 185 °C, avec décomposition.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Solution de sulfate de diéthylphénylènediamine.** *1028601.*

A 250 mL d'*eau R* ajoutez 2 mL d'*acide sulfurique R* et 25 mL d'*édétate de sodium 0,02 M*. Dissolvez dans cette solution 1,1 g de *sulfate de diéthylphénylènediamine R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

Ne pas utiliser si la solution n'est pas incolore.

*Conservation* : à l'abri de la lumière et de la chaleur, pendant 1 mois.

**Digitonine.** $C_{56}H_{92}O_{29}$. ($M_r$ 1 229). *1028700.* [11024-24-1]. 3β-[*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-*O*-β-D-galactopyranosyl-(1→2)-*O*-[β-D-xylopyranosyl-(1→3)]-*O*-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-*O*-β-D-galactopyranosyloxy]-(25*R*)-5α-spirostane-2α,15β-diol.

Cristaux pratiquement insolubles dans l'eau, assez solubles dans l'éthanol anhydre, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Digitoxine.** *1028800.* [71-63-6].

Voir *Digitoxine (0078).*

**Dihydrocapsaïcine.** $C_{18}H_{29}NO_3$. ($M_r$ 307,4). *1148100.* [19408-84-5]. *N*-[(4-Hydroxy-3-méthoxyphényl)méthyl]-8-méthylnonanamide.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau froide, facilement soluble dans l'éthanol anhydre.

**10,11-Dihydrocarbamazépine.** $C_{15}H_{14}N_2O$. ($M_r$ 238,3). *1028900.* [3564-73-6]. 10,11-Dihydro-5*H*-dibenzo[*b,f*]azépine-5-carboxamide.

F : 205 °C à 210 °C.

**Dihydrocarvone.** $C_{10}H_{16}O$. ($M_r$ 152,2). *1160900.* [7764-50-3]. *p*-Menth-8-én-2-one. 2-Méthyl-5-(1-méthyléthényl)cyclohexanone.

*La dihydrocarvone utilisée en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage*. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans l'essai du profil chromatographique de la monographie *Huile essentielle de carvi (1817).*

*Teneur* calculée par le procédé de normalisation :

– *composé principal (trans-dihydrocarvone)* : au minimum 70 pour cent,
– *somme des isomères cis et trans* : au minimum 98 pour cent.

**2,5-Dihydroxybenzoïque (acide).** $C_7H_6O_4$. ($M_r$ 154,1). *1148200.* [490-79-9]. Acide gentisique.

Cristaux jaunes pâles.

F : environ 200 °C.

**5,7-Dihydroxy-4-méthylcoumarine.** $C_{10}H_8O_4$. ($M_r$ 192,2). *1149400.* [2107-76-8]. 5,7-Dihydroxy-4-méthyl-2*H*-1-benzopyran-2-one.

Poudre faiblement jaunâtre, pratiquement insoluble dans l'eau, assez soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : 295 °C à 303 °C.

**1,3-Dihydroxynaphtalène.** $C_{10}H_8O_2$. ($M_r$ 160,2). *1029000.* [132-86-5]. Naphtalène-1,3-diol.

Poudre cristalline généralement brun violacé, facilement soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 125 °C.

**2,7-Dihydroxynaphtalène.** $C_{10}H_8O_2$. ($M_r$ 160,2). *1029100.* [582-17-2]. Naphtalène-2,7-diol.

Aiguilles solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 190 °C.

**Solution de 2,7-dihydroxynaphtalène.** *1029101.*

Dissolvez 10 mg de *2,7-dihydroxynaphtalène R* dans 100 mL d'*acide sulfurique R* et laissez reposer jusqu'à décoloration.

*Conservation* : pendant 2 jours.

**5,7-Diiodoquinoléin-8-ol.** $C_9H_5I_2NO$. ($M_r$ 397,0). *1157100.* [83-73-8]. 5,7-Diiodooxine.

Poudre brun-jaune, assez soluble dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent.

**Diisobutylcétone.** $C_9H_{18}O$. ($M_r$ 142,2). *1029200.* [108-83-8].

Liquide limpide, incolore, peu soluble dans l'eau, miscible à la plupart des solvants organiques.

$n_D^{20}$ : environ 1,414.

Eb : environ 168 °C.

**Diisopropyléther.** *1029300.* [108-20-3].

Voir *Ether isopropylique R.*

***N,N'*-Diisopropyléthylènediamine.** $C_8H_{20}N_2$. ($M_r$ 144,3). *1140600.* [4013-94-9]. *N,N'*-bis(1-Méthyléthyl)-1,2-éthanediamine.

Liquide incolore ou jaunâtre, corrosif, inflammable, hygroscopique.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,798.

$n_D^{20}$ : environ 1,429.

Eb : environ 170 °C.

**4,4′-Diméthoxybenzophénone.** $C_{15}H_{14}O_3$. ($M_r$ 242,3). *1126300.* [90-96-0]. bis(4-Méthoxyphényl)méthanone.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 142 °C.

**Diméthoxypropane.** $C_5H_{12}O_2$. ($M_r$ 104,1). *1105200.* [77-76-9]. 2,2-Diméthoxypropane.

Liquide incolore se décomposant à l'exposition à l'air humide ou à l'eau.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,847.

$n_D^{20}$ : environ 1,378.

Eb : environ 83 °C.

**1,3-Diméthyl-2-imidazolidinone.** $C_5H_{10}N_2O$. ($M_r$ 114,2). *1135400.* [80-73-9]. *N,N'*-Diméthyléthylèneurée. 1,3-Diméthyl-2-imidazolidone.

$n_D^{20}$ : 1,4720.

Eb : environ 224 °C.

**Diméthylacétamide.** $C_4H_9NO$. ($M_r$ 87,1). *1029700.* [127-19-5]. *N,N*-Diméthylacétamide.

*Teneur* : au minimum 99,5 pour cent.

Liquide incolore, miscible à l'eau et à de nombreux solvants organiques.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,94.

$n_D^{20}$ : environ 1,437.

Eb : environ 165 °C.

**Diméthylamine.** $C_2H_7N$. ($M_r$ 45,08). *1168900.* [124-40-3]. *N*-méthylméthanamine.

Gaz incolore, inflammable.

Eb : environ 7 °C.

F : environ – 92,2 °C.

**Solution de diméthylamine.** *1168901.*

Solution à 400 g/L.

Solution incolore, limpide.

Densité : environ 0,89.

Eb : environ 54 °C.

F : environ – 37 °C.

**Diméthylaminobenzaldéhyde.** $C_9H_{11}NO$. ($M_r$ 149,2). *1029800.* [100-10-7]. 4-(Diméthylamino)benzaldéhyde.

Cristaux blancs ou blanc-jaune, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent et dans les acides dilués.

F : environ 74 °C.

**Solution de diméthylaminobenzaldéhyde R1.** *1029801.*

Dissolvez 0,2 g de *diméthylaminobenzaldéhyde R* dans 20 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*, ajoutez 0,5 mL d'*acide chlorhydrique R*. Agitez la solution avec du *charbon activé R* et filtrez. Le réactif est moins fortement coloré que la *solution d'iode R3*. Préparez extemporanément.

**Solution de diméthylaminobenzaldéhyde R2.** *1029802.*

Dissolvez à froid 0,2 g de *diméthylaminobenzaldéhyde R* dans un mélange de 4,5 mL d'*eau R* et de 5,5 mL d'*acide chlorhydrique R*. Préparez extemporanément.

**Solution de diméthylaminobenzaldéhyde R6.** *1029803.*

Dissolvez 0,125 g de *diméthylaminobenzaldéhyde R* dans un mélange refroidi de 35 mL d'*eau R* et de 65 mL d'*acide sulfurique R*. Ajoutez 0,1 mL d'une solution de *chlorure ferrique R* à 50 g/L. Laissez reposer la solution à l'abri de la lumière pendant 24 h avant l'utilisation.

*Conservation* : à température ambiante pendant 8 jours ou au réfrigérateur pendant plusieurs mois.

**Solution de diméthylaminobenzaldéhyde R7.** *1029804.*

Dissolvez 1,0 g de *diméthylaminobenzaldéhyde R* dans 50 mL d'*acide chlorhydrique R*, puis ajoutez 50 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*.

*Conservation* : à l'abri de la lumière, pendant 4 semaines.

**Solution de diméthylaminobenzaldéhyde R8.** *1029805.*

Dissolvez 0,25 g de *diméthylaminobenzaldéhyde R* dans un mélange de 5 g d'*acide phosphorique R*, de 45 g d'*eau R* et de 50 g d'*acide acétique anhydre R*. Préparez extemporanément.

**4-Diméthylaminocinnamaldéhyde.** $C_{11}H_{13}NO$. ($M_r$ 175,2). *1029900.* [6203-18-5]. 3-(4-Diméthylaminophényl)prop-2-énal.

Poudre ou cristaux, orange ou brun orangé, sensibles à la lumière.

F : environ 138 °C.

**Solution de 4-diméthylaminocinnamaldéhyde.** *1029901.*

Dissolvez 2 g de *4-diméthylaminocinnamaldéhyde R* dans un mélange de 100 mL d'*acide chlorhydrique R1* et de 100 mL d'*éthanol anhydre R*. Immédiatement avant l'emploi, diluez la solution avec 4 fois son volume d'*éthanol anhydre R*.

**2-(Diméthylamino)éthyle (méthacrylate de).** $C_8H_{15}NO_2$. ($M_r$ 157,2). *1147200.* [2867-47-2]. 2-Méthylpropénoate de 2-(diméthylamino)éthyle.

$d_4^{20}$ : environ 0,930.

Eb : environ 187 °C.

**Diméthylaminonaphtalènesulfonyle (chlorure de).** $C_{12}H_{12}ClNO_2S$. ($M_r$ 269,8). *1030000.* [605-65-2]. Chlorure de 5-diméthylamino-1-naphtalènesulfonyle.

Poudre cristalline jaune, peu soluble dans l'eau, soluble dans le méthanol.

F : environ 70 °C.

**3-Diméthylaminophénol.** $C_8H_{11}NO$. ($M_r$ 137,2). *1156500.* [99-07-0]. 3-(Diméthylamino)phénol.

Poudre grise, peu soluble dans l'eau.

F : environ 80 °C.

**Diméthylaniline.** *1030100.* [121-69-7].

Voir *N,N-Diméthylaniline R*.

***N,N*-Diméthylaniline.** $C_8H_{11}N$. ($M_r$ 121,2). *1030100.* [121-69-7].

Liquide huileux limpide, pratiquement incolore quand il est récemment distillé, se colorant en brun-rouge lors de la conservation, pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$n_D^{20}$ : environ 1,558.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : au minimum 95 pour cent distillent de 192 °C à 194 °C.

**2,3-Diméthylaniline.** $C_8H_{11}N$. ($M_r$ 121,2). *1105300.* [87-59-2]. 2,3-Xylidine.

Liquide jaunâtre, assez soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : 0,993 à 0,995.

$n_D^{20}$ : environ 1,569.

Eb : environ 224 °C.

**2,6-Diméthylaniline.** $C_8H_{11}N$. ($M_r$ 121,2). *1030200.* [87-62-7]. 2,6-Xylidine.

Liquide incolore, assez soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,98.

**2,6-Diméthylaniline (chlorhydrate de).** $C_8H_{12}ClN$. ($M_r$ 157,6). *1169000.* [21436-98-6]. Chlorhydrate de 2,6-diméthylbenzénamine. Chlorhydrate de 2,6-xylidine.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent.

**Diméthyl-β-cyclodextrine.** $C_{56}H_{98}O_{35}$. ($M_r$ 1331). *1169100.* [51166-71-3]. Heptakis(2,6-di-*O*-méthyl)cyclomaltoheptaose. Cycloheptakis-(1→4)-(2,6-di-*O*-méthyl-α-D-glucopyranosyl). $2^A,2^B,2^C,2^D,2^E,2^F,2^G,6^A,6^B,6^C,6^D,6^E,6^F,6^G$-Tétradéca-*O*-méthyl-β-cyclodextrine.

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

**Diméthyldécylamine.** $C_{12}H_{27}N$. ($M_r$ 185,4). *1113500.* [1120-24-7]. *N,N*-diméthyldécylamine.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent *m/m*.

Eb : environ 234 °C.

**Diméthyle (carbonate de).** $C_3H_6O_3$. ($M_r$ 90,1). *1119300.* [616-38-6]. Ester diméthylique de l'acide carbonique.

Liquide insoluble dans l'eau et miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_4^{17}$ : 1,065.

$n_D^{20}$ : 1,368.

Eb : environ 90 °C.

**(1,1-Diméthyl)éthylamine.** $C_4H_{11}N$. ($M_r$ 73,1). *1100900.* [75-64-9]. 2-Amino-2-méthylpropane. *tert*-Butylamine.

Liquide miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,694.

$n_D^{20}$ : environ 1,378.

Eb : environ 46 °C.

**3-[3,5-bis(1,1-Diméthyléthyl)-4-hydroxyphényl]propanoate d'octadécyle.** *1060600.* [2082-79-3].

Voir *Octadécyle [3-(3,5-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-hydroxyphényl)propanoate d'] R.*

**(1,1-Diméthyléthyl)méthyléther.** $C_5H_{12}O$. ($M_r$ 88,1). *1013900.* [1634-04-4]. *tert*-Butylméthyléther. 2-Méthoxy-2-méthylpropane.

Liquide incolore, limpide et inflammable.

$n_D^{20}$ : environ 1,376.

*Transmittance minimale* (*2.2.25*) déterminée en utilisant l'*eau R* comme liquide de compensation : 50 pour cent à 240 nm, 80 pour cent à 255 nm, 98 pour cent à 280 nm.

**(1,1-Diméthyléthyl)méthyléther R1.** $C_5H_{12}O$. ($M_r$ 88,1). *1126400.* [1634-04-4]. *tert*-Butylméthyléther. 2-Méthoxy-2-méthylpropane.

*Teneur* : au minimum 99,5 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,741.

$n_D^{20}$ : environ 1,369.

Eb : environ 55 °C.

**Diméthylformamide.** $C_3H_7NO$. ($M_r$ 73,1). *1030300.* [68-12-2].

Liquide limpide, incolore et neutre, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : 0,949 à 0,952.

Eb : environ 153 °C.

*Eau* (*2.5.12*) : au maximum 0,1 pour cent.

**Diméthylformamide diéthylacétal.** $C_7H_{17}NO_2$. ($M_r$ 147,2). *1113600.* [1188-33-6]. *N,N*-diméthylformamide diéthylacétal.

$n_D^{20}$ : environ 1,40.

Eb : 128 °C à 130 °C.

***N,N*-Diméthylformamide diméthylacétal.** $C_5H_{13}NO_2$. ($M_r$ 119,2). *1140700.* [4637-24-5]. 1,1-Diméthoxytriméthylamine.

Liquide limpide et incolore.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,896.

$n_D^{20}$ : environ 1,396.

Eb : environ 103 °C.

**Diméthylglyoxime.** $C_4H_8N_2O_2$. ($M_r$ 116,1). *1030400.* [95-45-4]. 2,3-Butanedione dioxime.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores, pratiquement insolubles dans l'eau froide, très peu solubles dans l'eau bouillante, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 240 °C, avec décomposition.

*Cendres sulfuriques* (*2.4.14*) : au maximum 0,05 pour cent.

***N,N*-Diméthyloctylamine.** $C_{10}H_{23}N$. ($M_r$ 157,3). *1030500.* [7378-99-6]. Octyldiméthylamine.

Liquide incolore.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,765.

$n_D^{20}$ : environ 1,424.

Eb : environ 195 °C.

**2,5-Diméthylphénol.** $C_8H_{10}O$. ($M_r$ 122,2). *1162300.* [95-87-4]. *p*-Xylénol.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs.

**2,6-Diméthylphénol.** $C_8H_{10}O$. ($M_r$ 122,2). *1030600.* [576-26-1].

Aiguilles incolores, peu solubles dans l'eau, très solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

Eb : environ 203 °C.

F : 46 °C à 48 °C.

**3,4-Diméthylphénol.** $C_8H_{10}O$. ($M_r$ 122,2). *1098100.* [95-65-8].

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, peu solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

Eb : environ 226 °C.

F : 25 °C à 27 °C.

***N,N*-Diméthyl-L-phénylalanine.** $C_{11}H_{15}NO_2$. ($M_r$ 193,2). *1164000.* [17469-89-5]. Acide (2*S*)-2-(diméthylamino)-3-phénylpropanoïque.

F : environ 226 °C.

**Diméthylpipérazine.** $C_6H_{14}N_2$. ($M_r$ 114,2). *1030700.* [106-58-1]. 1,4-Diméthylpipérazine.

Liquide incolore, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,85.

$n_D^{20}$ : environ 1,446.

Eb : environ 131 °C.

**Diméthylstéaramide.** $C_{20}H_{41}NO$. ($M_r$ 311,6). *1030800.* *N,N*-Diméthylstéaramide.

Masse solide, blanche ou sensiblement blanche, soluble dans de nombreux solvants organiques, y compris l'acétone.

F : environ 51 °C.

**Diméthylstéarylamide.** *1030800.*

Voir *Diméthylstéaramide R.*

**Diméthylsulfone.** $C_2H_6O_2S$. ($M_r$ 94,1). *1030900.* [67-71-0].

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, facilement soluble dans l'eau, soluble dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : 108 °C à 110 °C.

**Diméthylsulfoxyde.** *1029500.* [67-68-5].

Voir *Diméthylsulfoxyde (0763).*

*Le diméthylsulfoxyde utilisé en spectrophotométrie satisfait également à l'essai suivant.*

4. Réactifs

*Transmittance minimale* (*2.2.25*) déterminé en utilisant l'*eau R* comme liquide de compensation : 10 pour cent à 262 nm, 35 pour cent à 270 nm, 70 pour cent à 290 nm, 98 pour cent à 340 nm et plus.

**Diméthylsulfoxyde R1.** *1029501.*

*Teneur* : au minimum 99,7 pour cent, déterminé par chromatographie en phase gazeuse.

**Diméthylsulfoxyde deutérié.** $C_2{}^2H_6OS$. ($M_r$ 84,2). *1025100.* [2206-27-1]. ($^2H_6$)Diméthylsulfoxide. Diméthylsulfoxide-$d_6$.

*Degré de deutériation* : au minimum 99,8 pour cent.

Liquide très hygroscopique, pratiquement incolore, visqueux, soluble dans l'eau, dans l'acétone et dans l'éthanol anhydre.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,18.

F : environ 20 °C.

*Eau et oxyde de deutérium* : au maximum 0,1 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**2,4-Diméthyl-6-*tert*-butylphénol.** $C_{12}H_{18}O$. ($M_r$ 178,3). *1126500.* [1879-09-0].

**Diméticone.** *1105400.* [9016-00-6].

Voir *Diméticone (0138).*

**Dimidium (bromure de).** $C_{20}H_{18}BrN_3$. ($M_r$ 380,3). *1031100.* [518-67-2]. Bromure de 3,8-diamino-5-méthyl-6-phénylphénanthridinium.

Cristaux rouge foncé, peu solubles dans l'eau à 20 °C, assez solubles dans l'eau à 60 °C et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Indicateur mixte au bromure de dimidium-bleu sulfan.** *1031101.*

Dissolvez séparément 0,5 g de *bromure de dimidium R* et 0,25 g de *bleu sulfan R* dans 30 mL d'un mélange chaud de 1 volume d'*éthanol anhydre R* et de 9 volumes d'*eau R*, agitez, mélangez les 2 solutions et complétez à 250 mL avec le même mélange de solvants. Mélangez 20 mL de cette solution avec 20 mL d'une solution d'*acide sulfurique R* à 14,0 pour cent *V/V* diluée au préalable avec 250 mL d'*eau R* environ, puis complétez à 500 mL avec de l'*eau R*.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Dinitrobenzène.** $C_6H_4N_2O_4$. ($M_r$ 168,1). *1031200.* [528-29-0]. 1,3-Dinitrobenzène.

Poudre cristalline ou cristaux jaunâtres, pratiquement insolubles dans l'eau, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 90 °C.

**Solution de dinitrobenzène.** *1031201.*

Solution à 10 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*.

**Dinitrobenzoïque (acide).** $C_7H_4N_2O_6$. ($M_r$ 212,1). *1031300.* [99-34-3]. Acide 3,5-dinitrobenzoïque.

Cristaux pratiquement incolores, peu solubles dans l'eau, très solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 206 °C.

**Solution d'acide dinitrobenzoïque.** *1031301.*

Solution à 20 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*.

**Dinitrobenzoyle (chlorure de).** $C_7H_3ClN_2O_5$. ($M_r$ 230,6). *1031400.* [99-33-2]. Chlorure de 3,5-dinitrobenzoyle.

Poudre translucide jaune ou jaune-vert ou cristaux jaunâtres solubles dans l'acétone et dans le toluène.

F : environ 68 °C.

*Essai de conformité*. A 1 mL d'*éthanol anhydre R* et 0,1 g de *chlorure de dinitrobenzoyle R*, ajoutez 0,05 mL d'*acide sulfurique dilué R*. Chauffez à reflux pendant 30 min. Après évaporation au bain-marie, ajoutez 5 mL d'*heptane R* au résidu et chauffez à ébullition. Filtrez à chaud. Lavez les cristaux obtenus, après refroidissement à température ambiante, avec une petite quantité d'*heptane R* puis séchez au dessiccateur. Le point de fusion (*2.2.14*) des cristaux est de 94 °C à 95 °C.

**Dinitrophénylhydrazine.** $C_6H_6N_4O_4$. ($M_r$ 198,1). *1031500.* [119-26-6]. 2,4-Dinitrophénylhydrazine.

Cristaux rouge orangé, très peu solubles dans l'eau, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 203 °C (fusion instantanée).

**Solution acéto-chlorhydrique de dinitrophénylhydrazine.** *1031501.*

Dissolvez 0,2 g de *dinitrophénylhydrazine R* dans 20 mL de *méthanol R* et ajoutez 80 mL d'un mélange à volumes égaux d'*acide acétique R* et d'*acide chlorhydrique R1*. Préparez extemporanément.

**Solution chlorhydrique de dinitrophénylhydrazine.** *1031502.*

Dissolvez à chaud 0,50 g de *dinitrophénylhydrazine R* dans de l'*acide chlorhydrique dilué R* et complétez à 100 mL avec le même solvant. Laissez refroidir et filtrez. Préparez extemporanément.

**Solution sulfurique de dinitrophénylhydrazine.** *1031503.*

Dissolvez 1,5 g de *dinitrophénylhydrazine R* dans 50 mL d'une solution d'*acide sulfurique R* à 20 pour cent *V/V*. Préparez extemporanément.

**Dinonyle (phtalate de).** $C_{26}H_{42}O_4$. ($M_r$ 418,6). *1031600.* [28553-12-0].

Liquide visqueux, incolore ou jaune pâle.

$d_{20}^{20}$ : 0,97 à 0,98.

$n_D^{20}$ : 1,482 à 1,489.

*Acidité.* Agitez 5,0 g de phtalate de dinonyle avec 25 mL d'*eau R* pendant 1 min. Laissez reposer et filtrez la phase aqueuse, puis ajoutez 0,1 mL de *solution de phénolphtaléine R*. Le virage de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,3 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* (0,05 pour cent, calculé en acide phtalique).

*Eau* (*2.5.12*) : au maximum 0,1 pour cent.

**Dioctadécyle (disulfure de).** $C_{36}H_{74}S_2$. ($M_r$ 571,1). *1031700.* [2500-88-1].

Poudre blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau.

F : 53 °C à 58 °C.

**Dioctadécyle (3,3′-thiodipropionate de).** $C_{42}H_{82}O_4S$. ($M_r$ 683). *1031900.* [693-36-7].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans le chlorure de méthylène, assez soluble dans l'acétone, dans l'éthanol à 96 pour cent et dans l'éther de pétrole.

F : 58 °C à 67 °C.

**2,2′-Di(octadécyloxy)-5,5′-spirobi(1,3,2-dioxaphosphinane).** $C_{41}H_{82}O_6P_2$. ($M_r$ 733). *1031800.*

Solide cireux blanc ou sensiblement blanc, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans les hydrocarbures.

F : 40 °C à 70 °C.

**Dioctyle (sulfosuccinate de) sodique.** $C_{20}H_{37}NaO_7S$. ($M_r$ 444,6). *1170800.* [577-11-7]. 1,4-Bis[(2-éthylhexyl)oxy]-1,4-dioxobutane-2-sulfonate de sodium. Sulfobutanedioate de 1,4-bis(2-éthylhexyle) sodique.

Solide cireux, blanc ou sensiblement blanc.

**Dioxane.** $C_4H_8O_2$. ($M_r$ 88,1). *1032000.* [123-91-1]. 1,4-Dioxane.

Liquide limpide incolore, miscible à l'eau et à la plupart des solvants organiques.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,03.

*Point de solidification* (*2.2.18*) : 9 °C à 11 °C.

*Eau* (*2.5.12*) : au maximum 0,5 pour cent.

*Ne jamais distiller si le dioxane ne satisfait pas à l'essai des peroxydes.*

*Peroxydes*. Dans une éprouvette à bouchon rodé d'une capacité de 12 mL et d'un diamètre de 1,5 cm environ, introduisez 8 mL de *solution amidonnée d'iodure de potassium R*. Remplissez entièrement avec le dioxane à examiner, agitez fortement et abandonnez à l'abri de la lumière pendant 30 min. Il ne se développe aucune coloration.

*Le dioxane utilisé pour la scintillation liquide doit être d'un degré analytique approprié.*

**Solution de dioxane.** *1032002.*

Prélevez 50,0 mL de *solution mère de dioxane R* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R* (solution de dioxane à 0,5 mg/mL).

**Solution de dioxane R1.** *1032003.*

Prélevez 10,0 mL de *solution de dioxane R* et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R* (solution de dioxane à 0,1 mg/mL).

**Solution mère de dioxane.** *1032001.*

Dissolvez 1,00 g de *dioxane R* dans de l'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Prélevez 5,0 mL de solution et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R* (solution de dioxane à 1,0 mg/mL).

**Diphénylamine.** $C_{12}H_{11}N$. ($M_r$ 169,2). *1032100.* [122-39-4].

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, peu solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 55 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Solution de diphénylamine.** *1032101.*

Solution à 1 g/L dans l'*acide sulfurique R*.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Solution de diphénylamine R1.** *1032102.*

Solution à 10 g/L dans l'*acide sulfurique R*. La solution est incolore.

**Solution de diphénylamine R2.** *1032103.*

Dissolvez 1 g de *diphénylamine R* dans 100 mL d'*acide acétique glacial R* et ajoutez 2,75 mL d'*acide sulfurique R*. Utilisez immédiatement.

**Diphénylanthracène.** $C_{26}H_{18}$. ($M_r$ 330,4). *1032200.* [1499-10-1]. 9,10-Diphénylanthracène.

Poudre cristalline, jaunâtre ou jaune, pratiquement insoluble dans l'eau.

F : environ 248 °C.

**Diphénylbenzidine.** $C_{24}H_{20}N_2$. ($M_r$ 336,4). *1032300.* [531-91-9]. *N,N'*-Diphénylbenzidine. *N,N'*-Diphénylbiphényl-4,4'-diamine.

Poudre cristalline blanche ou faiblement grise, pratiquement insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 248 °C.

*Nitrates*. Dissolvez 8 mg de diphénylbenzidine dans un mélange refroidi de 5 mL d'*eau R* et de 45 mL d'*acide sulfurique exempt d'azote R*. La solution est incolore ou bleu très pâle.

*Cendres sulfuriques* (*2.4.14*) : au maximum 0,1 pour cent.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Diphénylborate d'aminoéthanol.** $C_{14}H_{16}BNO$. ($M_r$ 225,1). *1032400.* [524-95-8].

Poudre cristalline blanche ou faiblement jaunâtre, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 193 °C.

**Diphénylcarbazide.** $C_{13}H_{14}N_4O$. ($M_r$ 242,3). *1032500.* [140-22-7]. 1,5-Diphénylcarbonodihydrazide.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche devenant progressivement rose par exposition à l'air, très peu soluble dans l'eau, soluble dans l'acétone, dans l'éthanol à 96 pour cent et dans l'acide acétique glacial.

F : environ 170 °C.

*Cendres sulfuriques* (*2.4.14*) : au maximum 0,1 pour cent.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Solution de diphénylcarbazide.** *1032501.*

Dissolvez 0,2 g de *diphénylcarbazide R* dans 10 mL d'*acide acétique glacial R* et complétez à 100 mL avec de l'*éthanol anhydre R*. Préparez extemporanément.

**Diphénylcarbazone.** $C_{13}H_{12}N_4O$. ($M_r$ 240,3). *1032600.* [538-62-5]. 1,5-Diphénylcarbazone.

Poudre cristalline jaune orangé, pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 157 °C, avec décomposition.

**Réactif à la diphénylcarbazone-mercurique.** *1032601.*

*Solution A*. Dissolvez 0,1 g de *diphénylcarbazone R* dans de l'*éthanol anhydre R* et complétez à 50 mL avec le même solvant.

*Solution B*. Dissolvez 1 g de *chlorure mercurique R* dans de l'*éthanol anhydre R* et complétez à 50 mL avec le même solvant.

Mélangez des volumes égaux des 2 solutions.

**2,2-Diphénylglycine.** $C_{14}H_{13}NO_2$. ($M_r$ 227,26). *1174300.* [3060-50-2]. Acide amino(diphényl)acétique.

**1,2-Diphénylhydrazine.** $C_{12}H_{12}N_2$. ($M_r$ 184,3). *1140800.* [122-66-7]. Hydrazobenzène. 1,2-Diphényldiazane.

Poudre orangée.

F : environ 125 °C.

**Diphénylméthanol.** $C_{13}H_{12}O$. ($M_r$ 184,2). *1145700.* [91-01-0]. Benzhydrol.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche.

F : environ 66 °C.

**Diphényloxazole.** $C_{15}H_{11}NO$. ($M_r$ 221,3). *1032700.* [92-71-7]. 2,5-Diphényloxazole.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans le méthanol, assez soluble dans le dioxane et dans l'acide acétique glacial.

F : environ 70 °C.

$A^{1\%}_{1\,\mathrm{cm}}$ : environ 1260, déterminé à 305 nm avec une solution de diphényloxazole dans le *méthanol R*.

*Le diphényloxazole, utilisé pour la scintillation liquide, doit être d'un degré analytique approprié.*

**Diphénylphénylène (oxyde de), polymère d'.** *1032800.* Polymère d'oxyde de 2,6-diphényl-*p*-phénylène.

Consiste en un polymère poreux blanc ou sensiblement blanc, sous forme de billes. Les dimensions des billes sont indiquées après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**2,2'-Dipyridylamine.** $C_{10}H_9N_3$. ($M_r$ 171,2). *1157700.* [1202-34-2]. *N*-(pyridin-2-yl)pyridin-2-amine.

F : environ 95 °C.

**Disodium (tétraborate de).** *1033600.* [1303-96-4].

Voir *Borax (0013)*.

**Solution boratée.** *1033601.*

Dissolvez 9,55 g de *tétraborate de disodium R* dans de l'*acide sulfurique R*, en chauffant au bain-marie. Complétez à 1 L avec de l'*acide sulfurique R*.

**Ditalimphos.** $C_{12}H_{14}NO_4PS$. ($M_r$ 299,3). *1126700.* [5131-24-8]. (1,3-dihydro-1,3-dioxo-2*H*-isoindol-2-yl)phosphonothioate de *O,O*-diéthyle.

Très peu soluble dans l'eau, dans l'acétate d'éthyle et dans l'éthanol anhydre.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée peut être utilisée.

**5,5′-Dithiobis(acide 2-nitrobenzoïque).** $C_{14}H_8N_2O_8S_2$. ($M_r$ 396,4). *1097300.* [69-78-3]. 3-Carboxy-4-nitrophényldisulfure. Réactif d'Ellman. DTNB.

Poudre jaune, assez soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 242 °C.

**Dithiol.** $C_7H_8S_2$. ($M_r$ 156,3). *1033800.* [496-74-2]. Toluène-3,4-dithiol. 4-Méthylbenzène-1,2-dithiol.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, hygroscopiques, solubles dans le méthanol et dans les solutions d'hydroxydes alcalins.

F : environ 30 °C.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Réactif au dithiol.** *1033801.*

A 1 g de *dithiol R*, ajoutez 2 mL d'*acide thioglycolique R*. Complétez à 250 mL avec une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 20 g/L. Solution extemporanée.

**Dithiothréitol.** $C_4H_{10}O_2S_2$. ($M_r$ 154,2). *1098200.* [27565-41-9]. *thréo*-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol.

Aiguilles légèrement hygroscopiques, facilement solubles dans l'eau, dans l'acétone et dans l'éthanol anhydre.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Dithizone.** $C_{13}H_{12}N_4S$. ($M_r$ 256,3). *1033900.* [60-10-6]. 1,5-Diphénylthiocarbazone.

Poudre, bleu noir, brun-noir ou noire, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Solution de dithizone.** *1033901.*

Solution à 0,5 g/L dans le *chloroforme R*. Préparez extemporanément.

**Solution de dithizone R2.** *1033903.*

Dissolvez 40,0 mg de *dithizone R* dans du *chloroforme R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant. Prélevez 30,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec du *chloroforme R*.

*Dosage.* Dissolvez, dans un mélange à volumes égaux d'*acide sulfurique dilué R* et d'*eau R,* une quantité de *chlorure mercurique R* correspondant à 0,135 4 g de $HgCl_2$ et complétez à 100,0 mL avec le même mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec un mélange à volumes égaux d'*acide sulfurique dilué R* et d'*eau R*. Cette solution contient 20 ppm de Hg. Dans une ampoule à décantation, introduisez 1,0 mL de cette solution, puis ajoutez 50 mL d'*acide sulfurique dilué R,* 140 mL d'*eau R* et 10 mL d'une solution de *chlorhydrate d'hydroxylamine R* à 200 g/L. Titrez par la solution de dithizone. Agitez 20 fois le mélange après chaque addition de solution titrante. Vers la fin du titrage, laissez séparer la phase chloroformique et rejetez-la. Titrez jusqu'à coloration vert-bleu. Déterminez le titre en microgrammes de mercure par millilitre de la solution de dithizone à l'aide de l'expression $20/V$ dans laquelle $V$ est le volume, en millilitres, de la solution de dithizone utilisée.

**Dithizone R1.** $C_{13}H_{12}N_4S$. ($M_r$ 256,3). *1105500.* [60-10-6]. 1,5-Diphénylthiocarbazone.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent.

Poudre, bleu noir, brun-noir ou noire, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Divanadium (pentoxyde de).** $V_2O_5$. ($M_r$ 181,9). *1034000.* [1314-62-1]. Anhydride vanadique.

*Teneur* : au minimum 98,5 pour cent.

Poudre brun-jaune ou brun-roux, peu soluble dans l'eau, soluble dans les acides minéraux concentrés et dans les solutions d'hydroxydes alcalins avec formation de sels.

*Aspect de la solution.* Chauffez 1 g de pentoxyde de divanadium avec 10 mL d'*acide sulfurique R* pendant 30 min. Laissez refroidir et complétez à 10 mL avec le même acide. La solution est limpide (*2.2.1*).

*Sensibilité au peroxyde d'hydrogène.* Prélevez 1,0 mL de la solution obtenue dans l'essai de l'aspect de la solution et complétez avec précaution à 50,0 mL avec de l'*eau R*. A 0,5 mL de cette solution, ajoutez 0,1 mL d'une solution de *peroxyde d'hydrogène R* à 0,1 g/L en $H_2O_2$. La solution est nettement orangée par rapport à un témoin préparé avec 0,5 mL de la solution à examiner et 0,1 mL d'*eau R*. Après addition de 0,4 mL d'une solution de *peroxyde d'hydrogène R* à 0,1 g/L en $H_2O_2$, la coloration orange vire au jaune orangé.

*Perte à la calcination* : au maximum 1,0 pour cent, déterminé à 700 ± 50 °C sur 1,00 g.

*Dosage.* Dissolvez à chaud 0,200 g de pentoxyde de divanadium dans 20 mL d'une solution d'*acide sulfurique R* à 70 pour cent *m/m*. Ajoutez 100 mL d'*eau R* et du *permanganate de potassium 0,02 M* jusqu'à coloration rougeâtre. Décolorez l'excès de permanganate de potassium avec une solution de *nitrite de sodium R* à 30 g/L. Ajoutez 5 g d'*urée R* et 80 mL d'une solution d'*acide sulfurique R* à 70 pour cent *m/m,* refroidissez et titrez immédiatement par le *sulfate ferreux 0,1 M* en présence de 0,1 mL de *ferroïne R,* jusqu'à apparition d'une coloration rouge-vert.

1 mL de *sulfate ferreux 0,1 M* correspond à 9,095 mg de $V_2O_5$.

**Solution sulfurique de pentoxyde de divanadium.** *1034001.*

Dissolvez 0,2 g de *pentoxyde de divanadium R* dans 4 mL d'*acide sulfurique R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

**Docosahexaénoïque (acide), ester méthylique.** $C_{23}H_{34}O_2$. ($M_r$ 342,5). *1142800.* [301-01-9]. Ester méthylique de DHA. Ester méthylique de l'acide cervonique. Ester méthylique de l'acide (tout-*Z*)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaénoïque.

*Teneur* : au minimum 90,0 pour cent, déterminé par chromatographie en phase gazeuse.

**Docusate sodique.** *1034100.* [577-11-7].

Voir *Docusate sodique (1418).*

**Dodécyltriméthylammonium (bromure de).** $C_{15}H_{34}BrN$. ($M_r$ 308,4). *1135500.* [1119-94-4]. Bromure de *N,N,N*-triméthyldodécan-1-aminium.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs.

F : environ 246 °C.

**D-Dopa.** $C_9H_{11}NO_4$. ($M_r$ 197,2). *1164100.* [5796-17-8]. Acide (2*R*)-2-amino-3-(3,4-dihydroxyphényl)propanoïque. 3-Hydroxy-D-tyrosine. 3,4-Dihydroxy-D-phénylalanine.

$[\alpha]_D^{20}$ : + 9,5 à + 11,5, déterminé avec une solution à 10 g/L dans l'*acide chlorhydrique 1 M*.

F : environ 277 °C.

**Dotriacontane.** $C_{32}H_{66}$. ($M_r$ 450,9). *1034200.* [544-85-4]. *n*-Dotriacontane.

Paillettes blanches ou sensiblement blanches, pratiquement insolubles dans l'eau, assez solubles dans l'hexane.

F : environ 69 °C.

*Impuretés.* Moins de 0,1 pour cent d'impuretés ayant la même valeur $t_R$ que l'acétate d'α-tocophéryle, déterminé par chromatographie en phase gazeuse selon les indications données dans la monographie *Acétate d'α-tocophéryle (0439).*

**Doxycycline.** *1145800.*

Voir *Doxycycline monohydratée (0820).*

**Eau.** *1095500.* [7732-18-5].

Voir *Eau purifiée (0008).*

**Eau distillée.** *1095504.*

*Eau R* préparée par distillation.

**Eau R1.** *1095509.*

Préparée à partir d'*eau distillée R* par distillation multiple. Eliminez le dioxyde de carbone en portant à ébullition l'eau, pendant au moins 15 min avant l'emploi, dans un ballon de verre borosilicaté ou de silice fondue, puis refroidissez. Toute autre méthode appropriée peut être employée. Le ballon a déjà été utilisé pour l'essai ou a été rempli d'*eau R* et maintenu en autoclave à 121 °C pendant au moins 1 h avant la première utilisation. Si l'essai est effectué immédiatement avant l'emploi, l'*eau R1* est neutre à la *solution de rouge de méthyle R*, c'est-à-dire qu'il se développe une coloration rouge-orange (et non rouge-violet ou jaune) correspondant à un pH de 5,5 ± 0,1 lorsque 0,05 mL de *solution de rouge de méthyle R* est ajouté à 50 mL d'eau à examiner.

*Conductivité* : au maximum 1 µS·cm$^{-1}$, déterminé à 25 °C au moyen d'un conductimètre raccordé (voir *Eau purifiée (0008)*).

**Eau distillée désionisée.** *1095508.*

*Eau R* désionisée, préparée par distillation, avec une résistivité d'au minimum 0,18 Mohm·m.

**Eau exempte d'ammonium.** *1095501.*

A 100 mL d'*eau R*, ajoutez 0,1 mL d'*acide sulfurique R*. Distillez en utilisant l'appareil décrit pour la détermination de l'intervalle de distillation (*2.2.11*) ; éliminez les premiers 10 mL et recueillez les 50 mL suivants.

**Eau exempte de dioxyde de carbone.** *1095502.*

Faites bouillir de l'*eau R* pendant quelques minutes, laissez refroidir à l'abri de l'air et conservez dans les mêmes conditions.

**Eau exempte de nitrate.** *1095506.*

A 100 mL d'*eau R*, ajoutez quelques milligrammes de *permanganate de potassium R* et d'*hydroxyde de baryum R*. Distillez en utilisant l'appareil décrit pour la détermination de l'intervalle de distillation (*2.2.11*) ; éliminez les premiers 10 mL et recueillez les 50 mL suivants.

**Eau exempte de particules.** *1095507.*

L'eau exempte de particules est obtenue par filtration de l'*eau R* à travers une membrane de porosité de 0,22 µm.

**Eau pour chromatographie.** *1095503.*

*Eau R* désionisée ayant une résistivité de 0,18 Mohm·m au minimum.

**Eau pour préparations injectables.** *1095505.*

Voir *Eau pour préparations injectables (0169).*

**Eau (réactif électrolytique pour microdosage de l').** *1113700.*

Voir *Réactif électrolytique pour microdosage de l'eau R.*

**Echinacoside.** $C_{35}H_{46}O_{20}$. ($M_r$ 786,5). *1159400.* [82854-37-3]. β-(3′,4′-Dihydroxyphényl)-éthyl-*O*-α-L-rhamnopyranosyl (1→3)-*O*-β-D-[β-D-glucopyranosyl(1→6)]-(4-*O*-caféoyl)-glucopyranoside.

Poudre jaune pâle, inodore.

**Emétine (chlorhydrate d').** *1034300.* [316-42-7].

Voir *Chlorhydrate d'émétine pentahydraté (0081).*

**Emodine.** $C_{15}H_{10}O_5$. ($M_r$ 270,2). *1034400.* [518-82-1]. 1,3,8-Trihydroxy-6-méthylanthraquinone.

Aiguilles rouge orangé, pratiquement insolubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent et dans les solutions d'hydroxydes alcalins.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Rhubarbe (0291)* ; le chromatogramme présente une seule tache principale.

**Endoprotéase LysC.** *1173200.*

Enzyme protéolytique microbienne extracellulaire sécrétée par *Achromobacter lyticus.* Poudre lyophilisée, exempte de sels.

**α-Endosulfan.** $C_9H_6Cl_6O_3S$. ($M_r$ 406,9). *1126800.* [959-98-8].

Eb : environ 200 °C.

F : environ 108 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**β-Endosulfan.** $C_9H_6Cl_6O_3S$. ($M_r$ 406,9). *1126900.* [33213-65-9].

Eb : environ 390 °C.

F : environ 207 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Endrine.** $C_{12}H_8Cl_6O$. ($M_r$ 380,9). *1127000.* [72-20-8].

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Erucamide.** $C_{22}H_{43}NO$. ($M_r$ 337,6). *1034500.* [112-84-5]. (*Z*)-Docos-13-énoamide.

Poudre ou granulés blancs ou jaunâtres, pratiquement insolubles dans l'eau, très solubles dans le chlorure de méthylène, solubles dans l'éthanol anhydre.

F : environ 70 °C.

**Erythritol.** *1113800.* [149-32-6].

Voir *Erythritol (1803).*

**Erythrocytes de lapin (suspension d').** *1074500.*

Préparez comme suit une suspension d'érythrocytes de lapin à 1,6 pour cent *V/V* : défibrinez 15 mL de sang frais de lapin en l'agitant avec des billes de verre ; centrifugez à 2000 *g* pendant 10 min ; lavez les érythrocytes avec 3 fois 30 mL d'une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L ; prélevez 1,6 mL du liquide contenant les érythrocytes et complétez à 100 mL avec un mélange de 1 volume de *solution tampon phosphate pH 7,2 R* et de 9 volumes d'une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L.

**Esculine.** $C_{15}H_{16}O_9,1^1/_2H_2O$. ($M_r$ 367,3). *1119400.* [531-75-9]. 6-(β-D-Glucopyranosyloxy)-7-hydroxy-2*H*-chromén-2-one.

Poudre blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores, assez solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent, facilement solubles dans l'eau chaude et dans l'éthanol à 96 pour cent chaud.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Eleuthérocoque (1419)* ; le chromatogramme présente une seule tache principale.

**Estradiol.** $C_{18}H_{24}O_2$. ($M_r$ 272,4). *1135600.* [50-28-2]. Estra-1,3,5(10)-triène-3,17β-diol. β-Estradiol.

Prismes stables à l'air, pratiquement insolubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent, solubles dans l'acétone et dans le dioxane, assez solubles dans les huiles végétales.

F : 173 °C à 179 °C.

**17α-Estradiol.** $C_{18}H_{24}O_2$. ($M_r$ 272,4). *1034600.* [57-91-0].

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores.

F : 220 °C à 223 °C.

4. Réactifs

**Estragole.** $C_{10}H_{12}O$. ($M_r$ 148,2). *1034700.* [140-67-0]. 1-Méthoxy-4-prop-2-énylbenzène.

Liquide, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$n_D^{20}$ : environ 1,52.

Eb : environ 216 °C.

*L'estragole utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle d'anis (0804).*

*Solution à examiner.* L'estragole à examiner.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Etain.** Sn. ($A_r$ 118,7). *1090800.* [7440-31-5].

Grenailles blanc argent, solubles dans l'acide chlorhydrique avec dégagement d'hydrogène.

*Arsenic* (*2.4.2, Procédé A*) : au maximum 10 ppm, déterminé sur 0,1 g d'étain.

**Ethanol.** *1034800.* [64-17-5].

Voir *Ethanol anhydre R.*

**Ethanol anhydre.** *1034800.* [64-17-5].

Voir *Ethanol anhydre (1318).*

**Ethanol R1.** *1034801.*

Satisfait aux spécifications de la monographie *Ethanol anhydre (1318)* et à la spécification supplémentaire suivante.

*Méthanol.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*).

*Solution à examiner.* L'éthanol à examiner.

*Solution témoin.* Diluez 0,50 mL de *méthanol anhydre R* dans l'éthanol à examiner et complétez à 100,0 mL avec l'éthanol à examiner. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec l'éthanol à examiner.

*Colonne* :

- *matériau* : verre,
- *dimensions* : $l$ = 2 m, Ø = 2 mm,
- *phase stationnaire* : *copolymère d'éthylvinylbenzène-divinylbenzène R* (75-100 µm).

*Gaz vecteur* : *azote pour chromatographie R.*

*Débit* : 30 mL/min.

*Température* :

- *colonne* : 130 °C,
- *chambre à injection* : 150 °C,
- *détecteur* : 200 °C.

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 3 fois 1 µL de solution à examiner et 3 fois 1 µL de solution témoin en faisant alterner l'ordre des injections.

Après chaque chromatographie, chauffez la colonne à 230 °C pendant 8 min. Intégrez le pic correspondant au méthanol.

Calculez la teneur pour cent en méthanol à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{a \times b}{c - b}$$

$a$ = quantité de méthanol dans la solution témoin exprimée en pour cent *V/V*,

$b$ = surface du pic dû au méthanol dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$c$ = surface du pic dû au méthanol dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

*Limite* :

- *méthanol* : au maximum 0,005 pour cent *V/V*.

**Ethanol à 96 pour cent.** *1002500.* [64-17-5].

Voir *Ethanol à 96 pour cent (1317).*

**Ethanol à *x* pour cent *V/V*.** *1002502.*

Mélangez les volumes adéquats d'*eau R* et d'*éthanol à 96 pour cent R,* en tenant compte de l'échauffement et de la contraction de volume inhérents à la préparation du mélange, de façon à obtenir une solution dont le degré alcoolique final correspond à la valeur *x*.

**Ethanolamine.** $C_2H_7NO$. ($M_r$ 61,1). *1034900.* [141-43-5]. 2-Aminoéthanol.

Liquide hygroscopique, visqueux, incolore, limpide, miscible à l'eau et au méthanol.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,04.

$n_D^{20}$ : environ 1,454.

F : environ 11 °C.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Ether.** $C_4H_{10}O$. ($M_r$ 74,1). *1035000.* [60-29-7].

Liquide limpide, incolore, volatil, très mobile. L'éther est très inflammable et hygroscopique, soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : 0,713 à 0,715.

Eb : 34 °C à 35 °C.

*Ne jamais distiller si l'éther ne satisfait pas à l'essai des peroxydes.*

*Peroxydes.* Dans une éprouvette à bouchon rodé d'une capacité de 12 mL et d'un diamètre de 1,5 cm environ, introduisez 8 mL de *solution amidonnée d'iodure de potassium R.* Remplissez entièrement avec l'éther à examiner, agitez fortement et abandonnez à l'abri de la lumière pendant 30 min. Il ne se développe aucune coloration.

Le nom et la concentration de tout stabilisant éventuellement ajouté sont indiqués sur l'étiquette.

*Conservation* : en récipient étanche, à l'abri de la lumière, à une température ne dépassant pas 15 °C.

**Ether benzylique.** $C_{14}H_{14}O$. ($M_r$ 198,3). *1140900.* [103-50-4]. Ether dibenzylique.

Liquide limpide et incolore, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'acétone et à l'éthanol anhydre.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,043.

$n_D^{20}$ : environ 1,562.

Eb : environ 296 °C, avec décomposition.

**Ether exempt de peroxydes.** *1035100.*

Voir *Ether anesthésique (0367).*

**Ether de pétrole.** *1063100.* [8032-32-4].

Liquide limpide et incolore, inflammable, non fluorescent, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : 0,661 à 0,664.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : 50 °C à 70 °C.

**Ether de pétrole R1.** *1063101.*

Satisfait aux spécifications de l'*éther de pétrole R* avec les modifications suivantes.

$d_{20}^{20}$ : 0,630 à 0,656.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : 40 °C à 60 °C. Il ne se trouble pas à 0 °C.

**Ether de pétrole R2.** *1063102.*

Satisfait aux spécifications de l'*éther de pétrole R* avec les modifications suivantes.

$d_{20}^{20}$ : 0,620 à 0,630.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : 30 °C à 40 °C. Il ne se trouble pas à 0 °C.

**Ether de pétrole R3.** *1063103.*

Satisfait aux spécifications de l'*éther de pétrole R* avec les modifications suivantes.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,720.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : 100 °C à 120 °C.

*Eau* (*2.5.12*) : au maximum 0,03 pour cent.

**Ether de pétrole R4.** *1063104.*

Satisfait aux spécifications de l'*éther de pétrole R* avec les modifications suivantes.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,70.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : 80 °C à 100 °C.

**Ether dibutylique.** $C_8H_{18}O$. ($M_r$ 130,2). *1026700.* [142-96-1]. Oxyde de dibutyle.

Liquide incolore et inflammable, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol anhydre.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,77.

$n_D^{20}$ : environ 1,399.

*Ne jamais distiller si l'éther dibutylique ne satisfait pas à l'essai des peroxydes.*

*Peroxydes.* Dans une éprouvette à bouchon rodé d'une capacité de 12 mL et d'un diamètre d'environ 1,5 cm, introduisez 8 mL de *solution amidonnée d'iodure de potassium R*. Remplissez entièrement avec l'éther dibutylique à examiner, agitez fortement et abandonnez à l'abri de la lumière pendant 30 min. Il ne se développe aucune coloration.

Le nom et la concentration de tout stabilisant éventuellement ajouté sont indiqués sur l'étiquette.

**Ether isopropylique.** $C_6H_{14}O$. ($M_r$ 102,2). *1029300.* [108-20-3]. Oxyde de diisopropyle.

Liquide limpide, incolore, très peu soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : 0,723 à 0,728.

Eb : 67 °C à 69 °C.

*Ne jamais distiller si l'éther isopropylique ne satisfait pas à l'essai des peroxydes.*

*Peroxydes.* Dans une éprouvette à bouchon rodé d'une capacité de 12 mL et d'un diamètre d'environ 1,5 cm, introduisez 8 mL de *solution amidonnée d'iodure de potassium R*. Remplissez entièrement avec l'éther isopropylique à examiner. Agitez fortement et abandonnez à l'abri de la lumière pendant 30 min. Il ne se développe aucune coloration.

Le nom et la concentration de tout stabilisant éventuellement ajouté sont indiqués sur l'étiquette.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Ethion.** $C_9H_{22}O_4P_2S_4$. ($M_r$ 384,5). *1127100.* [563-12-2].

F : – 24 °C à – 25 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Ethoxychrysoïdine (chlorhydrate d').** $C_{14}H_{17}ClN_4O$. ($M_r$ 292,8). *1035200.* [2313-87-3]. Chlorhydrate de 4-[(4-éthoxyphényl)diazényl]phénylène-1,3-diamine.

Poudre rougeâtre, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution d'éthoxychrysoïdine.** *1035201.*

Solution à 1 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*.

*Essai de sensibilité.* A 5 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*, ajoutez 0,05 mL de solution d'éthoxychrysoïdine et 0,05 mL de *bromure-bromate 0,0167 M*. La coloration vire du rouge au jaune pâle dans les 2 min qui suivent.

**4-[(Ethylamino)méthyl]pyridine.** $C_8H_{12}N_2$. ($M_r$ 136,2). *1101300.* [33403-97-3].

Liquide jaune pâle.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,98.

$n_D^{20}$ : environ 1,516.

Eb : environ 98 °C.

**Ethylbenzène.** $C_8H_{10}$. ($M_r$ 106,2). *1035800.* [100-41-4].

*Teneur* : au minimum 99,5 pour cent *m/m*, déterminé par chromatographie en phase gazeuse.

Liquide limpide, incolore, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,87.

$n_D^{20}$ : environ 1,496.

Eb : environ 135 °C.

**Ethyle (acétate d').** $C_4H_8O_2$. ($M_r$ 88,1). *1035300.* [141-78-6].

Liquide limpide, incolore, soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : 0,901 à 0,904.

Eb : 76 °C à 78 °C.

**Acétate d'éthyle traité.** *1035301.*

Dispersez 200 g d'*acide sulfamique R* dans de l'*acétate d'éthyle R* et complétez à 1000 mL avec le même solvant. Mettez la suspension ainsi obtenue sous agitation pendant 3 jours et filtrez sur papier filtre.

*Conservation* : pendant 1 mois.

**Ethyle (acrylate d').** $C_5H_8O_2$. ($M_r$ 100,1). *1035400.* [140-88-5]. Prop-2-énoate d'éthyle.

Liquide incolore.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,924.

$n_D^{20}$ : environ 1,406.

Eb : environ 99 °C.

F : environ – 71 °C.

**Ethyle (benzoate d').** $C_9H_{10}O_2$. ($M_r$ 150,2). *1135700.* [93-89-0].

Liquide limpide, incolore, réfringent, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent et à l'éther de pétrole.

$d_4^{25}$ : environ 1,050.

$n_D^{20}$ : environ 1,506.

Eb : 211 °C à 213 °C.

**Ethyle (5-bromovalérate d').** $C_7H_{13}BrO_2$. ($M_r$ 209,1). *1142900.* [14660-52-7]. 5-Bromopentanoate d'éthyle.

Liquide limpide incolore.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,321.

Eb : 104 °C à 109 °C.

**Ethyle (cyanacétate d').** $C_5H_7NO_2$. ($M_r$ 113,1). *1035500.* [105-56-6].

Liquide incolore ou jaune pâle, peu soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

Eb : 205 °C à 209 °C, avec décomposition.

**Ethyle (formiate d').** $C_3H_6O_2$. ($M_r$ 74,1). *1035600.* [109-94-4]. Méthanoate d'éthyle.

Liquide limpide, incolore, inflammable, facilement soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,919.

$n_D^{20}$ : environ 1,36.

Eb : environ 54 °C.

**Ethyle (4-hydroxybenzoate d').** *1035700.* [120-47-8].

Voir *Parahydroxybenzoate d'éthyle R*.

**Ethyle (parahydroxybenzoate d').** *1035700.* [120-47-8].

Voir *Parahydroxybenzoate d'éthyle (0900).*

4. Réactifs

**Ethylène (bis[3,3-di[3-(1,1-diméthyléthyl)-4-hydroxyphényl]butyrate] d').** $C_{50}H_{66}O_8$. ($M_r$ 795). *1035900.* [32509-66-3]. bis[3,3-Di(3-*tert*-butyl-4-hydroxyphényl)butyrate d'éthylène.

Poudre cristalline, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éther de pétrole, très soluble dans l'acétone et dans le méthanol.

F : environ 165 °C.

**Ethylène (chlorure d').** $C_2H_4Cl_2$. ($M_r$ 99,0). *1036000.* [107-06-2]. 1,2-Dichloroéthane.

Liquide limpide et incolore, soluble dans environ 120 parties d'eau, dans 2 parties d'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,25.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : au minimum 95 pour cent distillent de 82 °C à 84 °C.

**Ethylènediamine.** $C_2H_8N_2$. ($M_r$ 60,1). *1036500.* [107-15-3]. Ethane-1,2-diamine.

Liquide limpide et incolore, fumant, fortement alcalin, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent.

Eb : environ 116 °C.

**(Ethylènedinitrilo)tétraacétique (acide).** $C_{10}H_{16}N_2O_8$. ($M_r$ 292,2). *1105800.* [60-00-4]. *N,N'*-1,2-éthanediylbis[*N*-(carboxyméthyl)glycine]. Acide édétique.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, très peu soluble dans l'eau.

F : 250 °C environ, avec décomposition.

**Ethylèneglycol.** $C_2H_6O_2$. ($M_r$ 62,1). *1036100.* [107-21-1]. Ethane-1,2-diol.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent.

Liquide incolore, légèrement visqueux, hygroscopique, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : 1,113 à 1,115.

$n_D^{20}$ : environ 1,432.

Eb : environ 198 °C.

F : environ – 12 °C.

*Acidité.* A 10 mL d'éthylèneglycol, ajoutez 20 mL d'*eau R* et 1 mL de *solution de phénolphtaléine R*. Le virage de l'indicateur au rose ne nécessite pas plus de 0,15 mL d'*hydroxyde de sodium 0,02 M*.

*Eau* (*2.5.12*) : au maximum 0,2 pour cent.

**Ethylèneglycol (éther monoéthylique d').** $C_4H_{10}O_2$. ($M_r$ 90,1). *1036200.* [110-80-5]. 2-Ethoxyéthanol.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent.

Liquide limpide et incolore, miscible à l'eau, à l'acétone et à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,93.

$n_D^{25}$ : environ 1,406.

Eb : environ 135 °C.

**Ethylèneglycol (éther monométhylique d').** $C_3H_8O_2$. ($M_r$ 76,1). *1036300.* [109-86-4]. 2-Méthoxyéthanol.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent.

Liquide limpide et incolore, miscible à l'eau, à l'acétone et à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,97.

$n_D^{20}$ : environ 1,403.

Eb : environ 125 °C.

**Ethylène (oxyde d').** $C_2H_4O$. ($M_r$ 44,05). *1036400.* [75-21-8]. Oxirane.

Gaz incolore, inflammable, très soluble dans l'eau et dans l'éthanol anhydre.

*Point de liquéfaction* : environ 12 °C.

**Solution d'oxyde d'éthylène.** *1036402.*

*Préparez immédiatement avant l'emploi.* Dans une fiole froide, pesez une quantité de *solution mère d'oxyde d'éthylène R* refroidie équivalente à 2,5 mg d'oxyde d'éthylène et complétez à 50,0 g avec du *macrogol 200 R1*. Mélangez soigneusement puis prélevez 2,5 g de solution et complétez à 25,0 mL avec du *macrogol 200 R1* (5 µg/g).

**Solution d'oxyde d'éthylène R1.** *1036403.*

*Préparez immédiatement avant l'emploi.* Diluez 1,0 mL de *solution mère d'oxyde d'éthylène R* refroidie (vérifiez le volume exact en pesant) et complétez à 50,0 mL avec du *macrogol 200 R1*. Mélangez soigneusement puis prélevez 2,5 g de cette solution et complétez à 25,0 mL avec du *macrogol 200 R1*. Calculez la quantité exacte d'oxyde d'éthylène en parties par million à partir du volume déterminé par pesée et en prenant 1,127 comme densité du *macrogol 200 R1*.

**Solution d'oxyde d'éthylène R2.** *1036404.*

*Préparez immédiatement avant l'emploi.* Dans une fiole refroidie contenant 40,0 g de *macrogol 200 R1* refroidi diluez 1,00 g de *solution mère d'oxyde d'éthylène R* refroidie (équivalente à 2,5 mg d'oxyde d'éthylène). Mélangez, déterminez la masse exacte puis diluez jusqu'à obtention d'une masse calculée pour obtenir une solution contenant 50 µg d'oxyde d'éthylène par gramme de solution. Dans une fiole contenant environ 30 mL d'*eau R*, déposez 10,00 g de cette solution, mélangez et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R* (solution d'oxyde d'éthylène à 10 µg/mL).

**Solution d'oxyde d'éthylène R3.** *1036405.*

*Préparez immédiatement avant l'emploi.* Prélevez 10,0 mL de *solution d'oxyde d'éthylène R2* et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R* (solution d'oxyde d'éthylène à 2 µg/mL).

**Solution d'oxyde d'éthylène R4.** *1036407.*

Prélevez 1,0 mL de *solution mère d'oxyde d'éthylène R1* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 25,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution d'oxyde d'éthylène R5.** *1036408.*

Une solution d'*oxyde d'éthylène R* à 50 g/L dans le *chlorure de méthylène R*.

Utilisez un réactif disponible dans le commerce ou préparez une solution de la composition indiquée ci-dessus.

**Solution mère d'oxyde d'éthylène.** *1036401.*

*Toutes les opérations entrant dans la préparation de ces solutions doivent être effectuées sous une hotte. L'opérateur doit se protéger les deux mains et le visage en portant des gants en polyéthylène ainsi qu'un masque de protection approprié.*

*Conservez toutes les solutions dans un récipient étanche au réfrigérateur à une température de 4-8 °C. Effectuez 3 fois toutes les déterminations.*

Dans un tube à essai propre et sec, refroidi dans un mélange de 1 partie de *chlorure de sodium R* et de 3 parties de glace pilée, introduisez à faible débit de l'*oxyde d'éthylène R* gazeux en favorisant une condensation sur la paroi intérieure du tube. A l'aide d'une seringue en verre préalablement refroidie à – 10 °C, injectez environ 300 µL (soit environ 0,25 g) d'*oxyde d'éthylène R* liquide dans 50 mL de *macrogol 200 R1*. Déterminez la quantité d'oxyde d'éthylène absorbée en pesant avant et après l'absorption ($M_{eo}$). Complétez à 100,0 mL avec du *macrogol 200 R1*. Mélangez soigneusement avant utilisation.

*Dosage.* Dans un flacon, ajoutez 20,0 mL d'*acide chlorhydrique alcoolique 0,1 M* à 10 mL d'une suspension de *chlorure de magnésium R* à 500 g/L dans l'*éthanol anhydre R* et fermez. Agitez pour obtenir une solution saturée et laissez reposer une nuit pour équilibrer. Pesez 5,00 g de solution mère d'oxyde d'éthylène (2,5 g/L) dans

le flacon et laissez reposer pendant 30 min. Titrez par l'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,1 M* et déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (*2.2.20*).

Effectuez un dosage à blanc en remplaçant la substance à examiner par la même quantité de *macrogol 200 R1*.

La teneur en oxyde d'éthylène, en milligrammes par gramme, est donnée par l'expression suivante :

$$\frac{(V_0 - V_1) \times f \times 4,404}{m}$$

| | | |
|---|---|---|
| $V_0$, $V_1$ | = | volumes d'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,1 M* utilisés respectivement pour le dosage à blanc et le dosage, |
| $f$ | = | facteur de la solution d'hydroxyde de potassium alcoolique, |
| $m$ | = | masse de l'échantillon, en grammes. |

**Solution mère d'oxyde d'éthylène R1.** *1036406.*

Solution d'*oxyde d'éthylène R* à 50 g/L dans le *méthanol R*.

**2-Ethylhexane-1,3-diol.** $C_8H_{18}O_2$. ($M_r$ 146,2). *1105900.* [94-96-2].

Liquide légèrement huileux, soluble dans l'éthanol anhydre, le 2-propanol, le propylèneglycol et l'huile de ricin.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,942.

$n_D^{20}$ : environ 1,451.

Eb : environ 244 °C.

**2-Ethylhexanoïque (acide).** $C_8H_{16}O_2$. ($M_r$ 144,2). *1036600.* [149-57-5].

Liquide incolore.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,91.

$n_D^{20}$ : environ 1,425.

*Substances étrangères.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*).

*Injection* : 1 μL de la solution à examiner.

*Solution à examiner.* Mettez en suspension 0,2 g d'acide 2-éthylhexanoïque dans 5 mL d'*eau R*, ajoutez 3 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et 5 mL d'*hexane R*. Agitez pendant 1 min et laissez séparer les 2 phases. Utilisez la phase supérieure. Effectuez la chromatographie selon les conditions de l'essai de l'acide 2-éthylhexanoïque prescrit dans la monographie *Amoxicilline sodique (0577)*.

*Limite.* La surface totale des pics, autres que le pic du solvant et le pic principal, n'est pas supérieure à 2,5 pour cent de la surface du pic principal.

***N*-Ethylmaléimide.** $C_6H_7NO_2$. ($M_r$ 125,1). *1036700.* [128-53-0].
1-Ethyl-1*H*-pyrrole-2,5-dione.

Cristaux incolores, assez solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : 41 °C à 45 °C.

*Conservation* : à une température de 2 °C à 8 °C.

**2-Ethyl-2-méthylsuccinique (acide).** $C_7H_{12}O_4$. ($M_r$ 160,2). *1036800.* [631-31-2].

Acide 2-éthyl-2-méthylbutanedioïque.

F : 104 °C à 107 °C.

**2-Ethylpyridine.** $C_7H_9N$. ($M_r$ 107,2). *1133400.* [100-71-0].

Liquide incolore ou brunâtre.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,939.

$n_D^{20}$ : environ 1,496.

Eb : environ 149 °C.

**Ethylvinylbenzène-divinylbenzène (copolymère).** *1036900.*

Consiste en un polymère réticulé, poreux et rigide qui se présente sous forme de billes. Il est classé en plusieurs catégories définies par les dimensions des billes indiquées après le nom du réactif, dans les essais où il est utilisé.

**Ethylvinylbenzène-divinylbenzène (copolymère) R1.** *1036901.*

Consiste en un polymère réticulé, poreux et rigide, d'une surface spécifique nominale de 500-600 $m^2/g$ et ayant des pores d'un diamètre moyen de 7,5 nm. Il existe en plusieurs types définis par les dimensions des billes indiquées après le nom du réactif, dans les essais où il est utilisé.

**Eugénol.** $C_{10}H_{12}O_2$. ($M_r$ 164,2). *1037000.* [97-53-0].
4-Allyl-2-méthoxyphénol.

Liquide huileux, incolore ou jaune pâle, se colorant par exposition à l'air et à la lumière et devenant plus visqueux, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent, aux huiles grasses et aux huiles essentielles.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,07.

Eb : environ 250 °C.

*L'eugénol utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de clou de girofle (1091)*.

*Solution à examiner.* L'eugénol à examiner.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Euglobulines bovines.** *1037100.*

Le sang bovin utilisé dans cette préparation est du sang frais recueilli sur anticoagulant, par exemple une solution de citrate de sodium. Si le sang est hémolysé, rejetez-le. Centrifugez les prélèvements de sang à 1500-1800 *g* à 15-20 °C, afin d'obtenir un plasma surnageant pauvre en plaquettes.

A 1 L de plasma bovin, ajoutez 75 g de *sulfate de baryum R* et agitez pendant 30 min. Centrifugez à au moins 1500-1800 *g* à 15-20 °C. Recueillez le surnageant limpide. Ajoutez 10 mL d'une solution d'*aprotinine R* à 0,2 mg/mL et mélangez en agitant. Dans un récipient de 30 L au moins placé dans une enceinte de 4 °C, introduisez 25 L d'*eau distillée R* refroidie à 4 °C et 500 g environ de neige carbonique. Ajoutez immédiatement en agitant le liquide surnageant obtenu à partir du plasma. Laissez sédimenter à 4 °C, pendant 10-15 h, le précipité blanc qui s'est formé. Eliminez le surnageant par siphonnement. Recueillez le précipité par centrifugation à 4 °C. Mettez le précipité en suspension en le dispersant mécaniquement dans 500 mL d'*eau distillée R*, refroidie à 4 °C, agitez pendant 5 min et recueillez le précipité par centrifugation à 4 °C. Dispersez-le mécaniquement dans 60 mL d'une solution contenant 9 g/L de *chlorure de sodium R* et 0,9 g/L de *citrate de sodium R*. Ajustez à pH 7,2-7,4 par addition d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 10 g/L. Filtrez sur un filtre de verre fritté (*2.1.2*) en favorisant la dissolution du précipité par division de ses particules à l'aide d'un instrument approprié. Rincez le filtre et l'instrument avec 40 mL de la solution chlorure-citrate décrite ci-dessus et complétez à 100 mL avec la même solution. Procédez à la cryodessiccation. Le procédé permet d'obtenir 6 g à 8 g d'euglobulines par litre de plasma bovin.

*Essai de validité.* Préparez les solutions utilisées dans cet essai dans la *solution tampon phosphate pH 7,4 R* contenant 30 g/L d'*albumine bovine R*.

Dans un tube à essai d'un diamètre de 8 mm, placé dans un bain-marie à 37 °C, introduisez 0,2 mL d'une solution d'une préparation de référence d'urokinase dont l'activité urokinase est de 100 UI/mL, 0,1 mL d'une *solution de thrombine humaine R* contenant 20 UI/mL. Ajoutez rapidement 0,5 mL d'une solution contenant 10 mg d'euglobulines bovines par millilitre. Il se forme un caillot de consistance ferme en moins

4. Réactifs

de 10 s. Notez le temps écoulé entre l'addition de la solution d'euglobulines bovines et la lyse du caillot. Le temps de lyse ne dépasse pas 15 min.

*Conservation* : à l'abri de l'humidité, à une température de 4 °C pendant 1 an au maximum.

**Euglobulines humaines.** *1037200.*

Le sang humain utilisé dans cette préparation peut être soit du sang frais recueilli sur anticoagulant, par exemple solution de citrate de sodium, soit du sang pour transfusion recueilli en poches à sang en matière plastique et dont la date limite d'utilisation vient d'être atteinte. Si le sang est hémolysé, rejetez-le. Centrifugez les prélèvements de sang à 1500-1800 *g* à 15 °C, afin d'obtenir un plasma surnageant pauvre en plaquettes. Les plasmas iso-groupes peuvent être mélangés.

A 1 L de plasma, ajoutez 75 g de *sulfate de baryum R* et agitez pendant 30 min. Centrifugez à au moins 15 000 *g* à 15 °C. Recueillez le surnageant limpide. Ajoutez 10 mL d'une solution d'*aprotinine R* à 0,2 mg/mL et mélangez en agitant. Dans un récipient de 30 L au moins placé dans une enceinte à 4 °C, introduisez 25 litres d'*eau distillée R* refroidie à 4 °C et 500 g environ de neige carbonique. Ajoutez immédiatement et en agitant le surnageant obtenu à partir du plasma. Laissez sédimenter pendant 10-15 h le précipité blanc qui se forme à 4 °C. Eliminez le surnageant par siphonnement. Recueillez le précipité par centrifugation à 4 °C. Mettez le précipité en suspension en le dispersant mécaniquement dans 500 mL d'*eau distillée R*, refroidie à 4 °C. Agitez pendant 5 min. Recueillez le précipité en répétant la centrifugation à 4 °C. Dispersez-le mécaniquement dans 60 mL d'une solution contenant 9 g/L de *chlorure de sodium R* et 0,9 g/L de *citrate de sodium R*. Ajustez le pH à 7,2-7,4 par addition d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 10 g/L. Filtrez sur un filtre de verre fritté (*2.1.2*) en favorisant la dissolution du précipité par division de ses particules à l'aide d'un instrument approprié. Rincez le filtre et l'instrument avec 40 mL de la solution chlorure-citratée décrite ci-dessus et complétez à 100 mL avec la même solution. Procédez à la cryodessiccation. Le procédé permet d'obtenir 6 g à 8 g d'euglobulines par litre de plasma humain.

*Essai de validité.* Préparez les solutions utilisées dans cet essai dans la *solution tampon phosphate pH 7,2 R* contenant 30 g/L d'*albumine bovine R*.

Dans un tube à essai d'un diamètre de 8 mm, placé dans un bain-marie à 37 °C, introduisez 0,1 mL d'une solution d'une préparation de référence de streptokinase dont l'activité streptokinase est de 10 UI/mL, 0,1 mL d'une *solution de thrombine humaine R* contenant 20 UI/mL. Ajoutez rapidement 1 mL d'une solution contenant 10 mg d'euglobulines humaines par millilitre. Il se forme un caillot à consistance ferme en moins de 10 s. Notez le temps écoulé entre l'addition de la solution d'euglobulines humaines et la lyse du caillot. Le temps de lyse ne dépasse pas 15 min.

*Conservation* : en récipient étanche, à une température de 4 °C pendant 1 an au maximum.

**Facteur V de coagulation (solution de).** *1021400.*

La solution du facteur V peut être préparée par la méthode suivante ou par une autre méthode, qui exclut la présence du facteur VIII. Préparez le facteur V à partir de plasma bovin frais oxalaté, en fractionnant à 4 °C, avec une solution saturée de sulfate d'ammonium R préparée à 4 °C. Prélevez la fraction qui précipite entre 38 pour cent et 50 pour cent de saturation (fraction contenant le facteur V sans contamination significative par le facteur VIII). Eliminez le sulfate d'ammonium par dialyse et diluez la solution avec une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L de façon à obtenir une solution contenant de 10 pour cent à 20 pour cent de la quantité du facteur V présent dans le plasma humain normal frais.

*Dosage du facteur V.* Préparez 2 dilutions de la préparation du facteur V dans la *solution tampon imidazole pH 7,3 R*, contenant 1 volume de la préparation, l'une dans 10 volumes et l'autre dans 20 volumes de la solution tampon. Effectuez l'essai sur chaque dilution : mélangez 0,1 mL de *substrat de plasma déficient en facteur V R*, 0,1 mL de solution à examiner, 0,1 mL de *thromboplastine F R* et 0,1 mL de solution de *chlorure de calcium R* à 3,5 g/L, puis enregistrez le temps de coagulation, c'est-à-dire l'intervalle entre le moment de l'addition de la solution de chlorure de calcium et la première indication de la formation de fibrine. Observez visuellement ou à l'aide d'un appareil approprié.

Déterminez en double dans les mêmes conditions les temps de coagulation de 4 dilutions de plasma humain normal dans la *solution tampon imidazole pH 7,3 R*, à raison respectivement de 1 volume dans 10 (équivalent à 100 pour cent de facteur V), de 1 volume dans 50 (20 pour cent), de 1 volume dans 100 (10 pour cent), et de 1 volume dans 1000 (1 pour cent). Sur du papier logarithmique, portez la moyenne des temps de coagulation pour chaque dilution de plasma humain par rapport au pourcentage équivalent de facteur V et lisez le pourcentage de facteur V pour les 2 dilutions de la solution de facteur V par interpolation. La moyenne des 2 résultats donne le pourcentage du facteur V dans la solution à examiner.

*Conservation* : à l'état congelé, à une température égale ou inférieure à – 20 °C.

**Facteur Xa de coagulation sanguine bovin.** *1037300.* [9002-05-5].

Enzyme qui permet la conversion de la prothrombine en thrombine. La préparation semi-purifiée est obtenue à partir de plasma bovin liquide et le facteur Xa peut être préparé par activation du zymogène du facteur X au moyen d'un agent approprié tel que le venin de la vipère de Russell.

*Conservation* : à – 20 °C pour la préparation cryodesséchée et à une température inférieure à – 20 °C pour la solution congelée.

**Solution de facteur Xa bovin.** *1037301.*

Reconstituez selon les instructions du fabricant et diluez avec la *solution tampon tris(hydroxyméthyl)-aminométhane-chlorure de sodium pH 7,4 R*.

L'absorbance de la solution mesurée à 405 nm (*2.2.25*) en prenant la *solution tampon tris(hydroxyméthyl)-aminométhane-chlorure de sodium pH 7,4 R* à laquelle on a soustrait l'absorbance du blanc n'est pas supérieure à 0,20 par minute.

**Solution de facteur Xa bovin R1.** *1037302.*

Reconstituez selon les instructions du fabricant et diluez à 1,4 nkat/mL avec de la *solution tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane-EDTA pH 8,4 R*.

***(E,E)*-Farnésol.** $C_{15}H_{26}O$. ($M_r$ 222,4). *1161000.* [106-28-5]. *trans,trans*-Farnésol. (2*E*,6*E*)-3,7,11-Triméthyldodéca-2,6,10-trién-1-ol.

**Fenchlorphos.** $C_8H_8Cl_3O_3PS$. ($M_r$ 321,5). *1127200.* [299-84-3].

F : environ 35 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Fenchone.** $C_{10}H_{16}O$. ($M_r$ 152,2). *1037600.* [7787-20-4]. (1*R*)-1,3,3-Triméthylbicyclo[2.2.1]heptan-2-one.

Liquide huileux, miscible à l'éthanol à 96 pour cent, pratiquement insoluble dans l'eau.

$n_D^{20}$ : environ 1,46.

$Eb_{15mm}$ : 192 °C à 194 °C.

*La fenchone utilisée en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Fruit de fenouil amer (0824)*.

*Solution à examiner.* La fenchone à examiner.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Fenvalérate.** $C_{25}H_{22}ClNO_3$. ($M_r$ 419,9). *1127300.* [51630-58-1].
Eb : environ 300 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Fer.** Fe. ($A_r$ 55,85). *1046600.* [7439-89-6].

Poudre ou fil de couleur grise, soluble dans les acides minéraux dilués.

**Ferreux (sulfate).** *1038300.* [7782-63-0].

Voir *Sulfate ferreux heptahydraté (0083).*

**Solution de sulfate ferreux R2.** *1038301.*

Dissolvez 0,45 g de *sulfate ferreux R* dans 50 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* et complétez à 100 mL avec de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R*. Préparez extemporanément.

**Ferreux et d'ammonium (sulfate).** $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2,6H_2O$. ($M_r$ 392,2). *1038200.* [7783-85-9]. Bis(sulfate) de diammonium et de fer hexahydraté.

Cristaux ou granulés vert-bleu pâle, facilement solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Ferrique (chlorure).** $FeCl_3,6H_2O$. ($M_r$ 270,3). *1037800.* [10025-77-1]. Trichlorure de fer hexahydraté.

Masses cristallisées jaune orangé ou brunâtres, déliquescentes, très solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent. Exposé à la lumière, le chlorure ferrique ainsi que ses solutions subissent une réduction partielle.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Réactif au chlorure ferrique-acide sulfamique.** *1037804.*

Solution contenant 10 g/L de *chlorure ferrique R* et 16 g/L d'*acide sulfamique R*.

**Réactif au chlorure ferrique-ferricyanure-arsénite.** *1037805.*

Immédiatement avant utilisation, mélangez 10 mL d'une solution de *chlorure ferrique R* à 27 g/L dans l'*acide chlorhydrique dilué R*, 7 mL de *solution de ferricyanure de potassium R*, 3 mL d'*eau R* et 10 mL de *solution d'arsénite de sodium R*.

**Solution de chlorure ferrique R1.** *1037801.*

Solution à 105 g/L.

**Solution de chlorure ferrique R2.** *1037802.*

Solution à 13 g/L.

**Solution de chlorure ferrique R3.** *1037803.*

Dissolvez 2,0 g de *chlorure ferrique R* dans de l'*éthanol anhydre R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

**Ferrique et d'ammonium (sulfate).** $FeNH_4(SO_4)_2,12H_2O$. ($M_r$ 482,2). *1037700.* [7783-83-7]. Bis(sulfate) d'ammonium et de fer dodécahydraté.

Cristaux violet pâle, efflorescents, très solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution de sulfate ferrique et d'ammonium R2.** *1037702.*

Solution à 100 g/L. Si nécessaire, filtrez avant l'emploi.

**Solution de sulfate ferrique et d'ammonium R5.** *1037704.*

Agitez 30,0 g de *sulfate ferrique et d'ammonium R* avec 40 mL d'*acide nitrique R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*. Si la solution est trouble, centrifugez ou filtrez.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Solution de sulfate ferrique et d'ammonium R6.** *1037705.*

Dissolvez 20 g de *sulfate ferrique et d'ammonium R* dans 75 mL d'*eau R*, ajoutez 10 mL d'une solution d'*acide sulfurique R* à 2,8 pour cent *V/V* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

**Ferrique (sulfate).** $Fe_2(SO_4)_3,xH_2O$. *1037900.* [10028-22-5]. Tri(sulfate) de fer(III) hydraté.

Poudre blanc-jaune, très hygroscopique, se décomposant à l'air, peu soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche, à l'abri de la lumière.

**Ferrique (sulfate) pentahydraté.** $Fe_2(SO_4)_3,5H_2O$. ($M_r$ 489,9). *1153700.* [142906-29-4].

Poudre blanche ou jaunâtre.

**Ferrocyphène.** $C_{26}H_{16}FeN_6$. ($M_r$ 468,3). *1038000.* [14768-11-7]. Dicyanobis(1,10-phénanthroline)fer(II).

Poudre cristalline de couleur bronze violet, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : à l'abri de la lumière et de l'humidité.

**Ferroïne.** *1038100.* [14634-91-4].

Dissolvez 0,7 g de *sulfate ferreux R* et 1,76 g de *chlorhydrate de phénanthroline R* dans 70 mL d'*eau R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

*Essai de sensibilité.* A 50 mL d'*acide sulfurique dilué R*, ajoutez 0,15 mL de solution de *tétraoxyde d'osmium R* et 0,1 mL de ferroïne. Après addition de 0,1 mL de *nitrate d'ammonium et de cérium 0,1 M*, la coloration vire du rouge au bleu pâle.

**Fer (salicylate de), solution de.** *1046700.*

Dissolvez 0,1 g de *sulfate ferrique et d'ammonium R* dans un mélange de 2 mL d'*acide sulfurique dilué R* et de 48 mL d'*eau R*, puis complétez à 100 mL avec de l'*eau R*. A cette solution, ajoutez 50 mL d'une solution de *salicylate de sodium R* à 11,5 g/L, 10 mL d'*acide acétique dilué R* et 80 mL d'une solution d'*acétate de sodium R* à 136 g/L, puis complétez à 500 mL avec de l'*eau R*. Utilisez une solution récemment préparée.

*Conservation* : en récipient étanche, à l'abri de la lumière.

**Férulique (acide).** $C_{10}H_{10}O_4$. ($M_r$ 194,2). *1149500.* [1135-24-6]. Acide 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique. Acide 3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)propénoïque.

Poudre faiblement jaune, facilement soluble dans le méthanol.

F : 172,9 °C à 173,9 °C.

*L'acide férulique utilisé dans le dosage des éleuthérosides de l'Eleuthérocoque (1419) satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications données dans la monographie *Eleuthérocoque (1419)*.

*Teneur* : au minimum 99 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Fibrine-bleu.** *1101400.*

Mélangez 1,5 g de fibrine dans 30 mL d'une solution *carmin d'indigo R* à 5 g/L dans de l'*acide chlorhydrique dilué R* à 1 pour cent *V/V*. Chauffez à 80 °C et maintenez à cette température tout en agitant le mélange pendant environ 30 min. Laissez refroidir et filtrez. Lavez abondamment par resuspension dans de l'*acide chlorhydrique dilué R* à 1 pour cent *V/V*, mélangez pendant environ 30 min puis filtrez. Répétez 3 fois l'opération de lavage. Séchez à 50 °C. Broyez.

**Fibrine-rouge Congo.** *1038400.*

Utilisez 1,5 g de fibrine et laissez en contact pendant une nuit dans 50 mL d'une solution de *rouge Congo R* à 20 g/L dans l'*éthanol à 90 pour cent V/V R*. Filtrez, rincez la fibrine à l'*eau R* et conservez-la dans l'*éther R*.

**Fibrinogène.** *1038500.* [9001-32-5].

Voir *Fibrinogène humain cryodesséché (0024).*

**Flufénamique (acide).** $C_{14}H_{10}F_3NO_2$. ($M_r$ 281,2). *1106200.* [530-78-9]. Acide 2-[[3-(trifluorométhyl)phényl]amino]benzoïque.

Poudre cristalline ou aiguilles jaune pâle, pratiquement insolubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : 132 °C à 135 °C.

4. Réactifs

**Flumazénil.** *1149600.* [78755-81-4].

Voir *Flumazénil (1326).*

**Flunitrazépam.** *1153800.* [1622-62-4].

Voir *Flunitrazépam (0717).*

**Fluoranthène.** $C_{16}H_{10}$. ($M_r$ 202,3). *1038600.* [206-44-0]. 1,2-(1,8-Naphtylène)benzène. 1,2-Benzacenaphtène.

Cristaux jaunes ou brun-jaune.

Eb : environ 384 °C.

F : 109 °C à 110 °C.

**Fluorène.** $C_{13}H_{10}$. ($M_r$ 166,2). *1127400.* [86-73-7]. Diphénylèneméthane.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, facilement solubles dans l'acide acétique anhydre, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent chaud.

F : 113 °C à 115 °C.

**Fluorescamine.** $C_{17}H_{10}O_4$. ($M_r$ 278,3). *1135800.* [38183-12-9]. 4-Phénylspiro[furane-2(3*H*),1′(3′*H*)-isobenzofurane]-3,3′-dione.

F : 154 °C à 155 °C.

**Fluorescéine.** $C_{20}H_{12}O_5$. ($M_r$ 332,3). *1106300.* [2321-07-5]. 3′,6′-Dihydroxyspiro[isobenzofurane-1(3*H*),9′-[9*H*]xanthén]-3-one.

Poudre rouge orangé, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent chaud, soluble dans les solutions alcalines. En solution, la fluorescéine présente une fluorescence verte.

F : environ 315 °C.

**Fluorhydrique (acide).** HF. ($M_r$ 20,01). *1043600.* [7664-39-3].

*Teneur* : au minimum 40,0 pour cent *m/m*.

Liquide limpide et incolore.

*Perte à la calcination* : au maximum 0,05 pour cent *m/m* ; évaporez l'acide fluorhydrique dans un creuset de platine et calcinez doucement jusqu'à masse constante.

*Dosage.* Pesez exactement une fiole à bouchon rodé contenant 50,0 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M.* Introduisez 2 g d'acide fluorhydrique et pesez de nouveau. Titrez la solution par l'*acide sulfurique 0,5 M* en présence de 0,5 mL de *solution de phénolphtaléine R*.

1 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* correspond à 20,01 mg de HF.

*Conservation* : en récipient de polyéthylène.

**2-Fluoro-2-désoxy-D-glucose.** $C_6H_{11}FO_5$. ($M_r$ 182,2). *1113900.* [86783-82-6].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche.

F : 174 °C à 176 °C.

**2-Fluoro-2-désoxy-D-mannose.** $C_6H_{11}FO_5$. ($M_r$ 182,1). *1172100.* [38440-79-8].

Semi-solide incolore.

**Fluorodinitrobenzène.** $C_6H_3FN_2O_4$. ($M_r$ 186,1). *1038800.* [70-34-8]. 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzène.

Cristaux jaune pâle, solubles dans le propylèneglycol.

F : environ 29 °C.

**DL-6-Fluorodopa (chlorhydrate de).** $C_9H_{11}ClFNO_4$. ($M_r$ 251,6). *1169200.* Chlorhydrate de l'acide (2*RS*)-2-amino-3-(2-fluoro-4,5-dihydroxyphényl)propanoïque. Chlorhydrate de 2-fluoro-5-hydroxy-DL-tyrosine.

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

**6-Fluorolévodopa (chlorhydrate de).** $C_9H_{11}ClFNO_4$. ($M_r$ 251,6). *1169300.* [144334-59-8]. Chlorhydrate de l'acide (2*S*)-2-amino-3-(2-fluoro-4,5-dihydroxyphényl)propanoïque. Chlorhydrate de 2-fluoro-5-hydroxy-L-tyrosine.

Solide incolore ou presque incolore, soluble dans l'eau.

**1-Fluoro-2-nitro-4(trifluorométhyl)benzène.** $C_7H_3F_4NO_2$. ($M_r$ 209,1). *1038900.* [367-86-2].

F : environ 197 °C.

**Folique (acide).** *1039000.* [75708-92-8].

Voir *Acide folique (0067).*

**Formaldéhyde.** *1039100.* [50-00-0].

Voir *Formaldéhyde (solution de) R.*

**Formaldéhyde (solution de).** *1039101.*

Voir *Solution de formaldéhyde à 35 pour cent (0826).*

**Formamide.** $CH_3NO$. ($M_r$ 45,0). *1039200.* [75-12-7].

Liquide huileux, limpide et incolore, hygroscopique, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent. Le formamide s'hydrolyse dans l'eau.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,134.

Eb : environ 210 °C.

*Teneur* : au minimum 99,5 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Formamide R1.** *1039202.*

Satisfait aux spécifications du *formamide R* et à la spécification supplémentaire suivante.

*Eau* (*2.5.12*) : au maximum 0,1 pour cent, déterminé avec un volume égal de *méthanol anhydre R.*

**Formamide traité.** *1039201.*

Dispersez 1,0 g d'*acide sulfamique R* dans 20,0 mL de *formamide R* contenant 5 pour cent *V/V* d'*eau R.*

**Formique (acide) anhydre.** $CH_2O_2$. ($M_r$ 46,03). *1039300.* [64-18-6].

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent *m/m*.

Liquide incolore, corrosif, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,22.

*Dosage.* Pesez exactement une fiole conique contenant 10 mL d'*eau R*, introduisez rapidement 1 mL d'acide formique anhydre et pesez de nouveau. Ajoutez encore 50 mL d'*eau R* et titrez par l'*hydroxyde de sodium 1 M* en présence de 0,5 mL de *solution de phénolphtaléine R.*

1 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* correspond à 46,03 mg de $CH_2O_2$.

**Fructose.** *1106400.* [57-48-7].

Voir *Fructose (0188).*

**Fuchsine basique.** *1039400.* [632-99-5].

Mélange de chlorhydrate de rosaniline ($C_{20}H_{20}ClN_3$ ; $M_r$ 337,9 ; Colour Index n° : 42510 ; Schultz n° : 780) et de chlorhydrate de pararosaniline ($C_{19}H_{18}ClN_3$ ; $M_r$ 323,8 ; Colour Index n° : 42500 ; Schultz n° : 779).

Si nécessaire, purifiez de la façon suivante : dissolvez 1 g de fuchsine basique dans 250 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* ; laissez reposer la solution pendant 2 h à température ambiante, puis filtrez ; neutralisez par la solution diluée d'*hydroxyde de sodium R* et ajoutez 1-2 mL de cette solution en excès ; filtrez le précipité sur un filtre en verre fritté (40) (*2.1.2*) et lavez-le à l'eau R ; dissolvez le précipité dans 70 mL de *méthanol R*, chauffez au préalable à ébullition, puis ajoutez 300 mL d'*eau R* à 80 °C ; refroidissez à température ambiante ; filtrez les cristaux et séchez-les sous vide.

Cristaux à reflet vert bronze, solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Solution de fuchsine décolorée.** *1039401.*

Dissolvez 0,1 g de *fuchsine basique R* dans 60 mL d'*eau R.* Ajoutez une solution de 1 g de *sulfite de sodium anhydre R* ou 2 g de *sulfite de sodium R* dans 10 mL d'*eau R*, puis

lentement et en agitant 2 mL d'*acide chlorhydrique R*. Complétez à 100 mL avec de l'*eau R*. Laissez reposer à l'abri de la lumière pendant 12 h au moins, décolorez la solution par addition de *charbon activé R* et filtrez. Si la solution devient trouble, filtrez avant l'emploi. Si la solution prend à la longue une coloration violette, décolorez de nouveau en ajoutant du *charbon activé R*.

*Essai de sensibilité.* A 1,0 mL de solution de fuchsine décolorée, ajoutez 1,0 mL d'*eau R*, 0,1 mL d'*alcool exempt d'aldéhyde R*, puis 0,2 mL d'une solution contenant 0,1 g/L de formaldéhyde $CH_2O$ ($M_r$ 30,0). Il se développe une coloration rose pâle après 5 min.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Solution de fuchsine décolorée R1.** *1039402.*

A 1 g de *fuchsine basique R*, ajoutez 100 mL d'*eau R*. Chauffez à 50 °C, puis laissez refroidir en agitant de temps en temps. Laissez reposer pendant 48 h, agitez, puis filtrez. A 4 mL du filtrat, ajoutez 6 mL d'*acide chlorhydrique R*, mélangez et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*. Laissez reposer pendant 1 h au moins avant l'utilisation.

**Fucose.** $C_6H_{12}O_5$. ($M_r$ 164,2). *1039500.* [6696-41-9]. 6-Désoxy-L-galactose.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

$[\alpha]_D^{20}$ : environ – 76 °C, mesuré avec une solution à 90 g/L, 24 h après sa préparation.

F : environ 140 °C.

**Fumarique (acide).** $C_4H_4O_4$. ($M_r$ 116,1). *1153200.* [110-17-8]. Acide (*E*)-butènedioïque.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, peu solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent, peu solubles dans l'acétone.

F : environ 300 °C.

**Furfural.** $C_5H_4O_2$. ($M_r$ 96,1). *1039600.* [98-01-1]. 2-Furaldéhyde. 2-Furanecarbaldéhyde.

Liquide huileux limpide, incolore ou jaune brunâtre, soluble dans 11 parties d'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : 1,155 à 1,161.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : au minimum 95 pour cent distillent de 159 °C à 163 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Gaïac (résine de).** *1041400.*

Résine extraite du duramen de *Guaiacum officinale* L. et de *Guaiacum sanctum* L.

Morceaux brun-rouge foncé ou vert-brun, durs, vitreux, à cassure luisante.

**Gaïacol.** $C_7H_8O_2$. ($M_r$ 124,1). *1148300.* [90-05-1]. 2-Méthoxyphénol. 1-Hydroxy-2-méthoxybenzène.

Masse cristalline ou liquide incolore ou jaunâtre, hygroscopique, peu soluble dans l'eau, très soluble dans le chlorure de méthylène, facilement soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

Eb : environ 205 °C.

F : environ 28 °C.

**Gaïazulène.** $C_{15}H_{18}$. ($M_r$ 198,3). *1041500.* [489-84-9]. 1,4-Diméthyl-7-isopropylazulène.

Cristaux bleu foncé ou liquide bleu, très peu solubles dans l'eau, miscibles aux huiles grasses et aux huiles essentielles, à la paraffine liquide, assez solubles dans l'éthanol à 96 pour cent, solubles dans l'acide sulfurique à 500 g/L et dans l'acide phosphorique à 80 pour cent *m/m*, en donnant une solution incolore.

F : environ 30 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière et de l'air.

**Galactose.** $C_6H_{12}O_6$. ($M_r$ 180,2). *1039700.* [59-23-4]. D-(+)-Galactose.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, facilement soluble dans l'eau.

$[\alpha]_D^{20}$ : + 79 à + 81, déterminé avec une solution à 100 g/L dans de l'*eau R* contenant 0,05 pour cent environ de $NH_3$.

**Gallique (acide).** $C_7H_6O_5,H_2O$. ($M_r$ 188,1). *1039800.* [5995-86-8]. Acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque monohydraté.

Poudre cristalline ou aiguilles longues, incolores ou faiblement jaunes, solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'eau chaude, dans l'éthanol à 96 pour cent et dans le glycérol.

L'acide gallique perd son eau de cristallisation à 120 °C.

F : environ 260 °C, avec décomposition.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indication données dans la monographie *Feuille de busserole (1054)* ; le chromatogramme présente une seule tache principale.

**Gélatine.** *1040000.* [9000-70-8].

Voir *Gélatine (0330).*

**Gélatine hydrolysée.** *1040100.*

Dissolvez 50 g de *gélatine R* dans 1000 mL d'*eau R*. Placez en autoclave dans de la vapeur saturée à 121 °C pendant 90 min et cryodesséchez.

**Gel de polyméthacrylate hydroxylé.** *1151300.*

Voir *Polyméthacrylate hydroxylé (gel de) R.*

**Gel de silice AD pour séparation des composés chiraux.** *1171700.*

Voir *Silice (gel de) AD pour séparation des composés chiraux R.*

**Gel de silice à éther-couronne pour chromatographie.** *1178000.*

Voir *Silice (gel de) à éther-couronne pour chromatographie R.*

**Gel de silice AGP pour séparation des composés chiraux.** *1148700.*

Voir *Silice (gel de) AGP pour séparation des composés chiraux R.*

**Gel de silice alkylé postgreffé pour chromatographie à utiliser avec des phases mobiles fortement aqueuses.** *1176900.*

Voir *Silice (gel de) alkylé postgreffé pour chromatographie à utiliser avec des phases mobiles fortement aqueuses R.*

**Gel de silice alkylé pour chromatographie à utiliser avec des phases mobiles fortement aqueuses.** *1160200.*

Voir *Silice (gel de) alkylé pour chromatographie à utiliser avec des phases mobiles fortement aqueuses R.*

**Gel de silice amidohexadécylsilylé pour chromatographie.** *1170400.*

Voir *Silice (gel de) amidohexadécylsilylé pour chromatographie R.*

**Gel de silice aminohexadécylsilylé pour chromatographie.** *1138400.*

Voir *Silice (gel de) aminohexadécylsilylé pour chromatographie R.*

**Gel de silice aminopropylméthylsilylé pour chromatographie.** *1102400.*

Voir *Silice (gel de) aminopropylméthylsilylé pour chromatographie R.*

**Gel de silice aminopropylsilylé pour chromatographie.** *1077000.*

Voir *Silice (gel de) aminopropylsilylé pour chromatographie R.*

**Gel de silice amylosé pour chromatographie.** *1109800.*

Voir *Silice (gel de) amylosé pour chromatographie R.*

4. Réactifs

**Gel de silice anhydre.** *1076100.* [112926-00-8].
Voir *Silice (gel de) anhydre R.*

**Gel de silice BC pour séparation des composés chiraux.** *1161300.*
Voir *Silice (gel de) BC pour séparation des composés chiraux R.*

**Gel de silice butylsilylé postgreffé pour chromatographie.** *1170500.*
Voir *Silice (gel de) butylsilylé postgreffé pour chromatographie R.*

**Gel de silice butylsilylé pour chromatographie.** *1076200.*
Voir *Silice (gel de) butylsilylé pour chromatographie R.*

**Gel de silice cyanosilylé pour chromatographie.** *1109900.*
Voir *Silice (gel de) cyanosilylé pour chromatographie R.*

**Gel de silice diisobutyloctadécylsilylé pour chromatographie.** *1140000.*
Voir *Silice (gel de) diisobutyloctadécylsilylé pour chromatographie R.*

**Gel de silice diisopropylcyanopropylsilylé pour chromatographie.** *1168100.*
Voir *Silice (gel de) diisopropylcyanopropylsilylé pour chromatographie R.*

**Gel de silice diméthyloctadécylsilylé pour chromatographie.** *1115100.*
Voir *Silice (gel de) diméthyloctadécylsilylé pour chromatographie R.*

**Gel de silice diol pour chromatographie.** *1110000.*
Voir *Silice (gel de) diol pour chromatographie R.*

**Gel de silice échangeur d'anions forts pour chromatographie.** *1077800.*
Voir *Silice (gel de) échangeur d'anions forts pour chromatographie R.*

**Gel de silice échangeur de cations forts pour chromatographie.** *1161400.*
Voir *Silice (gel de) échangeur de cations forts pour chromatographie R.*

**Gel de silice G.** *1076300.* [112926-00-8].
Voir *Silice (gel de) G R.*

**Gel de silice $GF_{254}$.** *1076400.* [112926-00-8].
Voir *Silice (gel de) $GF_{254}$ R.*

**Gel de silice H.** *1076500.* [112926-00-8].
Voir *Silice (gel de) H R.*

**Gel de silice hexadécylamidylsilylé postgreffé pour chromatographie.** *1172400.*
Voir *Silice (gel de) hexadécylamidylsilylé postgreffé pour chromatographie R.*

**Gel de silice hexadécylamidylsilylé pour chromatographie.** *1162500.*
Voir *Silice (gel de) hexadécylamidylsilylé pour chromatographie R.*

**Gel de silice hexylsilylé postgreffé pour chromatographie.** *1174400.*
Voir *Silice (gel de) hexylsilylé postgreffé pour chromatographie R.*

**Gel de silice hexylsilylé pour chromatographie.** *1077100.*
Voir *Silice (gel de) hexylsilylé pour chromatographie R.*

**Gel de silice $HF_{254}$.** *1076700.*
Voir *Silice (gel de) $HF_{254}$ R.*

**Gel de silice hydrophile pour chromatographie.** *1077200.*
Voir *Silice (gel de) hydrophile pour chromatographie R.*

**Gel de silice monolithique octadécylsilylé pour chromatographie.** *1154500.*
Voir *Silice (gel de) monolithique octadécylsilylé pour chromatographie R.*

**Gel de silice nitrilé postgreffé pour chromatographie.** *1174500.*
Voir *Silice (gel de) nitrilé postgreffé pour chromatographie R.*

**Gel de silice nitrilé pour chromatographie.** *1077300.*
Voir *Silice (gel de) nitrilé pour chromatographie R.*

**Gel de silice nitrilé pour chromatographie R1.** *1077400.*
Voir *Silice (gel de) nitrilé pour chromatographie R1.*

**Gel de silice nitrilé pour chromatographie R2.** *1119500.*
Voir *Silice (gel de) nitrilé pour chromatographie R2.*

**Gel de silice OC pour séparation des composés chiraux.** *1146800.*
Voir *Silice (gel de) OC pour séparation des composés chiraux R.*

**Gel de silice octadécanoylaminopropylsilylé pour chromatographie.** *1115200.*
Voir *Silice (gel de) octadécanoylaminopropylsilylé pour chromatographie R.*

**Gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie.** *1115400.*
Voir *Silice (gel de) octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie R.*

**Gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie R1.** *1115401.*
Voir *Silice (gel de) octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie R1.*

**Gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie.** *1077500.*
Voir *Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie R.*

**Gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R1.** *1110100.*
Voir *Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie R1.*

**Gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R2.** *1115300.*
Voir *Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie R2.*

**Gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie, à groupements polaires incorporés, postgreffé.** *1165100.*
Voir *Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie, à groupements polaires incorporés, postgreffé R.*

**Gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie, à groupements polaires intercalés, postgreffé.** *1177900.*
Voir *Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie, à groupements polaires intercalés, postgreffé R.*

**Gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé par traitement basique.** *1077600.*
Voir *Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé par traitement basique R.*

**Gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé par traitement basique, postgreffé.** *1108600.*
Voir *Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé par traitement basique, postgreffé R.*

**Gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases.** *1077600.*
Voir *Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases R.*

**Gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases, postgreffé.** *1108600.*

Voir *Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases, postgreffé R.*

**Gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases, postgreffé R1.** *1162600.*

Voir *Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases, postgreffé R1.*

**Gel de silice octylsilylé pour chromatographie.** *1077700.*

Voir *Silice (gel de) octylsilylé pour chromatographie R.*

**Gel de silice octylsilylé pour chromatographie R1.** *1077701.*

Voir *Silice (gel de) octylsilylé pour chromatographie R1.*

**Gel de silice octylsilylé pour chromatographie R2.** *1077702.*

Voir *Silice (gel de) octylsilylé pour chromatographie R2.*

**Gel de silice octylsilylé pour chromatographie R3.** *1155200.*

Voir *Silice (gel de) octylsilylé pour chromatographie R3.*

**Gel de silice octylsilylé pour chromatographie, à groupements polaires incorporés, postgreffé.** *1152600.*

Voir *Silice (gel de) octylsilylé pour chromatographie, à groupements polaires incorporés, postgreffé R.*

**Gel de silice octylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases.** *1131600.*

Voir *Silice (gel de) octylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases R.*

**Gel de silice octylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases, postgreffé.** *1148800.*

Voir *Silice (gel de) octylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases, postgreffé R.*

**Gel de silice octylsilylé postgreffé pour chromatographie.** *1119600.*

Voir *Silice (gel de) octylsilylé postgreffé pour chromatographie R.*

**Gel de silice OD pour séparation des composés chiraux.** *1110300.*

Voir *Silice (gel de) OD pour séparation des composés chiraux R.*

**Gel de silice palmitamidopropylsilylé postgreffé pour chromatographie.** *1161900.*

Voir *Silice (gel de) palmitamidopropylsilylé postgreffé pour chromatographie R.*

**Gel de silice phénylhexylsilylé postgreffé pour chromatographie.** *1170600.*

Voir *Silice (gel de) phénylhexylsilylé postgreffé pour chromatographie R.*

**Gel de silice phénylhexylsilylé pour chromatographie.** *1153900.*

Voir *Silice (gel de) phénylhexylsilylé pour chromatographie R.*

**Gel de silice phénylsilylé pour chromatographie.** *1110200.*

Voir *Silice (gel de) phénylsilylé pour chromatographie R.*

**Gel de silice phénylsilylé pour chromatographie R1.** *1075700.*

Voir *Silice (gel de) phénylsilylé pour chromatographie R1.*

**Gel de silice phénylsilylé postgreffé pour chromatographie.** *1154900.*

Voir *Silice (gel de) phénylsilylé postgreffé pour chromatographie R.*

**Gel de silice pour chromatographie.** *1076900.*

Voir *Silice (gel de) pour chromatographie R.*

**Gel de silice pour chromatographie d'exclusion.** *1077900.*

Voir *Silice (gel de) pour chromatographie d'exclusion R.*

**Gel de silice π-receveur/π-donneur pour séparation des composés chiraux.** *1160100.*

Voir *Silice (gel de) π-receveur/π-donneur pour séparation des composés chiraux R.*

**Gel de silice propoxybenzène postgreffé pour chromatographie.** *1174600.*

Voir *Silice (gel de) propoxybenzène postgreffé pour chromatographie R.*

**Gel de silice propylsilylé pour chromatographie.** *1170700.*

Voir *Silice (gel de) propylsilylé pour chromatographie R.*

**Gel de silice recouvert d'albumine humaine pour chromatographie.** *1138500.*

Voir *Silice (gel de) recouvert d'albumine humaine pour chromatographie R.*

**Gel de silice silanisé H.** *1076600.*

Voir *Silice (gel de) silanisé H R.*

**Gel de silice silanisé $HF_{254}$.** *1076800.*

Voir *Silice (gel de) silanisé $HF_{254}$ R.*

**Gel de silice triméthylsilylé pour chromatographie.** *1115500.*

Voir *Silice (gel de) triméthylsilylé pour chromatographie R.*

**Gel polyéther hydroxylé pour chromatographie.** *1067000.*

Gel de faible granulométrie, présentant une surface hydrophile avec groupement hydroxylés, avec une limite d'exclusion pour le dextran de masse moléculaire relative de $2 \times 10^5$ à $2,5 \times 10^6$.

**Géraniol.** $C_{10}H_{18}O$. ($M_r$ 154,2). *1135900.* [106-24-1]. (*E*)-3,7-Diméthylocta-2,6-dién-1-ol.

Liquide huileux, à faible odeur de rose, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

*Le géraniol utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de citronnelle (1609).*

*Teneur* : au minimum 98,5 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

*Conservation* : en récipient étanche, à l'abri de la lumière.

**Géranyle (acétate de).** $C_{12}H_{20}O_2$. ($M_r$ 196,3). *1106500.* [105-87-3]. Acétate de (*E*)-3,7-diméthylocta-2,6-dién-1-yle.

Liquide incolore ou légèrement jaune, à odeur fine de rose et de lavande.

*L'acétate de géranyle utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de fleur d'oranger amer (1175).*

*Solution à examiner.* L'acétate de géranyle à examiner.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Ginsénoside Rb1.** $C_{54}H_{92}O_{23},3H_2O$. ($M_r$ 1163). *1127500.* [41753-43-9]. (20*S*)-3β-di-D-Glucopyranosyl-20-di-D-glucopyranosylprotopanaxadiol. (20*S*)-3β-[(2-*O*-β-D-Glucopyranosyl-β-D-glucopyranosyl)oxy]- 20-[(6-*O*-β-D-glucopyranosyl-β-D-glucopyranosyl)oxy]-5α-dammar-24-én-12β-ol. (20*S*)-3β-[(2-*O*-β-D-Glucopyranosyl-β-D-glucopyranosyl)oxy]-20-[(6-*O*-β-D-glucopyranosyl-β-D-glucopyranosyl)oxy]-4,4,8,14-tétraméthyl- 18-nor-5α-cholest-24-én-12β-ol.

Solide incolore, soluble dans l'eau, dans l'éthanol anhydre et dans le méthanol.

$[\alpha]_D^{20}$ : + 11,3, déterminé avec une solution à 10 g/L dans le *méthanol R.*

F : environ 199 °C.

*Eau* (*2.5.12*) : au maximum 6,8 pour cent.

4. Réactifs

*Dosage*. Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications données dans la monographie *Ginseng (1523)*.

*Solution à examiner*. Dissolvez 3,0 mg, exactement pesés, de ginsénoside Rb1 dans 10 mL de *méthanol R*.

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Ginsénoside Re.** $C_{48}H_{82}O_{18}$. ($M_r$ 947,2). *1157800*. [52286-59-6]. 2-*O*-(6-Désoxy-α-L-mannopyranosyl)-β-D-glucopyranoside de (3β,6α,12β)-20-(β-D-glucopyranosyloxy)-3,12-dihydroxydammar-24-én-6-yle.

Solide incolore, soluble dans l'eau, dans l'éthanol à 96 pour cent et dans le méthanol.

**Ginsénoside Rf.** $C_{42}H_{72}O_{14}$,$2H_2O$. ($M_r$ 837). *1127700*. [52286-58-5]. (2-*O*-β-D-Glucopyranosyl-β-D-glycopyranoside de 3β,12β,20-trihydroxydammar-24-én-6α-yle.

Solide incolore, soluble dans l'eau, dans l'éthanol anhydre et dans le méthanol.

$[\alpha]_D^{20}$ : + 12,8, déterminé avec une solution à 10 g/L dans le *méthanol R*.

F : environ 198 °C.

**Ginsénoside Rg1.** $C_{42}H_{72}O_{14}$,$2H_2O$. ($M_r$ 837). *1127600*. [22427-39-0]. (20*S*)-6β-D-Glucopyranosyl-D-glucopyranosylprotopanaxatriol. (20*S*)-6α,20-bis(β-D-Glucopyranosyloxy)-5α-dammar-24-ène-3β,12β-diol. (20*S*)-6α,20-bis(β-D-Glucopyranosyloxy)-4,4,8,14-tétraméthyl-18-nor-5α-cholest-24-ène-3β,12β-diol.

Solide incolore, soluble dans l'eau, dans l'éthanol anhydre et dans le méthanol.

$[\alpha]_D^{20}$ : + 31,2, déterminé avec une solution à 10 g/L dans le *méthanol R*.

F : 188 °C à 191 °C.

*Eau* (*2.5.12*) : au maximum 4,8 pour cent.

*Dosage*. Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications données dans la monographie *Ginseng (1523)*.

*Solution à examiner*. Dissolvez 3,0 mg, exactement pesés, de ginsénoside Rg1 dans 10 mL de *méthanol R*.

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Gitoxine.** $C_{41}H_{64}O_{14}$. ($M_r$ 781). *1040200*. [4562-36-1]. Hétéroside de *Digitalis purpurea* L. 3β-(*O*-2,6-didésoxy-β-d-*ribo*-hexopyranosyl-(1→4)-*O*-2,6-didésoxy-β-d-*ribo*-hexopyranosyl-(1→4)-2,6-didésoxy-β-d-*ribo*-hexopyranosyloxy)-14,16β-dihydroxy-5β,14β-card-20(22)-énolide.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques usuels, soluble dans la pyridine.

$[\alpha]_D^{20}$ : + 20 à + 24, déterminé avec une solution à 5 g/L dans un mélange à volumes égaux de *chloroforme R* et de *méthanol R*.

*Chromatographie*. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Feuille de digitale pourprée (0117)* ; le chromatogramme présente une seule tache principale.

**Glucosamine (chlorhydrate de).** $C_6H_{14}ClNO_5$. ($M_r$ 215,6). *1040300*. [66-84-2]. Chlorhydrate de D-glucosamine.

Cristaux solubles dans l'eau.

$[\alpha]_D^{20}$ : + 100, déterminé avec une solution à 100 g/L ; le pouvoir rotatoire spécifique diminue jusqu'à + 47,5 après 30 min.

**Glucose.** *1025700*. [50-99-7].

Voir *Glucose anhydre (0177)*.

**D-Glucuronique (acide).** $C_6H_{10}O_7$. ($M_r$ 194,1). *1119700*. [6556-12-3].

*Teneur* : au minimum 96,0 pour cent, calculé par rapport à la substance desséchée sous vide (*2.2.32*).

Soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

Mutarotation :$[\alpha]_D^{24}$ : + 11,7 → + 36,3.

*Dosage*. Dissolvez 0,150 g d'acide D-glucuronique dans 50 mL de *méthanol anhydre R*, en agitant sous azote. Titrez par l'*hydroxyde de tétrabutylammonium 0,1 M*, en opérant à l'abri du dioxyde de carbone atmosphérique pendant la solubilisation et le titrage. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (*2.2.20*).

1 mL d'*hydroxyde de tétrabutylammonium 0,1 M* correspond à 19,41 mg de $C_6H_{10}O_7$.

**Glutamyl endopeptidase pour cartographie peptidique.** *1173300*. [137010-42-5]. Endoprotéinase Glu-C hautement purifiée de la souche V8 de *Staphylococcus aureus* (EC 3.4.21.19).

**L-γ-Glutamyl-L-cystéine.** $C_8H_{14}N_2O_5S$. ($M_r$ 250,3). *1157900*. [636-58-8].

**Glutamique (acide).** *1040400*. [56-86-0].

Voir *Acide glutamique (0750)*.

**Glutaraldéhyde.** $C_5H_8O_2$. ($M_r$ 100,1). *1098300*. [111-30-8].

Liquide huileux, soluble dans l'eau.

$n_D^{25}$ : environ 1,434.

Eb : environ 188 °C.

**Glutarique (acide).** $C_5H_8O_4$. ($M_r$ 132,1). *1149700*. [110-94-1]. Acide pentanedioïque.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche.

**L-Glutathion oxydé.** $C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$. ($M_r$ 612,6). *1158000*. [27025-41-8]. Disulfure de bis(L-γ-glutamyl-L-cystéinylglycine).

**Glycérol.** *1040500*. [56-81-5].

Voir *Glycérol (0496)*.

**Glycérol R1.** *1040501*.

Satisfait aux spécifications de la monographie *Glycérol (0496)* et ne contient pas de diéthylèneglycol quand il est examiné selon l'essai Impureté A et substances apparentées de cette monographie.

**Glycérol à 85 pour cent.** *1040600*.

Voir *Glycérol à 85 pour cent (0497)*.

**Glycérol à 85 pour cent R1.** *1040601*.

Satisfait aux spécifications de la monographie *Glycérol à 85 pour cent (0497)* et ne contient pas de diéthylèneglycol quand il est examiné selon l'essai Impureté A et substances apparentées de cette monographie.

**Glycérol (1-décanoate de).** $C_{13}H_{26}O_4$. ($M_r$ 246,3). *1169400*. [2277-23-8]. Décanoate de (2*RS*)-2,3-dihydroxypropyle. α-Monocaprine. 1-Monodécanoyl-*rac*-glycérol.

*Teneur* : environ 99 pour cent.

**Glycérol (1-octanoate de).** $C_{11}H_{22}O_4$. ($M_r$ 218,3). *1169500*. [502-54-5]. Octanoate de (2*RS*)-2,3-dihydroxypropyle. α-Monocapryline. 1-Monooctanoyl-*rac*-glycérol.

*Teneur* : environ 99 pour cent.

**Glycidol.** $C_3H_6O_2$. ($M_r$ 74,1). *1127800*. [556-52-5].

Liquide légèrement visqueux, miscible à l'eau.

$d_4^{20}$ : environ 1,115.

$n_D^{20}$ : environ 1,432.

**Glycine.** *1040700*. [56-40-6].

Voir *Glycine (0614)*.

**Glycolique (acide).** $C_2H_4O_3$. ($M_r$ 76,0). *1040800*. [79-14-1]. Acide 2-hydroxyacétique.

Cristaux solubles dans l'eau, dans l'acétone, dans l'éthanol à 96 pour cent et dans le méthanol.

F : environ 80 °C.

**Glycyrrhétique (acide).** $C_{30}H_{46}O_4$. ($M_r$ 470,7). *1040900.* [471-53-4]. Acide glycyrrhétinique. Acide 12,13-didéhydro-3β-hydroxy-11-oxo-oléan-30-oïque.

Mélange d'acide α-glycyrrhétique et d'acide β-glycyrrhétique, avec prédominance de l'isomère β.

Poudre blanche ou brun-jaune, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol anhydre et dans l'acide acétique glacial.

$[\alpha]_D^{20}$ : + 145 à + 155, déterminé avec une solution à 10,0 g/L dans l'*éthanol anhydre R*.

*Chromatographie*. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) en utilisant une plaque recouverte de *gel de silice $GF_{254}$ R* préparée avec une solution d'*acide phosphorique R* à 0,25 pour cent *V/V*. Déposez sur la plaque 5 µL d'une solution d'acide glycyrrhétique à 5 g/L dans un mélange à volumes égaux de *chloroforme R* et de *méthanol R*. Développez sur un parcours de 10 cm avec un mélange de 5 volumes de *méthanol R* et de 95 volumes de *chloroforme R*. Examinez le chromatogramme en lumière ultraviolette à 254 nm. Le chromatogramme présente une tache sombre d'un $R_F$ d'environ 0,3 correspondant à l'acide β-glycyrrhétique et une tache plus petite d'un $R_F$ d'environ 0,5 correspondant à l'acide α-glycyrrhétique. Pulvérisez ensuite la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 10 min. Ces 2 taches sont colorées en bleu-violet. Il peut apparaître entre celles-ci une plus petite tache colorée en bleu-violet également.

**18α-Glycyrrhétinique (acide).** $C_{30}H_{46}O_4$. ($M_r$ 470,7). *1127900.* [1449-05-4]. Acide (20β)-3β-hydroxy-11-oxo-18α-oléan-12-én-29-oïque.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol anhydre, assez soluble dans le chlorure de méthylène.

**Glyoxal (solution de).** *1098400.* [107-22-2].

*Teneur* : environ 40 pour cent *m/m* de glyoxal.

*Dosage.* Dans une fiole bouchant émeri, introduisez 1,000 g de solution de glyoxal, 20 mL de solution de *chlorhydrate d'hydroxylamine R* à 70 g/L et 50 mL d'*eau R*. Après 30 min, ajoutez 1 mL d'*indicateur mixte au rouge de méthyle R* et titrez par l'*hydroxyde de sodium 1 M* jusqu'au virage de l'indicateur du rouge au vert. Effectuez un titrage à blanc.

1 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* correspond à 29,02 mg de glyoxal ($C_2H_2O_2$).

**Glyoxalhydroxyanile.** $C_{14}H_{12}N_2O_2$. ($M_r$ 240,3). *1041000.* [1149-16-2]. Glyoxal bis(2-hydroxyanile).

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent à chaud.

F : environ 200 °C.

**Gomme adragante.** *1092300.* [9000-65-1].

Voir *Gomme adragante (0532).*

**Gomme arabique.** *1000100.*

Voir *Gomme arabique (0307).*

**Solution de gomme arabique.** *1000101.*

Dissolvez 100 g de *gomme arabique R* dans 1000 mL d'*eau R*. Agitez à l'aide d'un agitateur mécanique pendant 2 h et centrifugez à environ 2000 *g* pendant 30 min pour obtenir une solution limpide.

*Conservation* : en récipient de polyéthylène d'une capacité d'environ 250 mL et à une température de 0 °C à – 20 °C.

**Gomme de caroube.** *1104500.*

Albumen broyé des graines de *Ceratonia siliqua* L. Taub.

Poudre blanche ou sensiblement blanche contenant de 70 pour cent à 80 pour cent d'une gomme hydrosoluble principalement composée de galactomannoglycone.

**Gonadotropine chorionique.** *1041100.* [9002-61-3].

Voir *Gonadotropine chorionique (0498).*

**Gonadotropine sérique.** *1041200.*

Voir *Gonadotropine sérique équine à usage vétérinaire (0719).*

**Guanidine (chlorhydrate de).** $CH_5N_3HCl$. ($M_r$ 95,5). *1098500.* [50-01-1].

Poudre cristalline, facilement soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Guanine.** $C_5H_5N_5O$. ($M_r$ 151,1). *1041600.* [73-40-5]. 2-Amino-1,7-dihydro-6*H*-purin-6-one.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, amorphe, pratiquement insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent. La guanine se dissout dans l'ammoniaque et dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins.

**Harpagoside.** $C_{24}H_{30}O_{11}$. ($M_r$ 494,5). *1098600.*

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, très hygroscopique, soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : 117 °C à 121 °C.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Hédéracoside C.** $C_{59}H_{96}O_{26}$. ($M_r$ 1221). *1158100.* [14216-03-6]. (4*R*)-3β-[[2-*O*-(6-Désoxy-α-L-mannopyranosyl)-α-L-arabinopyranosyl]oxy]-23-hydroxyoléan-12-én-28-oate de *O*-6-désoxy-α-L-mannopyranosyl-(1→4)-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyle.

Cristaux incolores ou poudre blanche ou sensiblement blanche.

F : environ 220 °C.

*L'hédéracoside C utilisé en chromatographie liquide satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage*. Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de la monographie *Feuille de lierre (2148).*

*Solution à examiner*. Dissolvez 5,0 mg d'hédéracoside C dans 5,0 mL de *méthanol R*.

*Teneur* : au minimum 95 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**α-Hédérine.** $C_{41}H_{66}O_{12}$. ($M_r$ 751,0). *1158200.* [27013-91-8]. (+)-Acide (4*R*)-3β-[[2-*O*-6-désoxy-α-L-mannopyranosyl)-α-L-arabinopyranosyl]oxy]-23-hydroxyoléan-12-én-28-oïque.

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

F : environ 256 °C.

**Hélianthine.** *1054800.* [547-58-0].

Voir *Méthylorange R.*

**Hélium pour chromatographie.** He. ($A_r$ 4,003). *1041800.* [7440-59-7].

*Teneur* : au minimum 99,995 pour cent *V/V.*

**Hémoglobine.** *1041700.* [9008-02-0].

*Azote* : 15 à 16 pour cent.

*Fer* : 0,2 à 0,3 pour cent.

*Perte à la dessiccation* (*2.2.32*) : au maximum 2 pour cent.

*Cendres sulfuriques* (*2.4.14*) : au maximum 1,5 pour cent.

**Solution d'hémoglobine.** *1041701.*

Transvasez 2 g d'*hémoglobine R* dans une fiole conique de 250 mL et ajoutez 75 mL d'*acide chlorhydrique dilué R2.* Agitez jusqu'à ce que l'hémoglobine soit totalement dissoute. Ajustez à pH 1,6 ± 0,1 avec de l'*acide chlorhydrique 1 M.* Transvasez dans une fiole de 100 mL avec de l'*acide chlorhydrique dilué R2.* Ajoutez 25 mg de *thiomersal R*. Préparez chaque jour et conservez à 5 ± 3 °C. Ajustez à pH 1,6 avant l'emploi.

*Conservation* : à une température de 2 °C à 8 °C.

**Héparine.** *1041900.* [9041-08-1].

Voir *Héparine sodique (0333).*

**Heptachlore.** $C_{10}H_5Cl_7$. ($M_r$ 373,3). *1128000.* [76-44-8].

Eb : environ 135 °C.

F : environ 95 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/μL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Heptachlor-époxide.** $C_{10}H_5Cl_7O$. ($M_r$ 389,3). *1128100.* [1024-57-3].

Eb : environ 200 °C.

F : environ 160 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/μL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Heptafluorobutyrique (acide).** $C_4HF_7O_2$. ($M_r$ 214,0). *1162400.* [375-22-4]. HFBA.

Liquide limpide incolore. Corrosif.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,645.

$n_D^{20}$ : environ 1,300.

Eb : environ 120 °C.

*Teneur* : au minimum 99,5 pour cent.

**Heptafluoro-*N*-méthyl-*N*-(triméthylsilyl)butanamide.** $C_8H_{12}F_7NOSi$. ($M_r$ 299,3). *1139500.* [53296-64-3]. 2,2,3,3,4,4,4-Heptafluoro-*N*-méthyl-*N*-(triméthylsilyl)butyramide.

Liquide limpide et incolore, inflammable.

$n_D^{20}$ : environ 1,351.

Eb : environ 148 °C.

**Heptane.** $C_7H_{16}$. ($M_r$ 100,2). *1042000.* [142-82-5].

Liquide incolore et inflammable, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol anhydre.

$d_{20}^{20}$ : 0,683 à 0,686.

$n_D^{20}$ : 1,387 à 1,388.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : au minimum 95 pour cent distillent de 97 °C à 98 °C.

**Hespéridine.** $C_{28}H_{34}O_{15}$. ($M_r$ 611). *1139000.* [520-26-3]. (*S*)-7-[[6-*O*-(6-Désoxy-α-L-mannopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl]oxy]-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-méthoxyphényl)-2,3-dihydro-4*H*-1-benzopyran-4-one.

Poudre hygroscopique, peu soluble dans l'eau et dans le méthanol.

F : 258 °C à 262 °C.

**Hexachlorobenzène.** $C_6Cl_6$. ($M_r$ 284,8). *1128200.* [118-74-1].

Eb : environ 332 °C.

F : environ 230 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/μL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**α-Hexachlorocyclohexane.** $C_6H_6Cl_6$. ($M_r$ 290,8). *1128300.* [319-84-6].

Eb : environ 288 °C.

F : environ 158 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/μL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**β-Hexachlorocyclohexane.** $C_6H_6Cl_6$. ($M_r$ 290,8). *1128400.* [319-85-7].

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/μL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**δ-Hexachlorocyclohexane.** $C_6H_6Cl_6$. ($M_r$ 290,8). *1128500.* [319-86-8].

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/μL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Hexacosane.** $C_{26}H_{54}$. ($M_r$ 366,7). *1042200.* [630-01-3].

Paillettes incolores ou blanches ou sensiblement blanches.

F : environ 57 °C.

**Hexadiméthrine (bromure d').** $(C_{13}H_{30}Br_2N_2)_n$. *1042300.* [28728-55-4]. Polyméthobromure de 1,5-diméthyl-1,5-diaza-undécaméthylène. Poly(dibromure de 1,1,5,5-tetraméthyl-1,5-azonia-undecaméthylène).

Poudre blanche ou sensiblement blanche, amorphe, hygroscopique, soluble dans l'eau.

*Conservation* : en récipient étanche.

**2,2′,2″,6,6′,6″-Hexa(1,1-diméthyléthyl)-4,4′,4″-[(2,4,6-triméthyl-1,3,5-benzènetriyle)trisméthylène]triphénol.** $C_{54}H_{78}O_3$. ($M_r$ 775). *1042100.* 2,2′,2″,6,6′,6″-Hexa-*tert*-butyl-4,4′,4″-[(2,4,6-triméthyl-1,3,5-benzènetriyle)trisméthylène]triphénol.

Poudre cristalline, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'acétone, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 244 °C.

**1,1,1,3,3,3-Hexafluoropropan-2-ol.** $C_3H_2F_6O$. ($M_r$ 168,0). *1136000.* [920-66-1].

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent, déterminé par chromatographie en phase gazeuse.

Liquide limpide, incolore, miscible à l'eau et à l'éthanol anhydre.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,596.

Eb : environ 59 °C.

**Hexaméthyldisilazane.** $C_6H_{19}NSi_2$. ($M_r$ 161,4). *1042400.* [999-97-3].

Liquide limpide, incolore.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,78.

$n_D^{20}$ : environ 1,408.

Eb : environ 125 °C.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Hexaméthylènetétramine.** $C_6H_{12}N_4$. ($M_r$ 140,2). *1042500.* [100-97-0]. Hexamine. 1,3,5,7-Tétraazatricyclo[3.3.1.1$^{3,7}$]décane.

Poudre cristalline incolore, très soluble dans l'eau.

**Hexane.** $C_6H_{14}$. ($M_r$ 86,2). *1042600.* [110-54-3].

Liquide incolore, inflammable, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol anhydre.

$d_{20}^{20}$ : 0,659 à 0,663.

$n_D^{20}$ : 1,375 à 1,376.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : au minimum 95 pour cent distillent de 67 °C à 69 °C.

*L'hexane utilisé en spectrophotométrie satisfait également à l'essai suivant.*

*Transmittance minimale* (*2.2.25*) déterminée en utilisant l'*eau R* comme liquide de compensation : 97 pour cent de 260 nm à 420 nm.

**Hexylamine.** $C_6H_{15}N$. ($M_r$ 101,2). *1042700.* [111-26-2]. Hexanamine.

Liquide incolore, peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,766.

$n_D^{20}$ : environ 1,418.

Eb : 127 °C à 131 °C.

**Histamine (dichlorhydrate d').** *1042800.* [56-92-8].

Voir *Dichlorhydrate d'histamine (0143).*

**Histamine (phosphate d').** *1042900.* [23297-93-0].

Voir *Phosphate d'histamine (0144).*

**Histamine (solution d').** *1042901.*

Solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L contenant un sel d'histamine en quantité correspondant à 0,1 μg d'histamine base par millilitre sous forme de dichlorhydrate ou de phosphate.

**Histidine (monochlorhydrate d').** $C_6H_{10}ClN_3O_2,H_2O$. (*M*r 209,6). *1043000.* [123333-71-1]. Chlorhydrate de l'acide (*RS*)-2-amino-3-(imidazol-4-yl)propionique monohydraté.

Poudre cristalline ou cristaux incolores, solubles dans l'eau.

F : environ 250 °C, avec décomposition.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Dichlorhydrate d'histamine (0143)* ; le chromatogramme présente une seule tache principale.

**Holmium (oxyde d').** $Ho_2O_3$. (*M*r 377,9). *1043100.* [12055-62-8]. Trioxyde de diholmium.

Poudre jaunâtre, pratiquement insoluble dans l'eau.

**Solution de perchlorate d'holmium.** *1043101.*

Solution d'*oxyde d'holmium R* à 40 g/L dans une solution d'*acide perchlorique R* contenant 141 g/L de $HClO_4$.

**DL-Homocystéine.** $C_4H_9NO_2S$. (*M*r 135,2). *1136100.* [454-29-5]. Acide (2*RS*)-2-amino-4-sulfanylbutanoïque.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche.

F : environ 232 °C.

**L-Homocystéine thiolactone (chlohydrate d').** $C_4H_8ClNOS$. (*M*r 153,6). *1136200.* [31828-68-9]. Chlorhydrate de (3*S*)-3-aminodihydrothiophén-2(3*H*)-one.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche.

F : environ 202 °C.

**Huile de colza.** *1074600.*

Voir *Colza (huile de) R.*

**Huile de maïs.** *1050400.*

Voir *Maïs (huile de) R.*

**Huile d'olive.** *1061000.* [8001-25-0].

Voir *Olive (huile d') R.*

**Huile de ricin polyoxyéthylée.** *1068200.*

Liquide jaune pâle, devenant limpide au-dessus de 26 °C.

**Huile de tournesol.** *1086900.*

Voir *Tournesol (huile de) R.*

**Huile de vaseline.** *1062000.* [8042-47-5].

Voir *Paraffine liquide R.*

**Hyaluronidase (solution de dilution d').** *1043300.*

Mélangez 100 mL de *solution tampon phosphate pH 6,4 R* à 100 mL d'*eau R*. Dissolvez 0,140 g de *gélatine hydrolysée R* dans la solution à 37 °C.

*Conservation* : pendant 2 h.

**Hydrastine (chlorhydrate d').** $C_{21}H_{22}ClNO_6$. (*M*r 419,9). *1154000.* [5936-28-7]. Chlorhydrate de (3*S*)-6,7-diméthoxy-3-[(5*R*)-6-méthyl-5,6,7,8-tétrahydro-1,3-dioxolo[4,5-*g*]isoquinoléin-5-yl]isobenzofuran-1(3*H*)-one.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique, très soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

$[\alpha]_D^{17}$ : environ + 127.

F : environ 116 °C.

*Le chlorhydrate d'hydrastine utilisé en chromatographie liquide satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications données dans la monographie *Hydrastis (1831).*

*Teneur* : au minimum 98 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Hydrazine.** $H_4N_2$. (*M*r 32,05). *1136300.* [302-01-2]. Diazane.

Liquide d'aspect légèrement huileux, incolore, à forte odeur d'ammoniaque, miscible à l'eau. Des solutions diluées dans l'eau sont disponibles dans le commerce.

$n_D^{20}$ : environ 1,470.

Eb : environ 113 °C.

F : environ 1,5 °C.

*Attention : toxique et corrosif.*

**Hydrazine (sulfate d').** $H_6N_2O_4S$. (*M*r 130,1). *1043400.* [10034-93-2].

Cristaux incolores, assez solubles dans l'eau froide, solubles dans l'eau chaude à 50 °C, facilement solubles dans l'eau bouillante, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Arsenic* (*2.4.2, Procédé A*) : au maximum 1 ppm, déterminé sur 1 g de sulfate d'hydrazine.

*Cendres sulfuriques* (*2.4.14*) : au maximum 0,1 pour cent.

**Hydrocarbures à basse tension de vapeur (type L).** *1049400.*

Masse onctueuse, soluble dans le benzène et dans le toluène.

**Hydrocortisone (acétate d').** *1098800.* [50-03-3].

Voir *Acétate d'hydrocortisone (0334).*

**Hydrogène (peroxyde d'), solution concentrée de.** *1043900.* [7722-84-1].

Voir *Solution de peroxyde d'hydrogène à 30 pour cent (0396).*

**Hydrogène (peroxyde d'), solution diluée de.** *1043800.* [7722-84-1].

Voir *Solution de peroxyde d'hydrogène à 3 pour cent (0395).*

**Hydrogène pour chromatographie.** $H_2$. (*M*r 2,016). *1043700.* [1333-74-0].

*Teneur* : au minimum 99,95 pour cent *V/V.*

**Hydrogène (sulfure d').** $H_2S$. (*M*r 34,08). *1044000.* [7783-06-4].

Gaz peu soluble dans l'eau.

**Solution de sulfure d'hydrogène.** *1136400.*

Solution récemment préparée de *sulfure d'hydrogène R* dans l'*eau R*. La solution saturée à 20 °C contient environ 0,4 pour cent à 0,5 pour cent de $H_2S$.

**Hydrogène (sulfure d') R1.** $H_2S$. (*M*r 34,08). *1106600.* [7783-06-4].

*Teneur* : au minimum 99,7 pour cent *V/V.*

**Hydroquinone.** $C_6H_6O_2$. (*M*r 110,1). *1044100.* [123-31-9]. Benzène-1,4-diol.

Aiguilles fines, incolores ou blanches ou sensiblement blanches, noircissant à la lumière et à l'air, solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 173 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière et de l'air.

**Solution d'hydroquinone.** *1044101.*

Dissolvez 0,5 g d'*hydroquinone R* dans de l'*eau R*, ajoutez 20 µL d'*acide sulfurique R* et complétez à 50 mL avec de l'*eau R.*

**2-Hydroxybenzimidazole.** $C_7H_6N_2O$. (*M*r 134,1). *1169600.* [615-16-7]. 1*H*-benzimidazol-2-ol.

**4-Hydroxybenzohydrazide.** $C_7H_8N_2O_2$. (*M*r 152,2). *1145900.* [5351-23-5]. *p*-Hydroxybenzohydrazide.

**4-Hydroxybenzoïque (acide).** $C_7H_6O_3$. (*M*r 138,1). *1106700.* [99-96-7].

Cristaux peu solubles dans l'eau, très solubles dans l'éthanol à 96 pour cent, solubles dans l'acétone.

F : 214 °C à 215 °C.

**4-Hydroxycoumarine.** $C_9H_6O_3$. (*M*r 162,2). *1169700.* [1076-38-6]. 4-Hydroxy-2*H*-1-benzopyran-2-one.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, facilement soluble dans le méthanol.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent.

**6-Hydroxydopa.** $C_9H_{11}NO_5$. ($M_r$ 213,2). *1169800.* [21373-30-8]. Acide (2*RS*)-2-amino-3-(2,4,5-trihydroxyphényl)propanoïque. 2,5-Dihydroxy-DL-tyrosine.

F : environ 257 °C.

**2-[4-(2-Hydroxyéthyl)pipérazin-1-yl]éthanesulfonique (acide).** $C_8H_{18}N_2O_4S$. ($M_r$ 238,3). *1106800.* [7365-45-9]. HEPES.

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

F : environ 236 °C, avec décomposition.

**4-Hydroxyisophtalique (acide).** $C_8H_6O_5$. ($M_r$ 182,1). *1106900.* [636-46-4]. Acide 4-hydroxybenzène-1,3-dicarboxylique.

Aiguilles ou paillettes, très peu solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 314 °C, avec décomposition.

**Hydroxylamine (chlorhydrate d').** $NH_4ClO$. ($M_r$ 69,5). *1044300.* [5470-11-1].

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, très soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution alcaline d'hydroxylamine.** *1044302.*

Mélangez extemporanément des volumes égaux d'une solution de *chlorhydrate d'hydroxylamine R* à 139 g/L et d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 150 g/L.

**Solution alcaline d'hydroxylamine R1.** *1044303.*

*Solution A.* Dissolvez 12,5 g de *chlorhydrate d'hydroxylamine R* dans du *méthanol R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

*Solution B.* Dissolvez 12,5 g d'*hydroxyde de sodium R* dans du *méthanol R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

Mélangez extemporanément des volumes égaux de solution A et de solution B.

**Solution alcoolique d'hydroxylamine.** *1044301.*

Dissolvez 3,5 g de *chlorhydrate d'hydroxylamine R* dans 95 mL d'*éthanol à 60 pour cent V/V R.* Ajoutez 0,5 mL d'une *solution de méthylorange R* à 2 g/L dans de l'*éthanol à 60 pour cent V/V R* et de l'*hydroxyde de potassium 0,5 M dans l'alcool à 60 pour cent V/V R* jusqu'à coloration jaune franc. Complétez à 100 mL avec de l'*éthanol à 60 pour cent V/V R.*

**Solution de chlorhydrate d'hydroxylamine R2.** *1044304.*

Dissolvez 2,5 g de *chlorhydrate d'hydroxylamine R* dans 4,5 mL d'*eau R* chaude et ajoutez 40 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et 0,4 mL de *solution de bleu de bromophénol R2.* Ajoutez de l'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M* jusqu'à virage au jaune-vert et complétez à 50,0 mL avec de l'*éthanol à 96 pour cent R.*

**Hydroxyméthylfurfural.** $C_6H_6O_3$. ($M_r$ 126,1). *1044400.* [67-47-0]. 5-Hydroxyméthylfurfural.

Cristaux aciculaires, facilement solubles dans l'eau, dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 32 °C.

**2-Hydroxypropylbétadex pour chromatographie.** *1146000.* Bétacyclodextrine modifiée par greffage de groupes oxyde de propylène (*R*) ou (*RS*) sur les groupements hydroxyle.

**Hydroxypropyl-β-cyclodextrine.** *1128600.* [94035-02-6].

Voir *Hydroxypropylbétadex (1804).*

pH (*2.2.3*) : 5,0 à 7,5 pour une solution à 20 g/L.

**Hydroxyquinoléine.** $C_9H_7NO$. ($M_r$ 145,2). *1044600.* [148-24-3]. 8-Hydroxyquinoléine. Quinoléin-8-ol.

Poudre cristalline blanche ou légèrement jaunâtre, peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'acétone, dans l'éthanol à 96 pour cent et dans les acides minéraux dilués.

F : environ 75 °C.

*Cendres sulfuriques* (*2.4.14*) : au maximum 0,05 pour cent.

**12-Hydroxystéarique (acide).** $C_{18}H_{36}O_3$. ($M_r$ 300,5). *1099000.* [106-14-9]. Acide 12-hydroxyoctadécanoïque.

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

F : 71 °C à 74 °C.

**5-Hydroxyuracile.** $C_4H_4N_2O_3$. ($M_r$ 128,1). *1044700.* [496-76-4]. Acide isobarbiturique. Pyrimidine-2,4,5-triol.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche.

F : 310 °C environ, avec décomposition.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Flouracile (0611)* ; le chromatogramme présente une seule tache à un $R_F$ d'environ 0,3.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Hyoscyamine (sulfate d').** *1044900.* [620-61-1].

Voir *Sulfate d'hyoscyamine (0501).*

**Hypéricine.** $C_{30}H_{16}O_8$. ($M_r$ 504,4). *1149800.* [548-04-9]. 1,3,4,6,8,13-Hexadydroxy-10,11-diméthylphénanthro[1,10,9,8-*opqra*]pérylène-7,14-dione.

*Teneur* : au minimum 85 pour cent.

**Hypéroside.** $C_{21}H_{20}O_{12}$. ($M_r$ 464,4). *1045000.* 2-(3,4-Dihydroxyphényl)-3-β-D-galactopyranosyloxy-5,7-dihydroxychromén-4-one.

Aiguilles jaune pâle, solubles dans le méthanol.

$[\alpha]_D^{20}$ : – 8,3, déterminé avec une solution à 2 g/L dans la *pyridine R.*

F : environ 240 °C, avec décomposition.

*Absorbance* (*2.2.25*). Une solution dans le *méthanol R* présente 2 maximums d'absorption respectivement à 259 nm et à 364 nm.

**Hypophosphoreux (réactif).** *1045200.*

Dissolvez en chauffant légèrement 10 g d'*hypophosphite de sodium R* dans 20 mL d'*eau R.* Complétez à 100 mL avec de l'*acide chlorhydrique R.* Laissez déposer, décantez ou filtrez le liquide sur de la laine de verre.

**Hypoxanthine.** $C_5H_4N_4O$. ($M_r$ 136,1). *1045300.* [68-94-0]. 1*H*-Purin-6-one.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, très peu soluble dans l'eau, assez soluble dans l'eau bouillante, soluble dans les solutions diluées d'acides et les solutions diluées d'hydroxydes alcalins ; elle se décompose sans fondre à environ 150 °C.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Mercaptopurine (0096)* ; le chromatogramme présente une seule tache principale.

**Imidazole.** $C_3H_4N_2$. ($M_r$ 68,1). *1045400.* [288-32-4].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 90 °C.

**Iminodibenzyle.** $C_{14}H_{13}N$. ($M_r$ 195,3). *1045500.* [494-19-9]. 10,11-Dihydrodibenz[*b,f*]azépine.

Poudre cristalline jaune pâle, pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'acétone.

F : environ 106 °C.

**Immunosérum rabique (conjugué fluorescent d').** *1038700.*

Préparation d'immunoglobulines à titre élevé en anticorps rabiques, obtenue par fractionnement à partir du sérum d'animaux appropriés ayant été immunisés avec le virus rabique inactivé. L'immunoglobuline est conjuguée avec de l'isothiocyanate de fluorescéine

**2-Indanamine (chlorhydrate de).** $C_9H_{12}ClN$. ($M_r$ 169,7). *1175800.* [2338-18-3]. Chlorhydrate de 2-aminoindane.

Chlorhydrate de 2,3-dihydro-1*H*-indén-2-amine.

**Indicateur mixte au méthylorange.** *1054801.*

Voir *Méthylorange R.*

**Indicateur mixte au rouge de méthyle.** *1055101.*

Voir *Rouge de méthyle R.*

**Indigo carmin.** *1045600.* [860-22-0].

Voir *Carmin d'indigo R.*

**Indométacine.** *1101500.* [53-86-1].

Voir *Indométacine (0092).*

**Inosine.** $C_{10}H_{12}N_4O_5$. ($M_r$ 268,2). *1169900.* [58-63-9]. 9-β-D-Ribofuranosylhypoxanthine. 9-β-D-Ribofuranosyl-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-one.

F : 222 °C à 226 °C.

***myo*-Inositol.** *1161100.*

Voir *myo-Inositol (1805).*

**Iode.** *1045800.* [7553-56-2].

Voir *Iode (0031).*

**Solution alcoolique d'iode.** *1045804.*

Solution à 10 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R.*

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Solution chloroformique d'iode.** *1045805.*

Solution à 5 g/L dans le *chloroforme R.*

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Solution d'iode R1.** *1045801.*

A 10,0 mL d'*iode 0,05 M,* ajoutez 0,6 g d'*iodure de potassium R* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R.* Préparez extemporanément.

**Solution d'iode R2.** *1045802.*

A 10,0 mL d'*iode 0,05 M,* ajoutez 0,6 g d'*iodure de potassium R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.* Préparez extemporanément.

**Solution d'iode R3.** *1045803.*

Prélevez 2,0 mL de *solution d'iode R1* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R.* Préparez extemporanément.

**Solution d'iode R4.** *1045806.*

Dissolvez 14 g d'*iode R* dans 100 mL d'une solution d'*iodure de potassium R* à 400 g/L, ajoutez 1 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R.*

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Iode (bromure d').** IBr. ($M_r$ 206,8). *1045900.* [7789-33-5].

Cristaux noir-bleu ou noir-brun, facilement solubles dans l'eau, dans l'éthanol à 96 pour cent et dans l'acide acétique glacial.

Eb : environ 116 °C.

F : environ 40 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Solution de bromure d'iode.** *1045901.*

Dissolvez 20 g de *bromure d'iode R* dans de l'*acide acétique glacial R* et complétez à 1000 mL avec le même acide.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Iode (chlorure d').** ICl. ($M_r$ 162,4). *1143000.* [7790-99-0].

Cristaux noirs, solubles dans l'eau, dans l'acide acétique et dans l'éthanol à 96 pour cent.

Eb : environ 97,4 °C.

**Solution de chlorure d'iode.** *1143001.*

Dissolvez 1,4 g de *chlorure d'iode R* dans de l'*acide acétique glacial R* et complétez à 100 mL avec le même acide.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Iodhydrique (acide).** HI. ($M_r$ 127,9). *1098900.* [10034-85-2].

Préparez, en distillant de l'acide iodhydrique au-dessus du phosphore rouge, en faisant passer un courant de *dioxyde de carbone R* ou d'*azote R* à travers l'appareil au cours de la distillation. Utilisez le mélange incolore ou pratiquement incolore à ébullition constante (de 55 à 58 pour cent de HI) en distillant à une température entre 126 °C et 127 °C.

Placez l'acide dans de petits flacons ambrés à bouchon de verre, préalablement rincés par un courant de *dioxyde de carbone R* ou d'*azote R,* scellez à la paraffine.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Iodique (anhydride) recristallisé.** $I_2O_5$. ($M_r$ 333,8). *1046000.* [12029-98-0]. Pentoxyde de diiode recristallisé.

*Teneur* : au minimum 99,5 pour cent.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, ou granulés blancs ou gris-blanc, hygroscopiques, très solubles dans l'eau en formant du $HIO_3$.

*Stabilité à la chaleur.* Dissolvez dans 50 mL d'*eau R* 2 g d'anhydride iodique desséché à 200 °C au préalable pendant 1 h. La solution est incolore.

*Dosage.* Dissolvez 0,100 g d'anhydride iodique dans 50 mL d'*eau R.* Ajoutez 3 g d'*iodure de potassium R* et 10 mL d'*acide chlorhydrique dilué R.* Titrez l'iode libéré par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* en présence de 1 mL de *solution d'amidon R.*

1 mL de *thiosulfate de sodium 0,1 M* correspond à 2,782 mg de $I_2O_5$.

*Conservation* : en récipient étanche, à l'abri de la lumière.

**Iodoacétique (acide).** $C_2H_3IO_2$. ($M_r$ 185,9). *1107000.* [64-69-7].

Cristaux incolores ou blancs ou sensiblements blancs, solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : 82 °C à 83 °C.

**2-Iodobenzoïque (acide).** $C_7H_5IO_2$. ($M_r$ 248,0). *1046100.* [88-67-5].

Poudre cristalline, blanche ou légèrement jaune, peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 160 °C.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*), en utilisant une plaque recouverte de *cellulose pour chromatographie $F_{254}$ R* : déposez sur la plaque 20 μL d'une solution d'acide 2-iodobenzoïque obtenue en dissolvant 40 mg d'acide 2-iodobenzoïque dans 4 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* et en complétant la solution à 10 mL avec de l'*eau R.* Développez sur un parcours de 12 cm en utilisant comme phase mobile la phase supérieure d'un mélange obtenu en agitant 20 volumes d'*eau R,* 40 volumes d'*acide acétique glacial R* et 40 volumes de *toluène R.* Laissez sécher la plaque à l'air et examinez en lumière ultraviolette à 254 nm. Le chromatogramme présente une seule tache principale.

**3-Iodobenzylammonium (chlorure de).** $C_7H_9ClIN$. ($M_r$ 269,5). *1168000.* [3718-88-5]. Chlorhydrate de 1-(3-iodophényl)méthanamine. Chlorure de 1-(3-iodophényl)méthanaminium. Chlorhydrate de *m*-iodobenzylamine.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs.

F : 188 °C à 190 °C.

**Iodoéthane.** $C_2H_5I$. ($M_r$ 155,9). *1099100.* [75-03-6].

Liquide incolore ou faiblement jaunâtre, brunissant à l'exposition à l'air et à la lumière, miscible à l'éthanol à 96 pour cent et à la plupart des solvants organiques.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,95.

$n_D^{20}$ : environ 1,513.

Eb : environ 72 °C.

*Conservation* : en récipient étanche.

**2-Iodohippurique (acide).** $C_9H_8INO_3,2H_2O$. ($M_r$ 341,1). *1046200.* [147-58-0]. Acide 2-(2-iodobenzamido)acétique.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, assez soluble dans l'eau.

F : environ 170 °C.

*Eau* (*2.5.12*) : 9 pour cent à 13 pour cent, déterminé sur 1,000 g d'acide 2-iodohippurique.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) en utilisant une plaque recouverte de *cellulose pour chromatographie $F_{254}$ R* : déposez sur la plaque 20 µL d'une solution d'acide 2-iodohippurique obtenue en dissolvant 40 mg d'acide 2-iodohippurique dans 4 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* et en complétant la solution à 10 mL avec de l'*eau R* ; développez sur un parcours de 12 cm en utilisant comme phase mobile la phase supérieure d'un mélange obtenu en agitant 20 volumes d'*eau R*, 40 volumes d'*acide acétique glacial R* et 40 volumes de *toluène R* ; laissez sécher la plaque à l'air et examinez en lumière ultraviolette à 254 nm ; le chromatogramme présente une seule tache principale.

**Iodoplatinate (réactif à l').** *1046300.*

A 3 mL de solution d'*acide chloroplatinique R* à 100 g/L, ajoutez 97 mL d'*eau R* et 100 mL d'une solution d'*iodure de potassium R* à 60 g/L.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Iodoplatinate (réactif à l') R1.** *1172200.*

Mélangez 2,5 mL d'une solution d'*acide chloroplatinique R* à 50 g/L, 22,5 mL d'une solution d'*iodure de potassium R* à 100 g/L et 50 mL d'*eau R*.

*Conservation* : à l'abri de la lumière, à une température de 2 °C à 8 °C.

**Iodosulfureux (réactif).** *1046400.*

L'appareil, qui doit être sec et fermé pendant la préparation, se compose d'un ballon rond, à 3 tubulures, de 3000-4000 mL muni d'un agitateur, d'un thermomètre et d'un tube à dessiccation. Mélangez 700 mL de *pyridine anhydre R* avec 700 mL d'*éther monométhylique de l'éthylèneglycol R* ; ajoutez en agitant 220 g d'*iode R* finement pulvérisé et séché au préalable sur du *pentoxyde de diphosphore R* ; continuez d'agiter jusqu'à complète dissolution (environ 30 min). Refroidissez à – 10 °C et introduisez en agitant, aussi rapidement que possible, 190 g de *dioxyde de soufre R* liquide. La température ne doit pas dépasser 30 °C. Refroidissez.

*Dosage* : dans une fiole de titrage, ajoutez environ 20 mL de *méthanol anhydre R* et procédez au dosage de l'eau (*2.5.12*) en titrant par le réactif iodosulfureux jusqu'au point de fin de titrage. Introduisez dans la solution, sous une forme appropriée, la quantité adéquate d'*eau R* et effectuez à nouveau la détermination de l'eau. Calculez l'équivalent en eau en milligrammes par millilitre de réactif iodosulfureux.

Equivalent minimal d'emploi : 1 mL de réactif iodosulfureux doit correspondre à 3,5 mg de $H_2O$. Etablissez le titre du réactif au moment de l'emploi en opérant à l'abri de l'humidité.

*Conservation* : en récipient sec.

**5-Iodouracile.** $C_4H_3IN_2O_2$. ($M_r$ 238,0). *1046500.* [696-07-1]. 5-Iodo-1*H*,3*H*-pyrimidine-2,4-dione.

F : environ 276 °C, avec décomposition.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Idoxuridine (0669)* en déposant 5 µL d'une solution de 5-iodouracile à 0,25 g/L ; le chromatogramme présente une seule tache principale.

**Iodo-5 uracile.** *1046500.* [696-07-1].

Voir *5-Iodouracile R*.

**Isatine.** $C_8H_5NO_2$. ($M_r$ 147,1). *1046800.* [91-56-5]. Indoline-2,3-dione.

Petits cristaux jaune-rouge, peu solubles dans l'eau, solubles dans l'eau chaude et dans l'éthanol à 96 pour cent. L'isatine est soluble dans les solutions d'hydroxydes alcalins en donnant une coloration violette devenant jaune au repos.

F : environ 200 °C, accompagné de sublimation partielle.

*Cendres sulfuriques* (*2.4.14*) : au maximum 0,2 pour cent.

**Réactif à l'isatine.** *1046801.*

Dissolvez 6 mg de *sulfate ferrique R* dans 8 mL d'*eau R* et ajoutez avec précaution 50 mL d'*acide sulfurique R*. Ajoutez 6 mg d'*isatine R* et agitez jusqu'à dissolution.

Le réactif doit être jaune pâle et non orangé ou rouge.

**Isoamyle (benzoate d').** $C_{12}H_{16}O_2$. ($M_r$ 192,3). *1164200.* [94-46-2]. Benzate d'isopentyle. Benzoate de 3-méthylbutyle.

$n_D^{20}$ : environ 1,494.

Eb : environ 261 °C.

Liquide incolore ou jaune pâle.

**Isoamylique (alcool).** $C_5H_{12}O$. ($M_r$ 88,1). *1046900.* [123-51-3]. 3-Méthylbutan-1-ol.

Liquide incolore, peu soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

Eb : environ 130 °C.

**Isoandrostérone.** $C_{19}H_{30}O_2$. ($M_r$ 290,4). *1107100.* [481-29-8]. Epiandrostérone. 3β-Hydroxy-5α-androstan-17-one.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans les solvants organiques.

$[\alpha]_D^{20}$ : + 88, déterminé avec une solution à 20 g/L dans le *méthanol R*.

F : 172 °C à 174 °C.

$\Delta A$ (*2.2.41*) : $14,24 \times 10^3$, déterminé à 304 nm avec une solution à 1,25 g/L.

***N*-Isobutyldodécatétraénamide.** $C_{16}H_{25}NO$. ($M_r$ 247,4). *1159500.* [75917-90-7]. (2*E*,4*E*,8*Z*,10*EZ*)-*N*-2-(Méthylpropyl)dodéca-2,4,8,10-tétraénamide.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs à incolores.

F : environ 70 °C.

**Solution de *N*-isobutyldodécatétraénamide.** *1159501.*

Solution de *N-isobutyldodécatétraénamide R*, exactement pesé, dans du *méthanol R* à une concentration d'environ 10 mg/mL.

**Isodrine.** $C_{12}H_8Cl_6$. ($M_r$ 364,9). *1128700.* [465-73-6]. 1,2,3,4,10,10-Hexachloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahydro-*endo*,*endo*-1,4:5,8-diméthanonaphthalène.

Pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans les solvants organiques courants tel que l'acétone.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée peut être utilisée.

**Isomalt.** $C_{12}H_{24}O_{11}$. ($M_r$ 344,3). *1164300.* [64519-82-0].

Mélange de 6-*O*-α-D-glucopyranosyl-D-glucitol et de 1-*O*-α-D-glucopyranosyl-D-mannitol.

Poudre ou granulés blancs ou sensiblement blancs, facilement solubles dans l'eau.

**Isomaltitol.** $C_{12}H_{24}O_{11}$. ($M_r$ 344,3). *1161200.* [534-73-6]. 6-*O*-α-D-Glucopyranosyl-D-glucitol.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, facilement soluble dans l'eau.

**Isomenthol.** $C_{10}H_{20}O$. ($M_r$ 156,3). *1047000.* [23283-97-8]. *(+)-Isomenthol* : (1*S*,2*R*,5*R*)-2-isopropyl-5-méthylcyclohexanol. *(±)-Isomenthol* : un mélange à parties égales de (1*S*,2*R*,5*R*)-2-isopropyl-5-méthylcyclohexanol et de (1*R*,2*S*,5*S*)-2-isopropyl-5-méthylcyclohexanol.

Cristaux incolores, pratiquement insolubles dans l'eau, très solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

$[\alpha]_D^{20}$ : *(+)-Isomenthol* : environ + 24, déterminé avec une solution à 100 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*.

Eb : *(+)-Isomenthol* : environ 218 °C. *(±)-Isomenthol* : environ 218 °C.

F : *(+)-Isomenthol* : environ 80 °C. *(±)-Isomenthol* : environ 53 °C.

**(+)-Isomenthone.** $C_{10}H_{18}O$. ($M_r$ 154,2). *1047100.* (1*R*)-*cis*-*p*-Menthane-3-one. (1*R*)-*cis*-2-Isopropyl-5-méthylcyclohexanone.

Contient de la menthone en quantité variable.

Liquide incolore, très peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,904.

$n_D^{20}$ : environ 1,453.

$[\alpha]_D^{20}$ : environ + 93,2.

*L'isomenthone utilisée en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de menthe poivrée (0405).*

*Solution à examiner.* L'isomenthone à examiner.

*Teneur* : au minimum 80,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Isopropanol.** *1072100.* [67-63-0].

Voir *2-Propanol R*.

**Isopropylamine.** $C_3H_9N$. ($M_r$ 59,1). *1119800.* [75-31-0]. Propan-2-amine.

Liquide incolore, très volatil, inflammable.

$n_D^{20}$ : environ 1,374.

Eb : 32 °C à 34 °C.

**Isopropyle (iodure d').** $C_3H_7I$. ($M_r$ 170,0). *1166600.* [75-30-9]. 2-Iodopropane.

**Isopropyle (myristate d').** *1047200.* [110-27-0].

Voir *Myristate d'isopropyle (0725).*

**4-Isopropylphénol.** $C_9H_{12}O$. ($M_r$ 136,2). *1047300.* [99-89-8].

*Teneur* : au minimum 98 pour cent.

Eb : environ 212 °C.

F : 59 °C à 61 °C.

**Isopulégol.** $C_{10}H_{18}O$. ($M_r$ 154,2.). *1139600.* [89-79-2]. (−)-Isopulégol (1*R*,2*S*,5*R*)-2-Isopropényl-5-méthylcyclohexanol. .

$d_4^{20}$ : environ 0,911.

$n_D^{20}$ : environ 1,472.

F : environ 91 °C.

*L'isopulégol utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle partiellement démentholée de Mentha arvensis (1838).*

*Teneur* : au minimum 99 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Isoquercitroside.** $C_{21}H_{20}O_{12}$. ($M_r$ 464,4). *1136500.* [21637-25-2]. Isoquercitrine. 2-(3,4-Dihydroxyphényl)-3-(β-D-glucofuranosyloxy)-5,7-dihydroxy-4*H*-1-benzopyran-4-one. 3,3′,4′,5,7-Pentahydroxyflavone-3-glucoside.

**Isosilibinine.** $C_{25}H_{22}O_{10}$. ($M_r$ 482,4). *1149900.* [72581-71-6]. 3,5,7-Trihydroxy-2-[2-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-3-hydroxyméthyl-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl]chroman-4-one.

Poudre jaune ou blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'acétone et le méthanol.

**Jaune de métanile.** $C_{18}H_{14}N_3NaO_3S$. ($M_r$ 375,4). *1052900.* [587-98-4].

Schultz No. 169.

Colour Index No. 13065.
3-[4-(Phénylamino)phénylazo]benzènesulfonate de sodium.

Poudre jaune-brun, soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution de jaune de métanile.** *1052901.*

Solution à 1 g/L dans le *méthanol R*.

*Essai de sensibilité.* A 50 mL d'*acide acétique anhydre R*, ajoutez 0,1 mL de solution de jaune de métanile. Après addition de 0,05 mL d'*acide perchlorique 0,1 M*, la coloration vire du rose-rouge au violet.

*Zone de virage* : pH 1,2 (rouge) à pH 2,3 (jaune orangé).

**Jaune naphtol.** $C_{10}H_5N_2NaO_5$. ($M_r$ 256,2). *1136600.* Sel sodique de 2,4-dinitro-1-naphtol.

Poudre ou cristaux jaune orangé, facilement solubles dans l'eau, peu solubles dans l'éthanol anhydre.

**Jaune naphtol S.** $C_{10}H_4N_2Na_2O_8S$. ($M_r$ 358,2). *1143800.* [846-70-8].

Colour Index No. 10316.
Sel disodique d'acide 8-hydroxy-5,7-dinitro-2-naphthalènesulfonique. 5,7-Dinitro-8-oxydonaphtalène-2-sulfonate disodique.

Poudre jaune ou jaune orangé, facilement soluble dans l'eau.

**Jaune titane.** $C_{28}H_{19}N_5Na_2O_6S_4$. ($M_r$ 696). *1090900.* [1829-00-1].
Schultz No. 280.

Colour Index No. 19540.
Jaune de thiazol. 2,2′-[(1-Triazène-1,3-diyl)di-4,1-phénylène]bis[6-méthylbenzothiazole-7-sulfonate] de disodium.

Poudre brun-jaune, facilement soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Papier au jaune titane.** *1090901.*

Plongez des bandelettes de papier filtre dans la *solution de jaune titane R* et laissez en contact pendant quelques minutes, puis laissez sécher à température ambiante.

**Solution de jaune titane.** *1090902.*

Solution à 0,5 g/L.

*Essai de sensibilité.* A 0,1 mL de solution de jaune titane, ajoutez 10 mL d'*eau R*, 0,2 mL de *solution à 10 ppm de magnésium (Mg) R* et 1,0 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M*. La solution est nettement colorée en rose comparativement à une solution témoin sans magnésium, préparée simultanément dans les mêmes conditions.

**Kaolin léger.** *1047400.* [1332-58-7].

Le kaolin léger est un silicate d'aluminium hydraté naturel, purifié. Il contient un agent de dispersion approprié.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, légère, exempte de particules granuleuses, grasse au toucher, pratiquement insoluble dans l'eau et dans les acides minéraux.

*Particules grossières* : au maximum 0,5 pour cent.

Dans une éprouvette à bouchon rodé d'une longueur de 160 mm et d'un diamètre de 35 mm, introduisez 5,0 g de kaolin léger, puis 60 mL d'une solution de *pyrophosphate de sodium R* à 10 g/L. Agitez énergiquement et laissez reposer pendant 5 min. A l'aide d'une pipette, prélevez à environ 5 cm au-dessous de la surface, 50 mL de liquide. Au liquide restant, ajoutez 50 mL d'*eau R*, agitez, laissez reposer pendant 5 min et prélevez 50 mL de liquide comme indiqué ci-dessus. Répétez l'opération jusqu'à obtention d'un prélèvement total de 400 mL. Transférez

la suspension restante de l'éprouvette dans une capsule à évaporation. Evaporez au bain-marie à siccité. Chauffez le résidu à 100-105 °C jusqu'à masse constante. La masse du résidu est au maximum de 25 mg.

*Particules fines.* Dispersez 5,0 g de kaolin léger dans 250 mL d'*eau R*, en agitant énergiquement pendant 2 min. Versez immédiatement le mélange dans une éprouvette de verre d'un diamètre de 50 mm. A l'aide d'une pipette, transférez-en 20 mL dans une capsule de verre. Evaporez au bain-marie à siccité et desséchez à 100-105 °C jusqu'à masse constante. Laissez reposer le reste de la suspension à 20 °C pendant 4 h. Effectuez un second prélèvement de 20 mL à l'aide d'une pipette en plaçant la pointe de celle-ci exactement 5 cm au-dessous de la surface du liquide en évitant de disperser le sédiment. Transférez le second prélèvement dans une capsule de verre. Evaporez au bain-marie à siccité et séchez à 100-105 °C jusqu'à masse constante. La masse du résidu obtenu à partir du second prélèvement n'est pas inférieure à 70 pour cent de la masse du résidu obtenu à partir du premier prélèvement.

**Kieselguhr pour chromatographie.** *1047500.*

Poudre légère, blanche ou blanc-jaune, pratiquement insoluble dans l'eau, dans les acides dilués et dans les solvants organiques.

*Vitesse de filtration.* Utilisez une allonge à chromatographie d'une longueur de 0,25 m et d'un diamètre intérieur de 10 mm, fermée à son extrémité inférieure par un disque de verre fritté (100) et portant 2 marques situées respectivement à 0,10 m et 0,20 m au-dessus de ce disque. Introduisez dans l'allonge une quantité de kieselguhr pour chromatographie, suffisante pour atteindre la première marque. Remplissez avec de l'*eau R* jusqu'au niveau de la seconde marque. Quand les premières gouttes d'eau commencent à s'écouler, remplissez de nouveau jusqu'à la seconde marque avec de l'*eau R*. Mesurez le temps nécessaire pour que les 5 premiers millilitres s'écoulent de la colonne. Le débit n'est pas inférieur à 1 mL/min.

*Aspect de l'éluat.* L'éluat obtenu dans l'essai de vitesse de filtration est incolore (*Procédé I, 2.2.2*).

*Acidité ou alcalinité.* A 1,00 g de kieselguhr pour chromatographie, ajoutez 10 mL d'*eau R*. Agitez énergiquement et laissez reposer pendant 5 min. Filtrez la suspension sur un filtre préalablement lavé à l'*eau R* chaude jusqu'à ce que le filtrat soit neutre. A 2,0 mL du filtrat, ajoutez 0,05 mL de *solution de rouge de méthyle R*. La solution est jaune. A 2,0 mL du filtrat, ajoutez 0,05 mL de *solution de phénolphtaléine R1*. La solution est tout au plus légèrement rose.

*Substances solubles dans l'eau.* Introduisez 10,0 g de kieselguhr pour chromatographie dans une allonge à chromatographie d'une longueur de 0,25 m et d'un diamètre intérieur de 10 mm et éluez avec de l'*eau R*. Recueillez les premiers 20 mL de filtrat, évaporez à siccité et desséchez le résidu à 100-105 °C. La masse du résidu est au maximum de 10 mg.

*Fer* (*2.4.9*) : au maximum 200 ppm.

A 0,50 g de kieselguhr pour chromatographie, ajoutez 10 mL d'un mélange à volumes égaux d'*acide chlorhydrique R1* et d'*eau R*. Agitez énergiquement. Laissez reposer pendant 5 min, puis filtrez. 1,0 mL du filtrat satisfait à l'essai du fer.

*Perte de calcination* : au maximum 0,5 pour cent. Lors du chauffage au rouge (600 ± 50 °C), la substance ne se colore pas en brun ou en noir.

**Kieselguhr G.** *1047600.*

Le kieselguhr G est composé de kieselguhr purifié par l'acide chlorhydrique et calciné. Il contient environ 15 pour cent de sulfate de calcium hémihydraté.

Poudre fine gris-blanc dont la coloration grise s'intensifie par mélange avec de l'eau. La grandeur moyenne des particules est de 10-40 µm.

*Teneur en plâtre.* Effectuez l'essai selon les prescriptions de la rubrique *Silice (gel de) G R.*

*pH (2.2.3).* Agitez 1 g de kieselguhr G avec 10 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R* pendant 5 min. Le pH de la suspension est de 7 à 8.

*Pouvoir de séparation chromatographique.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*). Préparez l'enduit de kieselguhr G avec une solution d'*acétate de sodium R* à 2,7 g/L. Déposez 5 µL d'une solution à 0,1 g/L respectivement de lactose, de saccharose, de glucose et de fructose dans la *pyridine R*. Développez sur un parcours de 14 cm, avec un mélange de 12 volumes d'*eau R*, de 23 volumes de *2-propanol R* et de 65 volumes d'*acétate d'éthyle R*. Le temps de migration est d'environ 40 min. Desséchez et pulvérisez environ 10 mL de *solution d'aldéhyde anisique R*. Desséchez de nouveau à 100-105 °C pendant 5-10 min. Le chromatogramme présente 4 taches bien délimitées exemptes de traînées et nettement séparées les unes des autres.

**Lactique (acide).** *1047800.* [50-21-5].

Voir *Acide lactique (0458).*

**Réactif lactique.** *1047801.*

*Solution A.* A 60 mL d'*acide lactique R*, ajoutez 45 mL d'*acide lactique R* saturé à froid de *rouge Soudan G R* et préalablement filtré ; l'acide lactique se saturant lentement à froid, il est nécessaire qu'il y ait toujours un excès de colorant.

*Solution B.* Préparez 10 mL d'une solution saturée d'*aniline R*. Filtrez.

*Solution C.* Dissolvez 75 mg d'*iodure de potassium R* dans de l'eau et complétez à 70 mL avec le même solvant. Ajoutez 10 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*, puis 0,1 g d'*iode R*. Agitez.

Mélangez les solutions A et B. Ajoutez au mélange la solution C.

**Lactobionique (acide).** $C_{12}H_{22}O_{12}$. ($M_r$ 358,3). *1101600.* [96-82-2].

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, facilement soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 115 °C.

**Lactose.** *1047900.* [5989-81-1].

Voir *Lactose (0187).*

**β-Lactose.** $C_{12}H_{22}O_{11}$. ($M_r$ 342,3). *1150100.* [5965-66-2].

β-D-Lactose.

Poudre blanche ou légèrement jaunâtre.

*Teneur* : au minimum 99 pour cent.

α-D-Lactose : au maximum 35 pour cent.

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 30 m, Ø = 0,25 mm,

– *phase stationnaire* : *poly[(cyanopropyl)(phényl)][diméthyl]siloxane R* (épaisseur du film 1 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R.*

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 32,5 | 20 → 280 |
| Chambre à injection | | 250 |
| Détecteur | | 250 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : un échantillon dérivatisé approprié.

**α-Lactose monohydraté.** $C_{12}H_{22}O_{11},H_2O$. ($M_r$ 360,3). *1150000.* [5989-81-1]. α-D-Lactose monohydraté.

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

*Teneur* : au minimum 97 pour cent.

β-D-Lactose : moins de 3 pour cent.

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 30 m, Ø = 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *poly(diméthyl)siloxane R* (épaisseur du film 1 μm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R.*

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 12,5 | 230 → 280 |
| Chambre à injection | | 250 |
| Détecteur | | 280 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : un échantillon dérivatisé approprié.

**Lanatoside C.** $C_{49}H_{76}O_2$. ($M_r$ 985). *1163300.* [17575-22-3]. 3β-[(β-D-Glucopyranosyl-(1→4)-3-*O*-acétyl-2,6-didésoxy-β-D-*ribo*-hexopyranosyl-(1→4)-2,6-didésoxy-β-D-*ribo*-hexopyranosyl-(1→4)-2,6-didésoxy-β-D-*ribo*-hexopyranosyl)oxy]-12β,14-dihydroxy-5β-card-20(22)-énolide.

Prismes de forme allongée et aplatie obtenus après recristallisation dans l'éthanol à 96 pour cent.

Facilement soluble dans la pyridine et dans le dioxane.

**Lanthane (chlorure de) heptahydraté.** $LaCl_3,7H_2O$. ($M_r$ 371,4). *1167200.*

Poudre blanche ou sensiblement blanche, ou cristaux incolores, facilement solubles dans l'eau.

**Lanthane (nitrate de).** $La(NO_3)_3,6H_2O$. ($M_r$ 433,0). *1048000.* [10277-43-7]. Trinitrate de lanthane hexahydraté.

Cristaux incolores, déliquescents, facilement solubles dans l'eau.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Solution de nitrate de lanthane.** *1048001.*

Solution à 50 g/L.

**Lanthane (trioxyde de).** $La_2O_3$. ($M_r$ 325,8). *1114000.* [1312-81-8].

Poudre amorphe, sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'*eau R*. Le trioxyde de lanthane se dissout dans les solutions diluées d'acides minéraux et absorbe le dioxyde de carbone de l'air.

*Calcium* : au maximum 5 ppm.

**Solution de chlorure de lanthane.** *1114001.*

A 58,65 g de *trioxyde de lanthane R*, ajoutez lentement 100 mL d'*acide chlorhydrique R*. Portez à ébullition. Laissez refroidir et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

**Laurique (acide).** $C_{12}H_{24}O_2$. ($M_r$ 200,3). *1143100.* [143-07-7]. Acide dodécanoïque.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 44 °C.

*L'acide laurique utilisé dans le dosage des acides gras totaux dans la monographie Fruit de sabal (1848) satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Fruit de sabal (1848).*

*Teneur* : au minimum 98 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Laurique (alcool).** $C_{12}H_{26}O$. ($M_r$ 186,3). *1119900.* [112-53-8]. Dodécan-1-ol.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,820.

F : 24 à 27 °C.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent de $C_{12}H_{26}O$, déterminé par chromatographie en phase gazeuse.

**Lavandulol.** $C_{10}H_{18}O$. ($M_r$ 154,2). *1114100.* [498-16-8]. (*R*)-5-méthyl-2-(1-méthyléthényl)-4-hexén-1-ol.

Liquide huileux d'odeur caractéristique.

*Le lavandulol utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Opérez par chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de lavande (1338).*

*Solution à examiner.* Le lavandulol à examiner.

*Teneur* : au minimum 90,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Lavandulyle (acétate de).** $C_{12}H_{20}O_2$. ($M_r$ 196,3). *1114200.* [25905-14-0]. Acétate de 2-isopropényl-5-méthylhex-4-én-1-yle.

Liquide incolore d'odeur caractéristique.

*L'acétate de lavandulyle utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Opérez par chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de lavande (1338).*

*Solution à examiner.* L'acétate de lavandulyle à examiner.

*Teneur* : au minimum 93,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Léiocarposide.** $C_{27}H_{34}O_{16}$. ($M_r$ 614,5). *1150200.* [71953-77-0]. 3-(β-D-Glucopyranosyloxy)-6-hydroxy-2-méthoxybenzoate de 2-(β-D-glucopyranosyloxy)benzyle. β-D-Glucopyranoside de 2-[[[3-(β-D-glucopyranosyloxy)-6-hydroxy-2-méthoxybenzoyl]oxy]méthyl]phényle.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, soluble dans l'eau, facilement soluble dans le méthanol, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : 190 °C à 193 °C.

**Leucine.** *1048500.* [61-90-5].

Voir *Leucine (0771).*

**Lévodopa.** *1170000.* [59-92-7].

Voir *Lévodopa (0038).*

**Limonène.** $C_{10}H_{16}$. ($M_r$ 136,2). *1048600.* [5989-27-5]. D-Limonène. (+)-*p*-Mentha-1,8-diène. (*R*)-4-Isopropényl-1-méthylcyclohex-1-ène.

Liquide incolore, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,84.

$n_D^{20}$ : 1,471 à 1,474.

$[\alpha]_D^{20}$ : environ + 124.

Eb : 175 °C à 177 °C.

*Le limonène utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de menthe poivrée (0405).*

*Solution à examiner.* Le limonène à examiner.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Linalol.** $C_{10}H_{18}O$. ($M_r$ 154,2). *1048700.* [78-70-6]. (*RS*)-3,7-Diméthylocta-1,6-dién-3-ol.

Mélange de 2 stéréoisomères (licaréol et coriandrol).

Liquide pratiquement insoluble dans l'eau.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,860.

$n_D^{20}$ : environ 1,462.

Eb : environ 200 °C.

*Le linalol utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait en plus à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle d'anis (0804).*

*Solution à examiner.* Le linalol à examiner.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Linalyle (acétate de).** $C_{12}H_{20}O_2$. ($M_r$ 196,3). *1107200.* [115-95-7]. Acétate de (*RS*)-1,5-diméthyl-1-vinylhex-4-ényle.

Liquide incolore ou légèrement jaune, à odeur forte de bergamote et de lavande.

$d_{25}^{25}$ : 0,895 à 0,912.

$n_D^{20}$ : 1,448 à 1,451.

Eb : environ 215 °C.

*L'acétate de linalyle utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de fleur d'oranger amer (1175).*

*Solution à examiner.* L'acétate de linalyle à examiner.

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Lindane.** $C_6H_6Cl_6$. ($M_r$ 290,8). *1128900.* [58-89-9]. γ-Hexachlorocyclohexane.

Pour la monographie *Graisse de laine (0134),* une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Linoléique (acide).** $C_{18}H_{32}O_2$. ($M_r$ 280,5). *1143200.* [60-33-3]. Acide (9*Z*,12*Z*)-octadéca-9,12-diénoïque.

Liquide huileux, incolore.

$d_4^{20}$ : environ 0,903.

$n_D^{20}$ : environ 1,470.

*L'acide linoléique utilisé dans le dosage des acides gras totaux dans la monographie Fruit de sabal (1848) satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Fruit de sabal (1848).*

*Teneur* : au minimum 98 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Linoléique (alcool).** $C_{18}H_{34}O$. ($M_r$ 266,5). *1155900.* [506-43-4]. (9*Z*,12*Z*)-octadéca-9,12-dién-1-ol.

*Densité* : 0,830.

*Teneur* : au minimum 85 pour cent.

**Linolénique (acide).** $C_{18}H_{30}O_2$. ($M_r$ 278,4). *1143300.* [463-40-1]. Acide (9*Z*,12*Z*,15*Z*)-octadéca-9,12,15-triénoïque.

Liquide incolore pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans les solvants organiques.

$d_4^{20}$ : environ 0,915.

$n_D^{20}$ : environ 1,480.

*L'acide linolénique utilisé dans le dosage des acides gras totaux dans la monographie Fruit de sabal (1848) satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Fruit de sabal (1848).*

*Teneur* : au minimum 98 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Linolénique (alcool).** $C_{18}H_{32}O$. ($M_r$ 264,4). *1156200.* [24149-05-1]. (9*Z*,12*Z*,15*Z*)-octadéca-9,12,15-trién-1-ol.

*Teneur* : au minimum 96 pour cent.

**Linsidomine (chlorhydrate de).** $C_6H_{11}ClN_4O_2$. ($M_r$ 206,6). *1171200.* [16142-27-1]. Chlorhydrate de 3-(morpholin-4-yl)sydnonimine. Chlorhydrate de 3-(morpholin-4-yl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-aminide.

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

**Liquide scintillant.** *1167300.*

Solution disponible dans le commerce destinée à la détermination de la radioactivité par comptage par scintillation liquide. Elle contient un ou plusieurs agents fluorescents et principalement un ou plusieurs agents émulsifiants dans un solvant organique approprié ou un mélange de solvants organiques approprié.

**Liquide scintillant R1.** *1176800.*

A 1000 mL de *dioxane R*, ajoutez 0,3 g de *méthylphényloxazolylbenzène R*, 7 g de *diphényloxazole R* et 100 g de *naphtalène R*.

**Lithium.** Li. ($A_r$ 6,94). *1048800.* [7439-93-2].

Métal mou dont la surface récemment coupée est d'un gris argenté. Exposé à l'air, le lithium se ternit rapidement. Le lithium réagit violemment avec l'eau, avec dégagement d'hydrogène et formation d'une solution d'hydroxyde de lithium ; soluble dans le méthanol avec dégagement d'hydrogène et formation d'une solution de méthanolate de lithium, pratiquement insoluble dans l'éther de pétrole.

*Conservation* : sous éther de pétrole ou paraffine liquide.

**Lithium (carbonate de).** $Li_2CO_3$. ($M_r$ 73,9). *1048900.* [554-13-2]. Carbonate de dilithium.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, légère, assez soluble dans l'eau, très peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent. La solution saturée à 20 °C contient environ 13 g/L de $Li_2CO_3$.

**Lithium (chlorure de).** LiCl. ($M_r$ 42,39). *1049000.* [7447-41-8].

Poudre cristalline, granulés ou cristaux cubiques déliquescents, facilement solubles dans l'eau, solubles dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 pour cent. La solution aqueuse est neutre ou faiblement alcaline.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Lithium (hydroxyde de).** $LiOH,H_2O$. ($M_r$ 41,96). *1049100.* [1310-66-3]. Hydroxyde de lithium monohydraté.

Poudre granuleuse blanche ou sensiblement blanche, fortement alcaline, absorbe rapidement de l'eau et du dioxyde de carbone, soluble dans l'eau, assez soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Lithium (métaborate de) anhydre.** $LiBO_2$. ($M_r$ 49,75). *1120000.* [13453-69-5].

**Lithium (sulfate de).** $Li_2SO_4,H_2O$. ($M_r$ 128,0). *1049200.* [10102-25-7]. Sulfate de dilithium monohydraté.

Cristaux incolores, facilement solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Lithium (trifluorométhanesulfonate de).** $CF_3LiO_3S$. ($M_r$ 156,0). *1173400.* [33454-82-9].

**Loganine.** $C_{17}H_{26}O_{10}$. ($M_r$ 390,4). *1136700.* [18524-94-2]. (1*S*,4a*S*,6*S*,7*R*,7a*S*)-1-(β-D-Glucopyranosyloxy)-6-hydroxy-7-méthyl-1,4a,5,6,7,7a-hexahydrocyclopenta[*c*]pyrane-4-carboxylate de méthyle.

F : 220 °C à 221 °C.

**Longifolène.** $C_{15}H_{24}$. ($M_r$ 204,4). *1150300.* [475-20-7]. (1*S*,3a*R*,4*S*,8a*S*)-4,8,8-Triméthyl-9-méthylènedécahydro-1,4-méthanoazulène.

Liquide huileux, incolore, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_4^{18}$ : 0,9319.

$n_D^{20}$ : 1,5050.

$[\alpha]_D^{20}$ : + 42,7.

Eb : 254 °C à 256 °C.

*Le longifolène utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage*. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de térébenthine type Pinus pinaster (1627)*.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Lumiflavine.** $C_{13}H_{12}N_4O_2$. ($M_r$ 256,3). *1141000.* [1088-56-8]. 7,8,10-Triméthylbenzo[*g*]ptéridine-2,4(3*H*,10*H*)-dione.

Poudre jaune ou cristaux orangés très peu solubles dans l'eau, facilement solubles dans le chlorure de méthylène.

**Lutéoline-7-glucoside.** $C_{21}H_{20}O_{11}$. ($M_r$ 448,4). *1163400.* [5373-11-5]. 2-(3,4-Dihydroxyphényl)-7-(β-D-glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-4*H*-1-benzopyran-4-one.

Poudre jaune.

*Absorbance* (*2.2.25*). Une solution dans le *méthanol R* présente des maximums d'absorption à 255 nm, 267 nm, 290 nm et 350 nm.

F : environ 247 °C.

**Macrogol 23 (éther laurique de).** *1129000.*

Voir *Ether laurique de macrogol (1124)*, le nombre de moles d'oxyde d'éthylène ayant réagi par mole d'alcool laurique étant de 23 (valeur nominale).

**Macrogol 200.** *1099200.* [25322-68-3]. Polyéthylèneglycol 200.

Liquide visqueux, limpide, incolore ou sensiblement incolore, très soluble dans l'acétone et dans l'éthanol anhydre, pratiquement insoluble dans les huiles grasses.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,127.

$n_D^{20}$ : environ 1,450.

**Macrogol 200 R1.** *1099201.*

Introduisez 500 mL de *macrogol 200 R* dans un ballon à fond rond de 1000 mL. A l'aide d'un évaporateur rotatif retirer tout composant volatil en appliquant une température de 60 °C pendant 6 h et un vide à une pression de 1,5-2,5 kPa.

**Macrogol 300.** *1067100.* [25322-68-3]. Polyéthylèneglycol 300.

Voir *Macrogols (1444).*

**Macrogol 400.** *1067200.* [25322-68-3]. Polyéthylèneglycol 400.

Voir *Macrogols (1444).*

**Macrogol 1000.** *1067300.* [25322-68-3]. Polyéthylèneglycol 1000.

Voir *Macrogols (1444).*

**Macrogol 1500.** *1067400.* [25322-68-3]. Polyéthylèneglycol 1500.

Voir *Macrogols (1444).*

**Macrogol 20 000.** *1067600.* Polyéthylèneglycol 20 000.

Voir *Macrogols (1444).*

**Macrogol 20 000 (2-nitrotéréphtalate de).** *1067601.* Polyéthylèneglycol 20 000 (2-nitrotéréphtalate de).

*Macrogol 20 000 R* modifié par traitement par l'acide 2-nitrotéréphtalique.

Masse dure et cireuse, blanche ou sensiblement blanche, soluble dans l'acétone.

**Magnésium.** Mg. ($A_r$ 24,30). *1049500.* [7439-95-4].

Ruban, tournures, fil ayant l'éclat de l'argent, ou poudre grise.

**Magnésium (acétate de).** $C_4H_6MgO_4,4H_2O$. ($M_r$ 214,5). *1049600.* [16674-78-5]. Diacétate de magnésium tétrahydraté.

Cristaux incolores, déliquescents, facilement solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Magnésium (chlorure de).** *1049700.* [7791-18-6].

Voir *Chlorure de magnésium hexahydraté (0402).*

**Magnésium (nitrate de).** $Mg(NO_3)_2,6H_2O$. ($M_r$ 256,4). *1049800.* [13446-18-9]. Nitrate de magnésium hexahydraté.

Cristaux incolores, limpides, déliquescents, très solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Solution de nitrate de magnésium.** *1049801.*

Dissolvez 17,3 g de *nitrate de magnésium R* dans 5 mL d'*eau R* en chauffant doucement et ajoutez 80 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Refroidissez et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

**Solution de nitrate de magnésium R1.** *1049802.*

Dissolvez 20 g de *nitrate de magnésium R* dans de l'*eau distillée désionisée R* et complétez à 100 mL avec le même solvant. Immédiatement avant l'emploi, prélevez 10 mL et complétez à 100 mL avec de l'*eau distillée désionisée R*. Un volume de 5 µL fournit 0,06 mg de $Mg(NO_3)_2$.

**Magnésium (oxyde de).** *1049900.* [1309-48-4].

Voir *Oxyde de magnésium léger (0040).*

**Oxyde de magnésium R1.** *1049901.*

Satisfait aux spécifications de l'*oxyde de magnésium R* avec les modifications suivantes.

*Arsenic* (*2.4.2, Procédé A*) : au maximum 2 ppm.

Dissolvez 0,5 g d'*oxyde de magnésium R1* dans un mélange de 5 mL d'*eau R* et de 5 mL d'*acide chlorhydrique R1*.

*Fer* (*2.4.9*) : au maximum 50 ppm.

Dissolvez 0,2 g d'*oxyde de magnésium R1* dans 6 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et complétez à 10 mL avec de l'*eau R*.

*Métaux lourds* (*2.4.8*) : au maximum 10 ppm.

Dissolvez 1,0 g d'*oxyde de magnésium R1* dans 3 mL d'*eau R* et 7 mL d'*acide chlorhydrique R1*. Ajoutez 0,05 mL de *solution de phénolphtaléine R* et de l'*ammoniaque concentrée R* jusqu'à coloration rose, puis neutralisez par l'*acide acétique glacial R*. Ajoutez 0,5 mL en excès et complétez à 20 mL avec de l'*eau R*. Filtrez éventuellement. 12 mL de solution satisfont à l'essai A. Préparez la solution témoin avec un mélange de 5 mL de *solution à 1 ppm de plomb (Pb) R* et de 5 mL d'*eau R*.

**Magnésium (oxyde de) lourd.** *1050000.* [1309-48-4].

Voir *Oxyde de magnésium lourd (0041).*

**Magnésium (silicate de) pour analyse des résidus de pesticides.** *1129100.* [1343-88-0].

Silicate de magnésium pour chromatographie (60-100 mesh).

**Magnésium (sulfate de).** *1050200.* [10034-99-8].

Voir *Sulfate de magnésium heptahydraté (0044).*

**Maïs (huile de).** *1050400.*

Voir *Huile de maïs raffinée (1342).*

**Malathion.** $C_{10}H_{19}O_6PS_2$. ($M_r$ 330,3). *1129200.* [121-75-5].

Eb : environ 156 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans l'isooctane) peut être utilisée.

**Maléique (acide).** *1050600.* [110-16-7].

Voir *Acide maléique (0365).*

4. Réactifs

**Maléique (anhydride).** $C_4H_2O_3$. ($M_r$ 98,1). *1050700.* [108-31-6]. Anhydride butènedioïque. 2,5-Furanedione.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, solubles dans l'eau avec formation d'acide maléique, très solubles dans l'acétone et dans l'acétate d'éthyle, facilement solubles dans le toluène, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent avec formation d'ester, très peu solubles dans l'éther de pétrole.

F : environ 52 °C.

Le résidu insoluble dans le toluène est au maximum de 5 pour cent (acide maléique).

**Solution d'anhydride maléique.** *1050701.*

Dissolvez 5 g d'*anhydride maléique R* dans du *toluène R* et complétez à 100 mL avec le même solvant. La solution est stable pendant 1 mois. Filtrez si la solution devient trouble.

**Maltitol.** *1136800.* [585-88-6].

Voir *Maltitol (1235).*

**Maltotriose.** $C_{18}H_{32}O_{16}$. ($M_r$ 504,4). *1176300.* [1109-28-0]. α-D-Glucopyranosyl-(1→4)-α-D-glucopyranosyl-(1→4)-D-glucose.

**Mandélique (acide).** $C_8H_8O_3$. ($M_r$ 152,1). *1171300.* [90-64-2]. Acide 2-hydroxy-2-phénylacétique.

Paillettes cristallines blanches, solubles dans l'eau.

F : 118 à 121 °C.

**Manganèse (sulfate de).** $MnSO_4,H_2O$. ($M_r$ 169,0). *1050900.* [10034-96-5]. Sulfate de manganèse monohydraté.

Poudre cristalline ou cristaux rose pâle, facilement solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Perte à la calcination* : 10,0 pour cent à 12,0 pour cent, déterminé sur 1,000 g à 500 ± 50 °C.

**Manganèse-argent (papier).** *1078200.*

Voir *Papier manganèse-argent R.*

**Mannitol.** *1051000.* [69-65-8].

Voir *Mannitol (0559).*

**Mannose.** $C_6H_{12}O_6$. ($M_r$ 180,2). *1051100.* [3458-28-4]. D-(+)-Mannose.

Poudre cristalline ou petits cristaux, blancs ou sensiblement blancs, très solubles dans l'eau, peu solubles dans l'éthanol anhydre.

$[\alpha]_D^{20}$ : + 13,7 à + 14,7, déterminé avec une solution à 200 g/L dans de l'*eau R* contenant environ 0,05 pour cent de $NH_3$.

F : environ 132 °C, avec décomposition.

**Marrubiine.** $C_{20}H_{28}O_4$. ($M_r$ 332,4). *1158300.* [465-92-9]. (2a*S*,5a*S*,6*R*,7*R*,8a*R*,8b*R*)-6-[2-(Furan-3-yl)éthyl]-6-hydroxy-2a, 5a,7-triméthyldécahydro-2*H*-naphto[1,8-*bc*]furan-2-one.

Poudre microcristalline incolore.

*La marrubiine utilisée en chromatographie liquide satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications données dans la monographie *Parties aériennes fleuries de marrube blanc (1835).*

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Méclozine (dichlorhydrate de).** *1051200.* [1104-22-9].

Voir *Dichlorhydrate de méclozine (0622).*

**Mélamine.** $C_3H_6N_6$. ($M_r$ 126,1). *1051300.* [108-78-1]. 1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine.

Poudre amorphe, blanche ou sensiblement blanche, très peu soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Mélange gazeux à base d'azote.** *1136900.*

*Azote R* contenant 1 pour cent *V/V* de chacun des gaz suivants : *dioxyde de carbone R2, monoxyde de carbone R1* et *oxygène R1.*

**Mélange réducteur.** *1074700.*

Pulvérisez les substances ajoutées dans l'ordre suivant afin d'obtenir un mélange homogène : 20 mg de *bromure de potassium R*, 0,5 g de *sulfate d'hydrazine R* et 5 g de *chlorure de sodium R.*

**Ménadione.** *1051400.* [58-27-5].

Voir *Ménadione (0507).*

**Menthofurane.** $C_{10}H_{14}O$. ($M_r$ 150,2). *1051500.* [17957-94-7]. 3,9-Epoxy-*p*-mentha-3,8-diène. 3,6-Diméthyl-4,5,6,7-tétrahydrobenzofurane.

Liquide légèrement bleuâtre, très peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{15}^{20}$ : environ 0,965.

$n_D^{20}$ : environ 1,480.

$[\alpha]_D^{20}$ : environ + 93.

$Eb_{760}$ : 196 °C.

*Le menthofurane utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de menthe poivrée (0405).*

*Solution à examiner.* Le menthofurane à examiner.

*Teneur* : au minimum 97,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Menthol.** *1051600.* [2216-51-5].

Voir *Lévomenthol (0619)* et *Menthol racémique (0623).*

*Le menthol utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans l'essai des substances apparentées de la monographie *Menthol racémique (0623).*

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Menthone.** $C_{10}H_{18}O$. ($M_r$ 154,2). *1051700.* [14073-97-3]. (2*S*,5*R*)-2-Isopropyl-5-méthylcyclohexanone. (−)-*trans*-*p*-Menthan-3-one.

Contient de l'isomenthone en quantité variable.

Liquide incolore, très peu soluble dans l'eau, très soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,897.

$n_D^{20}$ : environ 1,450.

*La menthone utilisée en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de menthe poivrée (0405).*

*Solution à examiner.* La menthone à examiner.

*Teneur* : au minimum 90,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Menthyle (acétate de).** $C_{12}H_{22}O_2$. ($M_r$ 198,3). *1051800.* [2623-23-6]. Acétate de 2-isopropyl-5-méthylcyclohexyle.

Liquide incolore, peu soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,92.

$n_D^{20}$ : environ 1,447.

Eb : environ 228 °C.

*L'acétate de menthyle utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de menthe poivrée (0405).*

*Solution à examiner.* L'acétate de menthyle à examiner.

*Teneur* : au minimum 97,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**2-Mercaptobenzimidazole.** $C_7H_6N_2S$. ($M_r$ 150,2). *1170100.* [583-39-1]. 1*H*-benzimidazole-2-thiol.

F : environ 302 °C.

**2-Mercaptoéthanol.** $C_2H_6OS$. ($M_r$ 78,1). *1099300.* [60-24-2].

Liquide miscible à l'eau.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,116.

Eb : environ 157 °C.

**Mercaptopurine.** *1051900.* [6112-76-1].

Voir *Mercaptopurine (0096).*

**Mercure.** Hg. ($A_r$ 200,6). *1052800.* [7439-97-6].

Liquide blanc argent, se divisant en petits globules sphériques qui ne laissent pas de trainée métallique quand on les frotte sur du papier.

$d_{20}^{20}$ : environ 13,5.

Eb : environ 357 °C.

**Solution nitrique de mercure.** *1052801.*

Dissolvez avec précaution 3 mL de *mercure R* dans 27 mL d'*acide nitrique fumant R*. Diluez la solution avec un volume égal d'*eau R*.

*Conservation* : à l'abri de la lumière pendant 2 mois.

**Mercuricopotassique (iodure), solution d'.** *1071500.*

Voir *Potassium (tétraiodomercurate de), solution de R.*

**Mercuricopotassique (iodure), solution alcaline d'.** *1071600.*

Voir *Potassium (tétraiodomercurate de), solution alcaline de R.*

**Mercurique (acétate).** $C_4H_6HgO_4$. ($M_r$ 318,7). *1052000.* [1600-27-7]. Diacétate de mercure.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, facilement solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution d'acétate mercurique.** *1052001.*

Dissolvez 3,19 g d'*acétate mercurique R* dans l'*acide acétique anhydre R* et complétez à 100 mL avec le même acide. Neutralisez la solution, si nécessaire, avec de l'*acide perchlorique 0,1 M* en présence de 0,05 mL de *solution de violet cristallisé R.*

**Mercurique (bromure).** $HgBr_2$. ($M_r$ 360,4). *1052100.* [7789-47-1]. Dibromure de mercure.

Poudre cristalline, ou cristaux blanc-jaune, peu solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Papier au bromure mercurique.** *1052101.*

Plongez dans une cuve rectangulaire contenant une solution de *bromure mercurique R* à 50 g/L dans l'*éthanol anhydre R*, des bandes de papier filtre blanc d'une densité de 80 g par mètre carré (vitesse de filtration (= temps de filtration exprimé en secondes, de 100 mL d'eau à 20 °C sur une surface filtrante de 10 $cm^2$ et à une pression constante de 6,7 kPa) : 40 s à 60 s) de 1,5 cm sur 20 cm pliées en 2. Laissez égoutter et sécher à l'abri de la lumière sur un fil non métallique. Eliminez 1 cm aux 2 extrémités du papier et découpez le reste en carrés de 1,5 cm de côté ou en disques de 1,5 cm de diamètre.

*Conservation* : en récipient à bouchon de verre, recouvert de papier noir.

**Mercurique (chlorure).** *1052200.* [7487-94-7].

Voir *Chlorure mercurique (0120).*

**Solution de chlorure mercurique.** *1052201.*

Solution à 54 g/L.

**Mercurique (iodure).** $HgI_2$. ($M_r$ 454,4). *1052300.* [7774-29-0]. Diiodure de mercure.

Poudre cristalline, dense, rouge écarlate, peu soluble dans l'eau, assez soluble dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 pour cent, soluble dans la *solution d'iodure de potassium R* en excès.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Mercurique (nitrate).** $Hg(NO_3)_2,H_2O$. ($M_r$ 342,6). *1052400.* [7783-34-8]. Dinitrate de mercure monohydraté.

Cristaux incolores ou légèrement colorés, hygroscopiques, solubles dans l'eau en présence d'un peu d'acide nitrique.

*Conservation* : en récipient étanche, à l'abri de la lumière.

**Mercurique (oxyde).** HgO. ($M_r$ 216,6). *1052500.* [21908-53-2]. Oxyde jaune de mercure.

Poudre jaune ou jaune orangé, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Mercurique (sulfate), solution de.** *1052600.* [7783-35-9].

Dissolvez 1 g d'*oxyde mercurique R* dans un mélange de 20 mL d'*eau R* et de 4 mL d'*acide sulfurique R.*

**Mercurique (thiocyanate).** $Hg(SCN)_2$. ($M_r$ 316,7). *1052700.* [592-85-8]. Di(thiocyanate) de mercure.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, très peu soluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, soluble dans les solutions de chlorure de sodium.

**Solution de thiocyanate mercurique.** *1052701.*

Dissolvez 0,3 g de *thiocyanate mercurique R* dans de l'*éthanol anhydre R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

*Conservation* : pendant 1 semaine.

**Mésityle (oxyde de).** $C_6H_{10}O$. ($M_r$ 98,1). *1120100.* [141-79-7]. 4-Méthylpent-3-én-2-one.

Liquide incolore et huileux, soluble dans 30 parties d'eau, miscible à la majorité des solvants organiques.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,858.

Eb : 129 °C à 130 °C.

**Métaphosphorique (acide).** $(HPO_3)_x$. *1053000.* [37267-86-0].

Morceaux ou cylindres vitreux contenant une certaine proportion de métaphosphate de sodium, hygroscopiques, très solubles dans l'eau.

*Nitrates.* Chauffez à ébullition 1,0 g d'acide métaphosphorique avec 10 mL d'*eau R* et refroidissez. Ajoutez 1 mL de *solution de carmin d'indigo R*, 10 mL *d'acide sulfurique exempt d'azote R* et chauffez à ébullition. Il persiste une faible coloration bleue.

*Substances réductrices* : au maximum 0,01 pour cent, calculé en $H_3PO_3$.

Dissolvez 35,0 g d'acide métaphosphorique dans 50 mL d'*eau R*, ajoutez 5 mL d'une solution d'*acide sulfurique R* à 200 g/L, 50 mg de *bromure de potassium R* et 5,0 mL de *bromate de potassium 0,02 M.* Chauffez au bain-marie pendant 30 min. Laissez refroidir et ajoutez 0,5 g d'*iodure de potassium R.* Titrez l'iode libéré par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* en présence de 1 mL de *solution d'amidon R.* Effectuez un essai à blanc.

1 mL de *bromate de potassium 0,02 M* correspond à 4,10 mg de $H_3PO_3$.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Méthacrylique (acide).** $C_4H_6O_2$. ($M_r$ 86,1). *1101800.* [79-41-4]. Acide 2-méthyl-2-propénoïque.

Liquide incolore.

$n_D^{20}$ : environ 1,431.

Eb : environ 160 °C.

F : environ 16 °C.

**Méthane.** $CH_4$. ($M_r$ 16). *1166300.* [74-82-8].

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent *V/V.*

4. Réactifs

**Méthane R1.** $CH_4$. ($M_r$ 16). *1176400.* [74-82-8].
*Teneur* : au minimum 99,995 pour cent *V/V.*

**Méthanesulfonique (acide).** $CH_4O_3S$. ($M_r$ 96,1). *1053100.* [75-75-2].
Liquide limpide, incolore, miscible à l'eau, peu soluble dans le toluène, pratiquement insoluble dans l'hexane. La substance se solidifie au-dessous de 20 °C.
$d_{20}^{20}$ : environ 1,48.
$n_D^{20}$ : environ 1,430.

**Méthanol.** $CH_4O$. ($M_r$ 32,04). *1053200.* [67-56-1].
Liquide limpide et incolore, inflammable, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent.
$d_{20}^{20}$ : 0,791 à 0,793.
Eb : 64 °C à 65 °C.

**Méthanol R1.** *1053201.*
Satisfait aux spécifications du *méthanol R* et à la spécification supplémentaire suivante.
*Transmittance minimale* (*2.2.25*) déterminée en utilisant l'*eau R* comme liquide de compensation : 20 pour cent à 210 nm, 50 pour cent à 220 nm, 75 pour cent à 230 nm, 95 pour cent à 250 nm, 98 pour cent à 260 nm et plus.

**Méthanol R2.** *1053202.*
*Satisfait aux spécifications du méthanol R et aux spécifications supplémentaires suivantes.*
*Teneur* : au minimum 99,8 pour cent.
*Absorbance* (*2.2.25*) : au maximum 0,17, déterminé à 225 nm et en utilisant de l'*eau R* comme liquide de compensation.

**Méthanol chlorhydrique.** *1053203.*
Prélevez 1,0 mL d'*acide chlorhydrique R1* et complétez à 100,0 mL avec du *méthanol R*.

**Méthanol anhydre.** *1053400.* [67-56-1].
Traitez 1000 mL de *méthanol R* par 5 g de *magnésium R*. Amorcez, si nécessaire, la réaction par addition de 0,1 mL de *solution de chlorure mercurique R*. Lorsque le dégagement de gaz a cessé, distillez et recueillez le distillat dans un récipient sec, à l'abri de l'humidité.
*Eau* (*2.5.12*) : au maximum 0,3 g/L.

**Méthanol deutérié.** $C^2H_4O$. ($M_r$ 36,1). *1025200.* [811-98-3]. ($^2$H)-Méthanol. Méthanol-*d*.
*Degré de deutériation* : au minimum 99,8 pour cent.
Liquide limpide et incolore, miscible à l'eau, à l'éthanol à 96 pour cent et au chlorure de méthylène.
$d_{20}^{20}$ : environ 0,888.
$n_D^{20}$ : environ 1,326.
Eb : environ 65,4 °C.

**Méthanol exempt d'aldéhyde.** *1053300.*
Dissolvez 25 g d'*iode R* dans 1 L de *méthanol R*, puis versez, sous agitation constante, la solution dans 400 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M*. Ajoutez 150 mL d'*eau R*, puis laissez reposer pendant 16 h. Filtrez. Chauffez à reflux jusqu'à disparition de l'odeur d'iodoforme. Effectuez une distillation fractionnée.
*Aldéhydes et cétones* : au maximum 0,001 pour cent.

**DL-Méthionine.** *1129400.*
Voir *DL-Méthionine (0624).*

**L-Méthionine.** *1053500.* [63-68-3].
Voir *Méthionine (1027).*

**(*RS*)-Méthotrexate.** $C_{20}H_{22}N_8O_5$. *1120200.* [60388-53-6]. Acide (*RS*)-2-[4-[[(2,4-diaminoptéridin-6-yl)méthyl]méthylamino]benzoylamino]pentanedioïque.
*Teneur* : au minimum 96,0 pour cent.
F : environ 195 °C.

**Méthoxychlore.** $C_{16}H_{15}Cl_3O_2$. ($M_r$ 345,7). *1129300.* [72-43-5]. 1,1-(2,2,2-Trichloroéthylidène)-bis(4-méthoxybenzène).
Pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans la plupart des solvants organiques.
Eb : environ 346 °C.
F : 78 °C à 86 °C.
Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans l'isooctane) peut être utilisée.

***trans*-2-Méthoxycinnamaldéhyde.** $C_{10}H_{10}O_2$. ($M_r$ 162,2). *1129500.* [60125-24-8].
F : 44 °C à 46 °C.
*Le trans-2-méthoxycinnamaldéhyde utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*
*Dosage*. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de cannelier (1496).*
*Teneur* : au minimum 96,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Méthoxyéthanol.** *1036300.* [109-86-4].
Voir *Ethylèneglycol (éther monométhylique d') R.*

**(1*RS*)-1-(6-Méthoxynaphtalèn-2-yl)éthanol.** $C_{13}H_{14}O_2$. ($M_r$ 202,3). *1159600.* [77301-42-9]. 6-Méthoxy-α-méthyl-2-naphtalèneméthanol.
Poudre blanche ou sensiblement blanche.
F : environ 113 °C.

**1-(6-Méthoxynaphtalèn-2-yl)éthanone.** $C_{13}H_{12}O_2$. ($M_r$ 200,2). *1159700.* [3900-45-6]. 6′-Méthoxy-2′-acétonaphtone.
Poudre blanche ou sensiblement blanche.
F : environ 108 °C.

**Méthoxyphénylacétique (acide).** $C_9H_{10}O_3$. ($M_r$ 166,2). *1053600.* [7021-09-2]. Acide (*RS*)-2-méthoxy-2-phénylacétique.
Poudre cristalline blanche ou cristaux blancs ou sensiblement blancs, assez solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.
F : environ 70 °C.

**Réactif méthoxyphénylacétique.** *1053601.*
Dissolvez 2,7 g d'*acide méthoxyphénylacétique R* dans 6 mL de *solution d'hydroxyde de tétraméthylammonium R*, puis ajoutez 20 mL d'*éthanol anhydre R*.
*Conservation* : en récipient de polyéthylène.

**3-Méthoxy-L-tyrosine.** $C_{10}H_{13}NO_4H_2O$. ($M_r$ 229,2). *1164400.* [200630-46-2].
Poudre sensiblement blanche ou jaune.

**Méthylal.** $C_3H_8O_2$. ($M_r$ 76,1). *1173500.* [109-87-5]. Diméthoxyméthane. Dioxapentane. Formaldéhyde-diméthylacétal. Bisoxyde de méthylène et de diméthyle.
Liquide limpide, incolore, volatil et inflammable, soluble dans l'eau et miscible à l'éthanol à 96 pour cent.
$d_{20}^{20}$ : environ 0,860.
$n_D^{20}$ : environ 1,354.
Eb : environ 41 °C.
*Le méthylal utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*
*Teneur* : au minimum 99,5 pour cent, déterminé par chromatographie gazeuse.

**4-Méthylaminophénol (sulfate de).** $C_{14}H_{20}N_2O_6S$. ($M_r$ 344,4). *1053800.* [55-55-0].
Cristaux incolores, très solubles dans l'eau, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.
F : environ 260 °C.

**Méthylbenzothiazolone-hydrazone (chlorhydrate de).** $C_8H_{10}ClN_3S,H_2O$. ($M_r$ 233,7). *1055300.* [38894-11-0]. Chlorhydrate de 3-méthylbenzothiazol-2(3*H*)-one hydrazone monohydraté.

Poudre cristalline, sensiblement blanche ou jaunâtre.

F : environ 270 °C.

*Essai de validité pour la détermination des aldéhydes.* A 2 mL de *méthanol exempt d'aldéhyde R*, ajoutez 60 µL d'une solution de *propionaldéhyde R* à 1 g/L dans le *méthanol exempt d'aldéhyde R* et 5 mL d'une solution de chlorhydrate de méthylbenzothiazolone-hydrazone à 4 g/L. Mélangez et laissez reposer pendant 30 min. Préparez une solution à blanc sans addition de solution de propionaldéhyde. Ajoutez 25,0 mL d'une solution de *chlorure ferrique R* à 2 g/L à la solution à examiner et à la solution à blanc, complétez à 100,0 mL avec de l'*acétone R* et mélangez. L'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner, mesurée à 660 nm en utilisant la solution à blanc comme liquide de compensation, est au minimum de 0,62.

**(*R*)-(+)-α-Méthylbenzyle (isocyanate de).** $C_9H_9NO$. ($M_r$ 147,2). *1171400.* [33375-06-3]. Isocyanate de (+)-(*R*)-α-méthylbenzyle. (+)-[(1*R*)-1-Isocyanatoéthyl]benzène. (+)-Isocyanate de (1*R*)-1-phényléthyle.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent.

Liquide incolore.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,045.

$n_D^{20}$ : environ 1,513.

Eb : 55 °C à 56 °C sous 2,5 mm Hg.

*Pureté énantiomérique* : au minimum 99,5.

*Conservation* : à une température de 2 °C à 8 °C.

**(*S*)-(–)-α-Méthylbenzyle (isocyanate de).** $C_9H_9NO$. ($M_r$ 147,2). *1170200.* [14649-03-7]. (–)-(*S*)-α-Méthylbenzyle (isocyanate de). (–)-[(1*S*)-1-Isocyanatoéthyl]benzène. (–)-Isocyanate de (1*S*)-1-phényléthyle.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent.

Liquide incolore.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,045.

$n_D^{20}$ : environ 1,514.

Eb : 55 °C à 56 °C sous 2,5 mm Hg.

*Pureté énantiomérique* : au minimum 99,5 pour cent.

*Conservation* : à une température de 2 °C à 8 °C.

*NOTE : ne pas utiliser le réactif s'il présente une coloration.*

**2-Méthylbutane.** $C_5H_{12}$. ($M_r$ 72,2). *1099500.* [78-78-4]. Isopentane.

*Teneur* : au minimum 99,5 pour cent.

Liquide incolore très inflammable.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,621.

$n_D^{20}$ : environ 1,354.

Eb : environ 29 °C.

*Eau* (*2.5.12*) : au maximum 0,02 pour cent.

*Résidu à l'évaporation* : au maximum 0,0003 pour cent.

*Transmittance minimale* (*2.2.25*) déterminée en utilisant l'*eau R* comme liquide de compensation : 50 pour cent à 210 nm, 85 pour cent à 220 nm, 98 pour cent à 240 nm et plus.

**2-Méthylbut-2-ène.** $C_5H_{10}$. ($M_r$ 70,1). *1055400.* [513-35-9].

Liquide très inflammable, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

Eb : 37,5 °C à 38,5 °C.

**Méthylcellulose 450.** *1055500.* [9004-67-5].

Voir *Méthylcellulose (0345).*

*Viscosité nominale* : 450 mPa·s.

**Méthyldopa racémique.** $C_{10}H_{13}NO_4,1\frac{1}{2}H_2O$. ($M_r$ 238,2). *1175100.*

Mélange à volumes égaux d'acide (2*S*)- et d'acide (2*R*)-2-amino-3-(3,4-dihydroxyphényl)-2-méthylpropanoïque.

**3-*O*-Méthyldopamine (chlorhydrate de).** $C_9H_{14}ClNO_2$. ($M_r$ 203,7). *1055600.* [1477-68-5]. Chlorhydrate de 4-(2-aminoéthyl)-2-méthoxyphénol.

F : 213 °C à 215 °C.

**4-*O*-Méthyldopamine (chlorhydrate de).** $C_9H_{14}ClNO_2$. ($M_r$ 203,7). *1055700.* [645-33-0]. Chlorhydrate de 5-(2-aminoéthyl)-2-méthoxyphénol.

F : 207 °C à 208 °C.

**Méthyle (acétate de).** $C_3H_6O_2$. ($M_r$ 74,1). *1053700.* [79-20-9].

Liquide limpide, incolore, soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,933.

$n_D^{20}$ : environ 1,361.

Eb : 56 °C à 58 °C.

**Méthyle (4-acétylbenzoate de).** $C_{10}H_{10}O_3$. ($M_r$ 178,2). *1154100.* [3609-53-8].

F : environ 94 °C.

**Réactif au 4-acétylbenzoate de méthyle.** *1154101.*

Dissolvez 0,25 g de *4-acétylbenzoate de méthyle R* dans un mélange de 5 mL d'*acide sulfurique R* et de 85 mL de *méthanol R* refroidi.

**Méthyle (4-aminobenzoate de).** $C_8H_9NO_2$. ($M_r$ 151,2). *1175600.* [619-45-4].

F : 110 °C à 113 °C.

**Méthyle (anthranilate de).** $C_8H_9NO_2$. ($M_r$ 151,2). *1107300.* [134-20-3]. 2-Aminobenzoate de méthyle.

Cristaux incolores ou liquide incolore ou jaunâtre, solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

Eb : 134 °C à 136 °C.

F : 24 °C à 25 °C.

*L'anthranilate de méthyle utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de fleur d'oranger amer (1175).*

*Solution à examiner.* L'anthranilate de méthyle à examiner.

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Méthyle (arachidate de).** $C_{21}H_{42}O_2$. ($M_r$ 326,6). *1053900.* [1120-28-1]. Eicosanoate de méthyle.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent, déterminé par chromatographie en phase gazeuse (*2.4.22*).

Masse cristalline blanche ou jaunâtre, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, et dans l'éther de pétrole.

F : environ 46 °C.

**Méthyle (béhénate de).** $C_{23}H_{46}O_2$. ($M_r$ 354,6). *1107500.* [929-77-1]. Docosanoate de méthyle.

F : 54 °C à 55 °C.

**Méthyle (benzènesulfonate de).** $C_7H_8O_3S$. ($M_r$ 172,2). *1159800.* [80-18-2].

Liquide incolore, limpide.

Eb : environ 148 °C.

**Méthyle (benzoate de).** $C_8H_8O_2$. ($M_r$ 136,2). *1164500.* [93-58-3]. Ester méthylique de l'acide benzoïque.

Liquide incolore.

$d_4^{20}$ : 1,088.

Eb : environ 200 °C.

4. Réactifs

**Méthyle (caprate de).** *1054000.*
Voir *Méthyle (décanoate de) R.*

**Méthyle (caproate de).** $C_7H_{14}O_2$. ($M_r$ 130,2). *1120300.* [106-70-7]. Hexanoate de méthyle.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,885.

$n_D^{20}$ : environ 1,405.

Eb : 150 °C à 151 °C.

**Méthyle (caprylate de).** $C_9H_{18}O_2$. ($M_r$ 158,2). *1120400.* [111-11-5]. Octanoate de méthyle.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,876.

$n_D^{20}$ : environ 1,417.

Eb : 193 °C à 194 °C.

**Méthyle (cinnamate de).** $C_{10}H_{10}O_2$. ($M_r$ 162,2). *1099400.* [103-26-4].

Cristaux incolores, pratiquement insolubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

$n_D^{20}$ : environ 1,56.

Eb : environ 260 °C.

F : 34 °C à 36 °C.

**Méthyle (décanoate de).** $C_{11}H_{22}O_2$. ($M_r$ 186,3). *1054000.* [110-42-9]. *n*-Décanoate de méthyle.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent.

Liquide limpide, incolore ou jaunâtre, soluble dans l'éther de pétrole

$d_{20}^{20}$ : 0,871 à 0,876.

$n_D^{20}$ : 1,425 à 1,426.

*Substances étrangères.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) en injectant le même volume de chacune des solutions suivantes : une solution de décanoate de méthyle à 0,02 g/L dans du *sulfure de carbone R* (solution A), une solution de décanoate de méthyle à 2 g/L dans du *sulfure de carbone R* (solution B), et du *sulfure de carbone R* (solution C). Effectuez la chromatographie selon les conditions de l'essai du butylhydroxytoluène prescrit dans la monographie *Graisse de laine (0134).* La surface totale des pics autres que le pic du solvant et le pic principal, dans le chromatogramme obtenu avec la solution B est inférieure à celle du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution A.

**Méthyle (eicosénoate de).** $C_{21}H_{40}O_2$. ($M_r$ 324,6). *1120500.* [2390-09-2]. (11*Z*)-Eicos-11-énoate de méthyle.

**Méthyle (érucate de).** $C_{23}H_{44}O_2$. ($M_r$ 352,6). *1146100.* [1120-34-9]. *cis*-13-Docosénoate de méthyle.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,871.

$n_D^{20}$ : environ 1,456.

**Méthyle (4-hydroxybenzoate de).** *1055000.* [99-76-3].
Voir *Parahydroxybenzoate de méthyle R.*

**Méthyle (iodure de).** $CH_3I$. ($M_r$ 141,9). *1166400.* [74-88-4]. Iodométhane.

**Méthyle (laurate de).** $C_{13}H_{26}O_2$. ($M_r$ 214,4). *1054400.* [111-82-0]. Dodécanoate de méthyle.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent déterminé par chromatographie en phase gazeuse (*2.4.22*).

Liquide incolore ou jaunâtre, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans l'éther de pétrole.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,87.

$n_D^{20}$ : environ 1,431.

F : environ 5 °C.

**Méthyle (lignocérate de).** $C_{25}H_{50}O_2$. ($M_r$ 382,7). *1120600.* [2442-49-1]. Tétracosanoate de méthyle.

Paillettes.

F : environ 58 °C.

**Méthyle (linoléate de).** $C_{19}H_{34}O_2$. ($M_r$ 294,5). *1120700.* [112-63-0]. (9*Z*,12*Z*)-Octadéca-9,12-diénoate de méthyle.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,888.

$n_D^{20}$ : environ 1,466.

Eb : 207 °C à 208 °C.

**Méthyle (linolénate de).** $C_{19}H_{32}O_2$. ($M_r$ 292,5). *1120800.* [301-00-8]. (9*Z*,12*Z*,15*Z*)-Octadéca-9,12,15-triénoate de méthyle.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,901.

$n_D^{20}$ : environ 1,471.

Eb : environ 207 °C.

**Méthyle (γ-linolénate de).** $C_{19}H_{32}O_2$. ($M_r$ 292,5). *1158400.* [16326-32-2]. (6*Z*,9*Z*,12*Z*)-Octadéca-6,9,12-triénoate de méthyle.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent, déterminé par chromatographie en phase gazeuse.

**Méthyle (margarate de).** $C_{18}H_{36}O_2$. ($M_r$ 284,5). *1120900.* [1731-92-6]. Heptadécanoate de méthyle.

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

F : 32 °C à 34 °C.

*Le margarate de méthyle utilisé dans le dosage des acides gras totaux du Fruit de sabal (1848) satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*), selon les indications données dans la monographie *Fruit de sabal (1848).*

*Teneur* : au minimum 97 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Méthyle (méthacrylate de).** $C_5H_8O_2$. ($M_r$ 100,1). *1054500.* [80-62-6]. 2-Méthylprop-2-énoate de méthyle.

Liquide incolore.

$n_D^{20}$ : environ 1,414.

Eb : environ 100 °C.

F : environ – 48 °C.

Le méthacrylate de méthyle contient un réactif de stabilisation approprié.

**Méthyle (*N*-méthylanthranilate de).** $C_9H_{11}NO_2$. ($M_r$ 165,2). *1164600.* [85-91-6]. 2-(Méthylamino)benzoate de méthyle.

Liquide jaune pâle.

$d_4^{20}$ : environ 1,128.

$n_D^{20}$ : environ 1,579.

Eb : 255 °C à 258 °C.

*Le N-méthylanthranilate de méthyle utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de mandarine (2355).*

*Solution à examiner.* Le *N*-méthylanthranilate de méthyle à examiner.

*Teneur* : au minimum 97 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Méthyle (myristate de).** $C_{15}H_{30}O_2$. ($M_r$ 242,4). *1054600.* [124-10-7]. Tétradécanoate de méthyle.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent, déterminé par chromatographie en phase gazeuse (*2.4.22*).

Liquide incolore ou légèrement jaunâtre, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans l'éther de pétrole.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,87.

$n_D^{20}$ : environ 1,437.

F : environ 20 °C.

**Méthyle (nervonate de).** *1144800.* [2733-88-2].
Voir *Tétracos-15-énoïque (ester méthylique d'acide) R.*

**Méthyle (oléate de).** $C_{19}H_{36}O_2$. ($M_r$ 296,4). *1054700.* [112-62-9]. (*Z*)-Octadéc-9-énoate de méthyle.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent de $C_{19}H_{36}O_2$, déterminé par chromatographie en phase gazeuse (*2.4.22*).

Liquide incolore ou légèrement jaunâtre, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans l'éther de pétrole.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,88.

$n_D^{20}$ : environ 1,452.

**Méthyle (palmitate de).** $C_{17}H_{34}O_2$. ($M_r$ 270,5). *1054900.* [112-39-0]. Hexadécanoate de méthyle.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent, déterminé par chromatographie en phase gazeuse (*2.4.22*).

Masse cristalline blanche ou jaunâtre, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans l'éther de pétrole.

F : environ 30 °C.

**Méthyle (palmitoléate de).** $C_{17}H_{32}O_2$. ($M_r$ 268,4). *1121000.* [1120-25-8]. (9*Z*)-Hexadéc-9-énoate de méthyle.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,876.

$n_D^{20}$ : environ 1,451.

**Méthyle (parahydroxybenzoate de).** *1055000.* [99-76-3].

Voir *Parahydroxybenzoate de méthyle (0409).*

**Méthyle (pélargonate de).** $C_{10}H_{20}O_2$. ($M_r$ 172,3). *1143500.* [1731-84-6]. Nonanoate de méthyle.

Liquide limpide, incolore.

$d_4^{20}$ : environ 0,873.

$n_D^{20}$ : environ 1,422.

Eb : 91 °C à 92 °C.

*Le pélargonate de méthyle utilisé dans le dosage des acides gras totaux du Fruit de sabal (1848) satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage*. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Fruit de sabal (1848).*

*Teneur* : au minimum 98 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Méthyle (salicylate de).** *1146200.* [119-36-8].

Voir *Salicylate de méthyle (0230).*

**Méthyle (stéarate de).** $C_{19}H_{38}O_2$. ($M_r$ 298,5). *1055200.* [112-61-8]. Octadécanoate de méthyle.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent, déterminé par chromatographie en phase gazeuse (*2.4.22*).

Masse cristalline blanche ou jaunâtre, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans l'éther de pétrole.

F : environ 38 °C.

**3-*O*-Méthylestrone.** $C_{19}H_{24}O_2$. ($M_r$ 284,4). *1137000.* [1624-62-0]. 3-Méthoxy-1,3,5(10)-estratrién-17-one.

Poudre blanche ou blanc-jaune.

$[\alpha]_D^{20}$ : environ + 157.

F : environ 173 °C.

**Méthyle (tricosanoate de).** $C_{24}H_{48}O_2$. ($M_r$ 368,6). *1111500.* [2433-97-8]. Ester méthylique de l'acide tricosanoïque.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, insolubles dans l'eau et solubles dans l'hexane.

F : 55 °C à 56 °C.

**Méthyle (tridécanoate de).** $C_{14}H_{28}O_2$. ($M_r$ 228,4). *1121100.* [1731-88-0].

Liquide incolore ou faiblement jaune, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans l'éther de pétrole.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,86.

$n_D^{20}$ : environ 1,441.

F : environ 6 °C.

**Méthylène bisacrylamide.** $C_7H_{10}N_2O_2$. ($M_r$ 154,2). *1056000.* [110-26-9]. *N,N'*-Méthylène dipropénamide.

Poudre fine et sensiblement blanche, peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : 300 °C, avec décomposition.

**Méthylène (chlorure de).** $CH_2Cl_2$. ($M_r$ 84,9). *1055900.* [75-09-2]. Dichlorométhane.

Liquide incolore, assez soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

Eb : 39 °C à 42 °C.

*Le chlorure de méthylène utilisé en fluorimétrie satisfait également à l'essai suivant.*

*Fluorescence*. Sous une irradiation à 365 nm, la fluorescence (*2.2.21*) mesurée à 460 nm sous une épaisseur de 1 cm n'est pas plus intense que celle d'une solution de *quinine R* à 0,002 ppm dans l'*acide sulfurique 0,5 M*, mesurée dans les mêmes conditions.

**Chlorure de méthylène acidifié.** *1055901.*

A 100 mL de *chlorure de méthylène R*, ajoutez 10 mL d'*acide chlorhydrique R* ; agitez, laissez reposer la solution et séparez les 2 phases. Utilisez la phase inférieure.

**Méthyléthylcétone.** $C_4H_8O$. ($M_r$ 72,1). *1054100.* [78-93-3]. Ethylméthylcétone. 2-Butanone.

Liquide limpide et incolore, inflammable, très soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,81.

Eb : 79 °C à 80 °C.

**1-Méthylimidazole.** $C_4H_6N_2$. ($M_r$ 82,1). *1139700.* [616-47-7]. 1-Méthyl-1*H*-imidazole.

Liquide incolore ou légèrement jaunâtre.

$n_D^{20}$ : environ 1,495.

Eb : 195 °C à 197 °C.

*Conservation* : en récipient étanche, à l'abri de la lumière.

**1-Méthylimidazole R1.** *1139701.*

Satisfait aux spécifications du *1-méthylimidazole R* et à la spécification supplémentaire suivante.

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent.

**2-Méthylimidazole.** $C_4H_6N_2$. ($M_r$ 82,1). *1143400.* [693-98-1].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche.

F : environ 145 °C.

**Méthylisobutylcétone.** $C_6H_{12}O$. ($M_r$ 100,2). *1054300.* [108-10-1]. 4-Méthyl-2-pentanone.

Liquide limpide et incolore, peu soluble dans l'eau, miscible à la plupart des solvants organiques.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,80.

Eb : environ 115 °C.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*). Distillez 100 mL de méthylisobutylcétone ; l'intervalle de température de distillation de 1 mL à 95 mL de distillat ne dépasse pas 4,0 °C.

*Résidu à l'évaporation*. Evaporez la méthylisobutylcétone au bain-marie et desséchez à 100-105 °C. La masse du résidu à l'évaporation est au maximum de 0,01 pour cent.

**Méthylisobutylcétone R1.** *1054301.*

Agitez 50 mL de *méthylisobutylcétone R* récemment distillée avec 0,5 mL d'*acide chlorhydrique R1* pendant 1 min. Laissez séparer les phases et rejetez la phase inférieure. Préparez extemporanément.

**Méthylisobutylcétone R3.** *1054302.*

Satisfait aux exigences de la *méthylisobutylcétone R* et aux limites suivantes.

*Cr* : au maximum 0,02 ppm.

*Cu* : au maximum 0,02 ppm.

*Pb* : au maximum 0,1 ppm.
*Ni* : au maximum 0,02 ppm.
*Sn* : au maximum 0,1 ppm.

**2-Méthyl-5-nitroimidazole.** $C_4H_5N_3O_2$. ($M_r$ 127,1). *1056100.* [88054-22-2].

Poudre blanche ou jaune clair.

F : 252 °C à 254 °C.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent.

**Méthylorange.** $C_{14}H_{14}N_3NaO3S$. ($M_r$ 327,3). *1054800.* [547-58-0].

Schultz No. 176.

Colour Index No. 13025.
4′-(Diméthylamino)azobenzène-4-sulfonate de sodium.

Poudre cristalline jaune orangé, peu soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Indicateur mixte au méthylorange.** *1054801.*

Dissolvez 20 mg de *méthylorange R* et 0,1 g de *vert de bromocrésol R* dans 1 mL d'*hydroxyde de sodium 0,2 M* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R.*

*Zone de virage* : pH 3,0 (orangé) à pH 4,4 (vert-jaune).

**Solution de méthylorange.** *1054802.*

Dissolvez 0,1 g de *méthylorange R* dans 80 mL d'*eau R* et complétez à 100 mL avec de l'*éthanol à 96 pour cent R.*

*Essai de sensibilité.* Mélangez 0,1 mL de solution de méthylorange et 100 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R.* La solution est jaune. Le virage au rouge de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,1 mL d'*acide chlorhydrique 1 M.*

*Zone de virage* : pH 3,0 (rouge) à pH 4,4 (jaune).

**4-Méthylpentan-2-ol.** $C_6H_{14}O$. ($M_r$ 102,2). *1114300.* [108-11-2].

Liquide limpide, incolore et volatil.

$d_4^{20}$ : environ 0,802.

$n_D^{20}$ : environ 1,411.

Eb : environ 132 °C.

**3-Méthylpentan-2-one.** $C_6H_{12}O$. ($M_r$ 100,2). *1141100.* [565-61-7].

Liquide incolore, inflammable.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,815.

$n_D^{20}$ : environ 1,400.

Eb : environ 118 °C.

**Méthylphényloxazolylbenzène.** $C_{26}H_{20}N_2O_2$. ($M_r$ 392, 5). *1056200.* [3073-87-8]. 1,4-Bis[2-(4-méthyl-5-phényl)oxazolyl]benzène.

Poudre fine jaune-vert présentant une fluorescence bleue ou petits cristaux, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent, assez solubles dans le xylène.

F : environ 233 °C.

Le méthylphényloxazolylbenzène, utilisé pour la scintillation liquide, doit être d'un degré analytique approprié.

**1-Méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine.** $C_{12}H_{15}N$. ($M_r$ 173,3). *1137100.* [28289-54-5]. MPTP.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, peu soluble dans l'eau.

F : environ 41 °C.

**Méthylpipérazine.** $C_5H_{12}N_2$. ($M_r$ 100,2). *1056300.* [109-01-3]. 1-Méthylpipérazine.

Liquide incolore, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,90.

$n_D^{20}$ : environ 1,466.

Eb : environ 138 °C.

**4-(4-Méthylpipéridin-1-yl)pyridine.** $C_{11}H_{16}N_2$. ($M_r$ 176,3). *1114400.* [80965-30-6].

Liquide limpide.

$n_D^{20}$ : environ 1,565.

**2-Méthylpropanol.** $C_4H_{10}O$. ($M_r$ 74,1). *1056400.* [78-83-1]. Alcool isobutylique. 2-Méthylpropan-1-ol.

Liquide limpide, incolore, soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,80.

$n_D^{15}$ : 1,397 à 1,399.

Eb : environ 107 °C.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : au minimum 96 pour cent distillent de 107 °C à 109 °C.

**2-Méthyl-2-propanol.** $C_4H_{10}O$. ($M_r$ 74,1). *1056500.* [75-65-0]. (1,1-Diméthyl)éthanol. Alcool *tert*-butylique.

Liquide limpide ou masse cristalline, incolore, soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

*Point de solidification* (*2.2.18*) : environ 25 °C.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : au minimum 95 pour cent distillent de 81 °C à 83 °C.

**(15*R*)-15-Méthylprostaglandine $F_{2\alpha}$.** $C_{21}H_{36}O_5$. ($M_r$ 368,5). *1159900.* [35864-81-4]. Acide (5*Z*)-7-[(1*R*,2*R*,3*R*,5*S*)-3,5-dihydroxy-2-[(1*E*)-(3*R*)-3-hydroxy-3-méthyloct-1-ényl]cyclopentyl]hept-5-énoïque.

Disponible sous forme d'une solution à 10 g/L dans l'*acétate de méthyle R.*

*Conservation* : à une température inférieure à – 15 °C.

***N*-Méthylpyrrolidine.** $C_5H_{11}N$. ($M_r$ 85,2). *1164700.* [120-94-5].

*Teneur* : au minimum 97,0 pour cent.

Eb : environ 80 °C.

***N*-Méthylpyrrolidone.** $C_5H_9NO$. ($M_r$ 99,1). *1164800.* [872-50-4]. 1-Méthylpyrrolidin-2-one.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,028.

Eb : environ 202 °C.

F : environ – 24 °C.

***N*-Méthyl-*m*-toluidine.** $C_8H_{11}N$. ($M_r$ 121,2). *1175200.* [696-44-6]. *N*,3-Diméthylaniline. *N*,3-Diméthylbenzènamine. Méthyl-*m*-tolylamine.

*Teneur* : au minimum 97 pour cent.

**Méthyl 3,4,5-triméthoxybenzoate.** $C_{11}H_{14}O_5$. ($M_r$ 226,23). *1177200.* [1916-07-0].

***N*-Méthyltriméthylsilyl-trifluoroacétamide.** $C_6H_{12}F_3NOSi$. ($M_r$ 199,3). *1129600.* [24589-78-4]. 2,2,2-Trifluoro-*N*-méthyl-*N*-(triméthylsilyl)acétamide.

$n_D^{20}$ : environ 1,380.

Eb : 130 °C à 132 °C.

**Minocycline (chlorhydrate de).** *1146300.*

Voir *Chlorhydrate de minocycline (1030).*

**Molybdovanadique (réactif).** *1056700.*

Dans un vase cylindrique de 150 mL, mélangez 4 g de *molybdate d'ammonium R* finement pulvérisé et 0,1 g de *vanadate d'ammonium R* finement pulvérisé. Ajoutez 70 mL d'*eau R* et broyez les particules avec une baguette de verre. Une solution limpide est obtenue après quelques minutes. Ajoutez 20 mL d'*acide nitrique R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R.*

**Monodocosahexaénoïne.** $C_{25}H_{38}O_4$. ($M_r$ 402,6). *1143600.* [124516-13-8]. Monoglycéride de l'acide docosahexaénoïque (C22:6). Monodocosahexaénoate de glycérol. Monoester de l'acide (*tout-Z*)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaénoïque avec le propane-1,2,3-triol.

**Mordant noir 11.** $C_{20}H_{12}N_3NaO_7S$. ($M_r$ 461,4). *1056800.* [1787-61-7].

Schultz No. 241.

Colour Index No. 14645.
2-Hydroxy-1-[(1-hydroxynapht-2-yl)azo]-6-nitronaphtalène-4-sulfonate de sodium. Noir ériochrome.

Poudre brun-noir, soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche, à l'abri de la lumière.

**Mélange composé au mordant noir 11.** *1056801.*

Mélangez 1 g de *mordant noir 11 R* et 99 g de *chlorure de sodium R.*

*Essai de sensibilité.* Dissolvez 50 mg de mélange composé au mordant noir 11 dans 100 mL d'*eau R.* La solution est brun-violet. Ajoutez 0,3 mL d'*ammoniaque diluée R1.* La solution vire au bleu, puis au violet par addition de 0,1 mL d'une solution de *sulfate de magnésium R* à 10 g/L.

*Conservation* : en récipient étanche, à l'abri de la lumière.

**Mélange composé au mordant noir 11 R1.** *1056802.*

Mélangez 1,0 g de *mordant noir 11 R*, 0,4 g de *méthylorange R* et 0,1 g de *chlorure de sodium R.*

**Morphine (chlorhydrate de).** *1056900.*

Voir *Chlorhydrate de morphine (0097).*

**Morpholine.** $C_4H_9NO$. ($M_r$ 87,1). *1057000.* [110-91-8].
Tétrahydro-1,4-oxazine.

Liquide incolore, hygroscopique, inflammable, soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,01.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : au minimum 95 pour cent distillent de 126 °C à 130 °C.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Morpholine pour chromatographie.** *1057001.*

Satisfait aux spécifications de la *morpholine R* et à la spécification suivante.

*Teneur* : au minimum 99,5 pour cent.

**Murexide.** $C_8H_8N_6O_6,H_2O$. ($M_r$ 302,2). *1137200.* Sel monoammoniacal de 5,5'-nitrilobis(pyrimidine-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-trione).

Poudre cristalline, rouge-brun, assez soluble dans l'eau froide, soluble dans l'eau chaude, pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 pour cent, soluble dans les solutions d'hydroxyde de potassium ou d'hydroxyde de sodium en donnant une coloration bleue.

**Myosmine.** $C_9H_{10}N_2$. ($M_r$ 146,2). *1121200.* [532-12-7].
3-(4,5-Dihydro-3*H*-pyrrol-2-yl)pyridine.

Cristaux incolores.

F : environ 45 °C.

**β-Myrcène.** $C_{10}H_{16}$. ($M_r$ 136,2). *1114500.* [123-35-3].
7-Méthyl-3-méthylènocta-1,6-diène.

Liquide huileux d'odeur agréable, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent, soluble dans l'acide acétique glacial. Le β-myrcène se dissout dans les solutions d'hydroxydes alcalins.

$d_4^{20}$ : environ 0,794.

$n_D^{20}$ : environ 1,470.

*Le β-myrcène utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications décrites dans la monographie *Huile essentielle de menthe poivrée (0405).*

*Solution à examiner.* Le β-myrcène à examiner.

*Teneur* : au minimum 90,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Myristicine.** $C_{11}H_{12}O_3$. ($M_r$ 192,2). *1099600.* [607-91-0].
5-Allyl-1-méthoxy-2,3-méthylènedioxybenzène.
4-Méthoxy-6-(prop-2-ényl)-1,3-benzodioxole.

Liquide huileux, incolore, pratiquement insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol anhydre, miscible dans le toluène et le xylène.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,144.

$n_D^{20}$ : environ 1,540.

Eb : 276 °C à 277 °C.

F : 173 °C.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Badiane (1153)* ; le chromatogramme présente une seule tache principale.

*La myristicine utilisée en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de noix muscade (1552).*

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Myristique (acide).** $C_{14}H_{28}O_2$. ($M_r$ 228,4). *1143700.* [544-63-8].
Acide tétradécanoïque.

Paillettes incolores ou blanches ou sensiblement blanches.

F : environ 58,5 °C.

*L'acide myristique utilisé dans le dosage des acides gras totaux du Fruit de sabal (1848) satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Fruit de sabal (1848).*

*Teneur* : au minimum 97 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Myristique (alcool).** $C_{14}H_{30}O$. ($M_r$ 214,4). *1121300.* [112-72-1].
1-Tétradécanol.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,823.

F : 38 °C à 40 °C.

**Myrtilline.** $C_{21}H_{21}ClO_{12}$. ($M_r$ 500,8). *1172300.* [6906-38-3].
Chlorure de delphinidine 3-*O*-glucoside.

**Naphtalène.** $C_{10}H_8$. ($M_r$ 128,2). *1057100.* [91-20-3].

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, pratiquement insolubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 80 °C.

*Le naphtalène utilisé pour la scintillation liquide, doit être d'un degré analytique approprié.*

**Naphtarson.** $C_{16}H_{11}AsN_2Na_2O_{10}S_2$. ($M_r$ 576,3).
*1121400.* [3688-92-4]. Thorin. 4-[(2-Arsonophényl)azo]-3-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonate disodique.

Poudre rouge, soluble dans l'eau.

**Solution de naphtarson.** *1121401.*

Solution à 0,58 g/L.

*Essai de sensibilité.* A 50 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* ajoutez 20 mL d'*eau R*, 1 mL d'*acide sulfurique 0,05 M* et 1 mL de solution de naphtarson. Titrez par le *perchlorate de baryum 0,025 M.* La coloration vire du jaune-orange au rose-orange.

*Conservation* : à l'abri de la lumière pendant 1 semaine.

**α-Naphtol.** $C_{10}H_8O$. ($M_r$ 144,2). *1057300.* [90-15-3]. 1-Naphtol.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores blancs ou sensiblement blancs, noircissant par exposition à la lumière, peu solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 95 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

4. Réactifs

**Solution d'α-naphtol.** *1057301.*

Dissolvez 0,10 g d'*α-naphtol R* dans 3 mL d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 150 g/L et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*. Préparez extemporanément.

**β-Naphtol.** $C_{10}H_8O$. ($M_r$ 144,2). *1057400.* [135-19-3]. 2-Naphtol.

Cristaux ou paillettes légèrement rosés ou blancs, très peu solubles dans l'eau, très solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 122 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Solution de β-naphtol.** *1057401.*

Dissolvez 5 g de *β-naphtol R*, récemment recristallisé, dans 40 mL de solution diluée d'*hydroxyde de sodium R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*. Préparez extemporanément.

**Solution de β-naphtol R1.** *1057402.*

Dissolvez 3,0 mg de *β-naphtol R* dans 50 mL d'*acide sulfurique R* et complétez à 100,0 mL avec le même acide. Utilisez une solution récemment préparée.

**Naphtolbenzéine.** $C_{27}H_{18}O_2$. ($M_r$ 374,4). *1057600.* [145-50-6]. α-Naphtolbenzéine. 4-[(4-Hydroxynaphtalén-1-yl)(phényl)méthylidène]naphtalén-1(4*H*)-one.

Poudre rouge-brun ou cristaux brillants brun-noir, pratiquement insolubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent et dans l'acide acétique glacial.

**Solution de naphtolbenzéine.** *1057601.*

Solution à 2 g/L dans l'*acide acétique anhydre R*.

*Essai de sensibilité.* A 50 mL d'*acide acétique glacial R*, ajoutez 0,25 mL de solution de naphtolbenzéine. La solution est jaune-brun. Le virage au vert de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,05 mL d'*acide perchlorique 0,1 M.*

**1-Naphtylacétique (acide).** $C_{12}H_{10}O_2$. ($M_r$ 186,2). *1148400.* [86-87-3]. Acide (naphtalén-1-yl)acétique.

Poudre cristalline blanche ou jaune, très peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'acétone.

F : environ 135 °C.

**Naphtylamine.** $C_{10}H_9N$. ($M_r$ 143,2). *1057700.* [134-32-7]. 1-Naphtylamine.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche virant au rose par exposition à la lumière et à l'air, peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 51 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Naphtyléthylènediamine (dichlorhydrate de).** $C_{12}H_{16}Cl_2N_2$. ($M_r$ 259,2). *1057800.* [1465-25-4]. Dichlorhydrate de *N*-(1-naphtyl)éthylènediamine.

Il peut contenir du méthanol de cristallisation.

Poudre blanche ou blanc-jaune, soluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution de dichlorhydrate de naphtyléthylènediamine.** *1057801.*

Dissolvez 0,1 g de *dichlorhydrate de naphthyléthylènediamine R* dans de l'*eau R* et complétez à 100 mL avec le même solvant. Préparez extemporanément.

**Naringine.** $C_{27}H_{32}O_{14}$. ($M_r$ 580,5). *1137300.* [10236-47-2]. 7-[[2-*O*-(6-Désoxy-α-L-mannopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl]oxy]-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphényl)-2,3-dihydro-4*H*-chromén-4-one.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, peu soluble dans l'eau, soluble dans le méthanol et dans le diméthylformamide.

F : environ 171 °C.

*Absorbance* (*2.2.25*). La naringine dissoute dans une solution de *diméthylformamide R* à 5 g/L dans le *méthanol R* présente un maximum d'absorption à 283 nm.

***trans*-Nérolidol.** $C_{15}H_{26}O$. ($M_r$ 222,4). *1107900.* [40716-66-3]. 3,7,11-Triméthyldodéca-1,6,10-trién-3-ol.

Liquide légèrement jaune, d'odeur fine de lys et de muguet, pratiquement insoluble dans l'eau et dans le glycérol, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,876.

$n_D^{20}$ : environ 1,479.

$Eb_{12}$ : 145 °C à 146 °C.

*Le trans-nérolidol utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de fleur d'oranger amer (1175).*

*Solution à examiner.* Le *trans*-nérolidol à examiner.

*Teneur* : au minimum 90,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Néryle (acétate de).** $C_{12}H_{20}O_2$. ($M_r$ 196,3). *1108000.* [141-12-8]. Acétate de (*Z*)-3,7-diméthylocta-2,6-dién-1-yle.

Liquide huileux, incolore.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,907.

$n_D^{20}$ : environ 1,460.

$Eb_{25}$ : environ 134 °C.

*L'acétate de néryle utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de fleur d'oranger amer (1175).*

*Solution à examiner.* L'acétate de néryle à examiner.

*Teneur* : au minimum 93,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Nickel (chlorure de).** $NiCl_2$. ($M_r$ 129,6). *1057900.* [7718-54-9]. Chlorure de nickel anhydre.

Poudre cristalline, jaune, très soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent. Le chlorure de nickel sublime en l'absence d'air et absorbe facilement l'ammoniaque. La solution aqueuse est acide.

**Nickel (sulfate de).** $NiSO_4,7H_2O$. ($M_r$ 280,9). *1058000.* [10101-98-1]. Sulfate de nickel heptahydraté.

Poudre cristalline ou cristaux verts, facilement solubles dans l'eau, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Nickel-aluminium (alliage).** *1058100.*

Voir *Alliage nickel-aluminium R.*

**Nickel (nitrate de) hexahydraté.** $Ni(N0_3)_2,6H_2O$. ($M_r$ 290,8). *1175300.* [13478-00-7].

**Nicotinamide-adénine dinucléotide.** $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$ . ($M_r$ 663). *1108100.* [53-84-9]. $NAD^+$.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, très hygroscopique, facilement soluble dans l'eau.

**Solution de nicotinamide-adénine dinucléotide.** *1108101.*

Dissolvez 40 mg de *nicotinamide-adénine dinucléotide R* dans de l'*eau R* et complétez à 10 mL avec le même solvant. Préparez extemporanément.

**Nicotinique (acide).** *1158600.* [59-67-6].

Voir *Acide nicotinique (0459).*

**Ninhydrine.** $C_9H_4O_3,H_2O$. ($M_r$ 178,1). *1058300.* [485-47-2]. 1,2,3-Indanetrione monohydratée.

Poudre cristalline blanche ou jaune très pâle, soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Réactif à la ninhydrine et au chlorure stanneux.** *1058301.*

Dissolvez 0,2 g de *ninhydrine R* dans 4 mL d'*eau R* chaude, ajoutez 5 mL d'une solution de *chlorure stanneux R* à 1,6 g/L, laissez reposer pendant 30 min, puis filtrez et conservez à une température de 2 °C à 8 °C. Mélangez extemporanément 2,5 mL de cette solution avec 5 mL d'*eau R* et 45 mL de *2-propanol R*.

**Réactif à la ninhydrine et au chlorure stanneux R1.** *1058302.*

Dissolvez 4 g de *ninhydrine R* dans 100 mL d'*éther monométhylique d'éthylèneglycol R*. Agitez doucement avec 1 g de *résine échangeuse de cations R* (300-840 µm) et filtrez (solution A). Dissolvez 0,16 g de *chlorure stanneux R* dans 100 mL de *solution tampon pH 5,5 R* (solution B). Mélangez extemporanément des volumes égaux des 2 solutions.

**Solution de ninhydrine.** *1058303.*

Solution à 2 g/L de *ninhydrine R* dans un mélange de 5 volumes d'*acide acétique dilué R* et de 95 volumes de *butanol R*.

**Solution de ninhydrine R1.** *1058304.*

Dissolvez 1,0 g de *ninhydrine R* dans 50 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et ajoutez 10 mL d'*acide acétique glacial R*.

**Solution de ninhydrine R2.** *1058305.*

Dissolvez 3 g de *ninhydrine R* dans 100 mL d'une solution de *métabisulfite de sodium R* à 45,5 g/L.

**Solution de ninhydrine R3.** *1058306.*

Solution à 4 g/L dans un mélange de 5 volumes d'*acide acétique anhydre R* et de 95 volumes de *butanol R*.

**Nitrate ferrique.** $Fe(NO_3)_3,9H_2O$. ($M_r$ 404). *1106100.* [7782-61-8].

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent *m/m* de $Fe(NO_3)_3,9H_2O$.

Cristaux ou masse cristalline violet pâle, très solubles dans l'eau.

*Acide libre* : au maximum 0,3 pour cent (exprimé en $HNO_3$).

**Nitrazépam.** *1143900.* [146-22-5].

Voir *Nitrazépam (0415).*

**Nitrilotriacétique (acide).** $C_6H_9NO_6$. ($M_r$ 191,1). *1137400.* [139-13-9].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques.

F : environ 240 °C, avec décomposition.

**Nitrique (acide).** $HNO_3$. ($M_r$ 63,0). *1058400.* [7697-37-2].

*Teneur* : 63,0 pour cent *m/m* à 70,0 pour cent *m/m*.

Solution limpide, pratiquement incolore, miscible à l'eau.

$d_{20}^{20}$ : 1,384 à 1,416.

Une solution à 10 g/L, fortement acide, donne la réaction des nitrates (*2.3.1*).

*Aspect de la substance.* L'acide nitrique est limpide (*2.2.1*) et n'est pas plus fortement coloré que la solution témoin $J_6$ (*2.2.2, Procédé II*).

*Chlorures* (*2.4.4*) : au maximum 0,5 ppm.

A 5 g d'acide nitrique, ajoutez 10 mL d'*eau R* et 0,3 mL de *solution de nitrate d'argent R2.* Laissez reposer à l'abri de la lumière pendant 2 min. Si la solution présente une opalescence, celle-ci n'est pas plus prononcée que celle d'une solution témoin préparée simultanément dans les mêmes conditions, par mélange de 13 mL d'*eau R*, de 0,5 mL d'*acide nitrique R*, de 0,5 mL de *solution à 5 ppm de chlorure (Cl) R* et de 0,3 mL de solution de nitrate d'argent R2.

*Sulfates* (*2.4.13*) : au maximum 2 ppm.

A 10 g d'acide nitrique, ajoutez 0,2 g de *carbonate de sodium R*. Evaporez à siccité, puis dissolvez le résidu dans 15 mL d'*eau distillée R*. Préparez le témoin avec un mélange de 2 mL de *solution à 10 ppm de sulfate ($SO_4$) R* et de 13 mL d'*eau distillée R*.

*Arsenic* (*2.4.2, Procédé A*) : au maximum 0,02 ppm.

Chauffez prudemment 50 g d'acide nitrique avec 0,5 mL d'*acide sulfurique R*, jusqu'à l'apparition de vapeurs blanches. Au résidu, ajoutez 1 mL d'une solution de *chlorhydrate d'hydroxylamine R* à 100 g/L et complétez à 2 mL avec de l'*eau R*. Préparez le témoin avec 1,0 mL de *solution à 1 ppm d'arsenic (As) R*.

*Fer* (*2.4.9*) : au maximum 1 ppm.

Dissolvez le résidu obtenu au cours de l'essai des cendres sulfuriques dans 1 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et complétez à 50 mL avec de l'*eau R*. Prélevez 5 mL de solution et complétez à 10 mL avec de l'*eau R*.

*Métaux lourds* (*2.4.8*) : au maximum 2 ppm.

Prélevez 10 mL de la solution préparée pour l'essai du fer et complétez à 20 mL avec de l'*eau R*. 12 mL de cette solution satisfont à l'essai A des métaux lourds. Préparez la solution témoin avec la *solution à 2 ppm de plomb (Pb) R*.

*Cendres sulfuriques* : au maximum 0,001 pour cent.

Evaporez prudemment à siccité 100 g d'acide nitrique. Humectez le résidu avec quelques gouttes d'*acide sulfurique R* et calcinez au rouge sombre.

*Dosage.* A 1,50 g d'acide nitrique, ajoutez 50 mL d'*eau R* et titrez par l'*hydroxyde de sodium 1 M* en présence de 0,1 mL de *solution de rouge de méthyle R*.

1 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* correspond à 63,0 mg de $HNO_3$.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Acide nitrique dilué.** *1058402.*

*Teneur* : environ 125 g/L.

Prélevez 20 g d'*acide nitrique R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

**Acide nitrique dilué R1.** *1058407.*

Prélevez 40 g d'*acide nitrique R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

**Acide nitrique dilué R2.** *1058409.*

Prélevez 30 g d'*acide nitrique R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

**Acide nitrique exempt de cadmium et de plomb.** *1058401.*

Satisfait aux spécifications de l'*acide nitrique R* et aux essais suivants.

*Solution à examiner.* A 100 g d'acide nitrique exempt de cadmium et de plomb, ajoutez 0,1 g de *carbonate de sodium anhydre R* et évaporez à siccité. Dissolvez le résidu dans de l'*eau R* en chauffant légèrement et complétez à 50,0 mL avec le même solvant.

*Cadmium* : au maximum 0,1 ppm.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé II*).

*Source* : lampe à cathode creuse au cadmium.

*Longueur d'onde* : 228,8 nm.

*Dispositif d'atomisation* : flamme air-propane ou air-acétylène.

*Plomb* : au maximum 0,1 ppm.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé II*).

*Source* : lampe à cathode creuse au plomb.

*Longueur d'onde* : 283,3 nm ou 217,0 nm.

*Dispositif d'atomisation* : flamme air-acétylène.

**Acide nitrique exempt de métaux lourds.** *1058404.*

Satisfait aux spécifications de l'*acide nitrique R* et aux teneurs maximales en métaux lourds suivantes.

As : 0,005 ppm.

Cd : 0,005 ppm.

Cu : 0,001 ppm.

Fe : 0,02 ppm.

Hg : 0,002 ppm.

Ni : 0,005 ppm.

Pb : 0,001 ppm.

Zn : 0,01 ppm.

**Acide nitrique exempt de nickel.** *1058408.*

Satisfait aux spécifications de l'*acide nitrique R* et à la spécification supplémentaire suivante.

*Nickel* : au maximum 0,005 ppm.

**Acide nitrique exempt de plomb.** *1058403.*

Satisfait aux spécifications de l'*acide nitrique R* et à l'essai suivant.

*Plomb* : au maximum 0,1 ppm.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé II*).

*Solution à examiner.* A 100 g d'acide nitrique exempt de plomb, ajoutez 0,1 g de *carbonate de sodium anhydre R* et évaporez à siccité. Dissolvez le résidu dans de l'*eau R* en chauffant légèrement et complétez à 50,0 mL avec le même solvant.

*Source* : lampe à cathode creuse au plomb.

*Longueur d'onde* : 283,3 nm ou 217,0 nm.

*Dispositif d'atomisation* : flamme air-acétylène.

**Acide nitrique exempt de plomb R1.** *1058405.*

*Acide nitrique R* contenant au maximum 1 μg/kg de plomb.

**Acide nitrique exempt de plomb, dilué.** *1058406.*

Prélevez 5 g d'*acide nitrique exempt de plomb R1* et complétez à 100 mL avec de l'*eau distillée désionisée R*.

**Nitrique (acide) fumant.** *1058500.* [52583-42-3].

Liquide limpide, légèrement jaunâtre, fumant à l'air.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,5.

**Nitroaniline.** $C_6H_6N_2O_2$. ($M_r$ 138,1). *1058600.* [100-01-6]. 4-Nitroaniline.

Poudre cristalline jaune vif, très peu soluble dans l'eau, assez soluble dans l'eau bouillante, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent. La nitroaniline forme des sels solubles dans l'eau avec les acides minéraux forts.

F : environ 147 °C.

**Nitrobenzaldéhyde.** $C_7H_5NO_3$. ($M_r$ 151,1). *1058700.* [552-89-6]. 2-Nitrobenzaldéhyde.

Aiguilles jaunes, peu solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent, entraînables à la vapeur.

F : environ 42 °C.

**Papier au nitrobenzaldéhyde.** *1058701.*

Dissolvez 0,2 g de *nitrobenzaldéhyde R* dans 10 mL d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 200 g/L. Utilisez cette solution dans l'heure qui suit. Plongez la moitié inférieure d'une bande de papier à filtration lente de 10 cm de longueur sur 0,8-1 cm de largeur et essorez l'excès de réactif entre 2 feuilles de papier filtre. Le papier au nitrobenzaldéhyde est utilisé dans les quelques minutes qui suivent sa préparation.

**Solution de nitrobenzaldéhyde.** *1058702.*

A 10 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R*, ajoutez 0,12 g de *nitrobenzaldéhyde R* pulvérisé. Laissez reposer pendant 10 min en agitant fréquemment, puis filtrez. Préparez extemporanément.

**Nitrobenzène.** $C_6H_5NO_2$. ($M_r$ 123,1). *1058800.* [98-95-3].

Liquide incolore ou à peine jaunâtre, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

Eb : environ 211 °C.

*Dinitrobenzène.* A 0,1 mL de nitrobenzène, ajoutez 5 mL d'*acétone R*, 5 mL d'*eau R* et 5 mL de *solution concentrée hydroxyde de sodium R*. Agitez et laissez reposer. La phase supérieure est sensiblement incolore.

**4-Nitrobenzoïque (acide).** $C_7H_5NO_4$. ($M_r$ 167,1). *1144000.* [62-23-7].

Cristaux jaunes.

F : environ 240 °C.

**Nitrobenzoyle (chlorure de).** $C_7H_4ClNO_3$. ($M_r$ 185,6). *1058900.* [122-04-3]. Chlorure de 4-nitrobenzoyle.

Masse cristallisée ou cristaux jaunes se décomposant à l'air humide, complètement solubles dans une solution d'hydroxyde de sodium en donnant une solution jaune orangé.

F : environ 72 °C.

**Nitrobenzyle (chlorure de).** $C_7H_6ClNO_2$. ($M_r$ 171,6). *1059000.* [100-14-1]. Chlorure de 4-nitrobenzyle.

Cristaux jaune pâle, lacrymogènes, pratiquement insolubles dans l'eau, très solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**4-(4-Nitrobenzyl)pyridine.** $C_{12}H_{10}N_2O_2$. ($M_r$ 214,2). *1101900.* [1083-48-3].

Poudre jaune.

F : environ 70 °C.

**Nitrochromique (réactif).** *1059100.*

Dissolvez 0,7 g de *dichromate de potassium R* dans de l'*acide nitrique R* et complétez à 100 mL avec le même acide.

**Nitroéthane.** $C_2H_5NO_2$. ($M_r$ 75,1). *1059200.* [79-24-3].

Liquide huileux, limpide et incolore.

Eb : environ 114 °C.

**Nitrofurantoïne.** *1099700.* [67-20-9].

Voir *Nitrofurantoïne (0101)*.

**(5-Nitro-2-furyl)méthylène (diacétate de).** $C_9H_9NO_7$. ($M_r$ 243,2). *1099800.* [92-55-7]. Diacétate de nitrofurfural. Diacétate de 5-nitrofurfurylidène.

Cristaux jaunes.

F : environ 90 °C.

**Nitrométhane.** $CH_3NO_2$. ($M_r$ 61,0). *1059700.* [75-52-5].

Liquide huileux, limpide et incolore, peu soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : 1,132 à 1,134.

$n_D^{20}$ : 1,381 à 1,383.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : au minimum 95 pour cent distillent de 100 °C à 103 °C.

**Nitro-molybdovanadique (réactif).** *1060100.*

*Solution A.* Dissolvez 10 g de *molybdate d'ammonium R* dans de l'*eau R*, ajoutez 1 mL d'*ammoniaque R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

*Solution B.* Dissolvez 2,5 g de *vanadate d'ammonium R* dans de l'*eau R* chaude, ajoutez 14 mL d'*acide nitrique R* et complétez à 500 mL avec de l'*eau R*.

A 96 mL d'*acide nitrique R*, ajoutez 100 mL de solution A et 100 mL de solution B et complétez à 500 mL avec de l'*eau R*.

**4-Nitrophénol.** $C_6H_5NO_3$. ($M_r$ 139,1). *1146400.* [100-02-7]. *p*-Nitrophénol.

*Teneur* : au minimum 95 pour cent.

Poudre incolore ou faiblement jaune, assez soluble dans l'eau et le méthanol.

F : environ 114 °C.

***N*-Nitrosodiéthanolamine.** $C_4H_{10}N_2O_3$. ($M_r$ 134,1). *1129800.* [1116-54-7]. 2,2′-(Nitrosoimino)diéthanol.

Liquide jaune, miscible à l'éthanol anhydre.

$n_D^{20}$ : environ 1,485.

Eb : environ 125 °C.

***N*-Nitrosodiisopropanolamine.** $C_6H_{14}N_2O_3$. ($M_r$ 162,2). *1176500.* [53609-64-6]. 1,1′-(Nitrosoimino)bispropan-2-ol.

Eb : 122-124 °C.

**Nitrosodipropylamine.** $C_6H_{14}N_2O$. ($M_r$ 130.2). *1099900.* [621-64-7]. Dipropylnitrosamine.

Liquide soluble dans l'éthanol anhydre et dans les acides forts.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,915.

Eb : environ 78 °C.

Qualité appropriée pour la détermination par chimioluminescence.

**Solution de nitrosodipropylamine.** *1099901.*

Injectez 78,62 g d'*éthanol anhydre R* dans un flacon contenant 1 g de *nitrosodipropylamine R* à travers le septum. Diluez au 1/100 à l'aide d'*éthanol anhydre R* et aliquotez en flacons capsulés à raison de 0,5 mL par flacon.

*Conservation* : à 5 °C à l'obscurité.

**Noir amido 10B.** $C_{22}H_{14}N_6Na_2O_9S_2$. ($M_r$ 617). *1003100.* [1064-48-8].

Schultz No. 299.

Colour Index No. 20470.

5-Amino-4-hydroxy-6-[(4-nitrophényl)azo]-3-(phénylazo)naphtalène-2,7-disulfonate de disodium.

Poudre brun foncé ou noire, assez soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution de noir amido 10B.** *1003101.*

Solution à 5 g/L de *noir amido 10B R* dans un mélange de 10 volumes d'*acide acétique R* et de 90 volumes de *méthanol R*.

**Noir ériochrome.** *1056800.* [1787-61-7].

Voir *Mordant noir 11 R.*

**Nonivamide.** $C_{17}H_{27}NO_3$. ($M_r$ 293,4). *1148500.* [2444-46-4]. *N*-[(4-Hydroxy-3-méthoxyphényl)méthyl]nonanamide.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau froide, facilement soluble dans l'éthanol anhydre.

*La nonivamide utilisée dans l'essai de la nonivamide du Piment de Cayenne (1859) satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie liquide (*2.2.29*), selon les indications données dans la monographie *Piment de Cayenne (1859).*

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Nonylamine.** $C_9H_{21}N$. ($M_r$ 143,3). *1139800.* [112-20-9]. 1-Aminononane.

Liquide corrosif, incolore et limpide.

$d_4^{20}$ : environ 0,788.

$n_D^{20}$ : environ 1,433.

**Nordazépam.** $C_{15}H_{11}ClN_2O$. ($M_r$ 270,7). *1060200.* [1088-11-5]. 7-Chloro-2,3-dihydro-5-phényl-1*H*-1,4-benzodiazépin-2-one.

Poudre cristalline, blanche ou jaune pâle, pratiquement insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 216 °C.

**DL-Norleucine.** $C_6H_{13}NO_2$. ($M_r$ 131,2). *1060300.* [616-06-8]. Acide (*RS*)-2-aminohexanoïque.

Cristaux brillants, assez solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent, solubles dans les acides.

**Noscapine (chlorhydrate de).** *1060500.* [912-60-7].

Voir *Chlorhydrate de noscapine (0515).*

**Ochratoxine A (solution d').** *1175700.*

Solution d'acide (2*S*)-2-([[(3*R*)-5-chloro-8-hydroxy-3-méthyl-1-oxo-3,4-dihydro-1*H*-2-benzopyran-7-yl]carbonyl]amino)-3-phénylpropanoïque (ochratoxine A) à 50 µg/mL dans un mélange de 1 volume d'*acide acétique R* et 99 volumes de *benzène R.*

**Octadécyle [3-[3,5-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-hydroxyphényl]propanoate d'].** $C_{35}H_{62}O_3$. ($M_r$ 530,9). *1060600.* [2082-79-3]. 3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphényl)propionate d'octadécyle.

Poudre cristalline blanche ou légèrement jaunâtre, pratiquement insoluble dans l'eau, très soluble dans l'acétone et dans l'hexane, peu soluble dans le méthanol.

F : 49 °C à 55 °C.

**Octanal.** $C_8H_{16}O$. ($M_r$ 128,2). *1150400.* [124-13-0]. Aldéhyde octylique.

Liquide huileux incolore, practiquement insoluble dans l'eau.

*L'octanal utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle d'orange douce (1811).*

*Teneur* : au minimum 99 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Octane.** $C_8H_{18}$. ($M_r$ 114,2). *1166500.* [111-65-9]. *n*-Octane.

**Octanol.** $C_8H_{18}O$. ($M_r$ 130,2). *1060700.* [111-87-5]. 1-Octanol. Alcool caprylique.

Liquide incolore, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,828.

Eb : environ 195 °C.

**3-Octanone.** $C_8H_{16}O$. ($M_r$ 128,2). *1114600.* [106-68-3]. Ethyl pentyl cétone.

Liquide incolore à odeur caractéristique.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,822.

$n_D^{20}$ : environ 1,415.

Eb : environ 167 °C.

*La 3-octanone utilisée en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de lavande (1338).*

*Solution à examiner.* La 3-octanone à examiner.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Octoxinol 10.** $C_{34}H_{62}O_{11}$ (composition moyenne). ($M_r$ 647). *1060800.* [9002-93-1]. α-[4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phényl]-ω-hydroxypoly(oxyéthylène).

Liquide limpide, jaune pâle, visqueux, miscible à l'eau, à l'acétone et à l'éthanol à 96 pour cent, soluble dans le toluène.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Octylamine.** $C_8H_{19}N$. ($M_r$ 129,2). *1150500.* [111-86-4]. Octan-1-amine.

Liquide incolore.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,782.

Eb : 175 °C à 179 °C.

**Oléamide.** $C_{18}H_{35}NO$. ($M_r$ 281,5). *1060900.* (*Z*)-Octadéc-9-énoamide.

Poudre ou granulés blancs ou jaunâtres, pratiquement insolubles dans l'eau, très solubles dans le chlorure de méthylène, solubles dans l'éthanol anhydre.

F : environ 80 °C.

**Oléique (acide).** $C_{18}H_{34}O_2$. ($M_r$ 282,5). *1144100.* [112-80-1]. Acide (9*Z*)-octadéc-9-énoïque.

Liquide limpide, incolore, pratiquement insoluble dans l'eau.

$d_4^{20}$ : environ 0,891.

$n_D^{20}$ : environ 1,459.

F : 13 °C à 14 °C.

*L'acide oléique utilisé dans le dosage des acides gras totaux du Fruit de sabal (1848) satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*), selon les indications données dans la monographie *Fruit de sabal (1848).*

*Teneur* : au minimum 98 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Oléique (alcool).** $C_{18}H_{36}O$. ($M_r$ 268,5). *1156000.* [143-28-2]. (9*Z*)-octadéc-9-én-1-ol.

Eb : environ 207 °C.

$n_D^{20}$ : 1,460.

*Teneur* : au minimum 85 pour cent.

**Oleuropéine.** $C_{25}H_{32}O_{13}$. ($M_r$ 540,5). *1152900.* [32619-42-4]. [(2*S*,3*E*,4*S*)-3-Ethylidène-2-(b-d-glucopyranosyloxy)-5-(méthoxycarbonyl)-3,4-dihydro-2*H*-pyran-4-yl]acétate de 2-(3,4-dihydroxyphényl)éthyle.

Poudre soluble dans le méthanol.

*L'oleuropéine utilisée dans le dosage de la Feuille d'olivier (1878) satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications données dans la monographie *Feuille d'olivier (1878).*

*Teneur* : au minimum 80 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Olive (huile d').** *1061000.* [8001-25-0].

Voir *Huile d'olive vierge (0518).*

**Ombelliférone.** $C_9H_6O_3$. ($M_r$ 162,1). *1137500.* [93-35-6]. 7-Hydroxycoumarine. 7-Hydroxy-2*H*-1-benzopyran-2-one.

Aiguilles obtenues par cristallisation à partir d'eau.

F : 225 °C à 228 °C.

**Orangé de méthyle.** *1054800.* [547-58-0].

Voir *Méthylorange R.*

**Orange Soudan.** $C_{16}H_{12}N_2O$. ($M_r$ 248,3). *1110700.* [842-07-9].

Colour Index No. 12055.
1-(Phénylazo)naphtalén-2-ol. Soudan I.

Poudre rouge orangé, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans le chlorure de méthylène.

F : environ 131 °C.

**Orcinol.** $C_7H_8O_2,H_2O$. ($M_r$ 142,2). *1108700.* [6153-39-5]. 5-Méthylbenzène-1,3-diol monohydraté.

Poudre cristalline, sensible à la lumière.

Eb : environ 290 °C.

F : 58 °C à 61 °C.

**Organosilice amorphe (polymère d') octadécylsilylé.** *1144200.*

Particules de synthèse sphériques, hybrides, contenant à la fois des composants inorganiques (silice) et organiques (organosiloxanes), chimiquement modifiées par greffage trifonctionnel en surface de groupes octadécylsilylés.

**Organosilice amorphe (polymère d') octadécylsilylé à groupement polaire intercalé, postgreffé.** *1150600.*

Particules de synthèse hybrides, contenant à la fois des composants inorganiques (silice) et organiques (organosiloxanes), chimiquement modifiées par greffage en surface de groupes octadécylsilylés à groupement polaire intercalé. Afin de réduire autant que possible toute interaction avec des composés basiques, il est soigneusement postgreffé en couvrant la plupart des groupes silanol restants. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**Organosilice amorphe (polymère d') octadécylsilylé, postgreffé.** *1178600.*

Particules de synthèse sphériques, hybrides, contenant à la fois des composants inorganiques (silice) et organiques (organosiloxanes), chimiquement modifiées par greffage trifonctionnel en surface de groupes octadécylsilylés. Afin de réduire autant que possible toute interaction avec des composés basiques, il est soigneusement postgreffé en couvrant la plupart des groupes silanol restants. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**Organosilice amorphe (polymère d') octadécylsilylé, postgreffé, pour spectrométrie de masse.** *1164900.*

Particules de synthèse hybrides, contenant à la fois des composants inorganiques (silice) et organiques (organosiloxanes). Afin de réduire autant que possible toute interaction avec des composés basiques, il est soigneusement postgreffé en couvrant la plupart des groupes silanol restants. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**Organosilice amorphe (polymère d') propyl-2-phénylsilylé à groupement polaire intercalé, postgreffé.** *1178100.*

Particules de synthèse hybrides, contenant à la fois des composants inorganiques (silice) et organiques (organosiloxanes), chimiquement modifiées par greffage en surface de groupes propyl-2-phénysilylés à groupement polaire intercalé. Afin de réduire autant que possible toute interaction avec des composés basiques, il est soigneusement postgreffé en couvrant la plupart des groupes silanol restants. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**Osmium (tétraoxyde d').** $OsO_4$. ($M_r$ 254,2). *1061200.* [20816-12-0].

Masses cristallines jaunes ou aiguilles jaune clair, hygroscopiques, sensibles à la lumière, solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Solution de tétraoxyde d'osmium.** *1061201.*

Solution à 2,5 g/L dans l'*acide sulfurique 0,05 M.*

**Oxalique (acide).** $C_2H_2O_4,2H_2O$. ($M_r$ 126,1). *1061400.* [6153-56-6]. Acide éthanedioïque dihydraté.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution sulfurique d'acide oxalique.** *1061401.*

Solution à 50 g/L d'*acide oxalique R* dans un mélange refroidi à volumes égaux d'*acide sulfurique R* et d'*eau R.*

**Oxazépam.** *1144300.* [604-75-1].

Voir *Oxazépam (0778).*

**2,2′-Oxybis(*N*,*N*-diméthyléthylamine).** $C_8H_{20}N_2O$. ($M_r$ 160,3). *1141200.* [3033-62-3]. bis(2-Diméthylaminoéthyl) éther.

Liquide incolore, corrosif.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,85.

$n_D^{20}$ : environ 1,430.

**Oxygène.** $O_2$. ($M_r$ 32,00). *1108800.*

*Teneur* : au minimum 99,99 pour cent *V/V.*

*Azote et argon* : moins de 100 ppm.

*Dioxyde de carbone* : moins de 10 ppm.

*Monoxyde de carbone* : moins de 5 ppm.

**Oxygène R1.** $O_2$. ($M_r$ 32,00). *1137600.*

*Teneur* : au minimum 99 pour cent *V/V.*

**Oxytétracycline (chlorhydrate de).** *1146500.*

Voir *Chlorhydrate d'oxytétracycline (0198).*

**Palladium.** Pd. ($A_r$ 106,4). *1114700.* [7440-05-3].

Métal gris-blanc, soluble dans l'acide chlorhydrique.

**Palladium (chlorure de).** $PdCl_2$. ($M_r$ 177,3). *1061500.* [7647-10-1].

Cristaux rouges.

F : 678 °C à 680 °C.

**Solution de chlorure de palladium.** *1061501.*

Dissolvez 1 g de *chlorure de palladium R* dans 10 mL d'*acide chlorhydrique R* chaud. Diluez la solution à 250 mL avec un mélange à volumes égaux d'*acide chlorhydrique dilué R* et d'*eau R*. Diluez cette solution avec 2 volumes d'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Palmitique (acide).** $C_{16}H_{32}O_2$. ($M_r$ 256,4). *1061600.* [57-10-3]. Acide hexadécanoïque.

Ecailles blanches ou sensiblement blanches, cristallines, pratiquement insolubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent chaud.

F : environ 63 °C.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans l'identification de la monographie *Palmitate de chloramphénicol (0473)* ; le chromatogramme obtenu avec la solution d'acide palmitique présente une seule tache principale.

*L'acide palmitique utilisé dans le dosage des acides gras totaux du Fruit de sabal (1848) satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Fruit de sabal (1848).*

*Teneur* : au minimum 98 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Palmitique (alcool).** $C_{16}H_{34}O$. ($M_r$ 242,4). *1156100.* [36653-82-4]. Alcool cétylique. 1-Hexadécanol.

F : environ 48 °C.

*Teneur* : au minimum 96 pour cent.

**Palmitoléique (acide).** $C_{16}H_{30}O_2$. ($M_r$ 254,4). *1144400.* [373-49-9]. Acide (9*Z*)-hexadéc-9-énoïque.

Liquide limpide, incolore.

Eb : environ 162 °C.

*L'acide palmitoléique utilisé dans le dosage des acides gras totaux du Fruit de sabal (1848) satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Fruit de sabal (1848).*

*Teneur* : au maximum 98 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Pancréas (poudre de).** *1061700.*

Voir *Poudre de pancréas (0350).*

**Papaïne.** *1150700.* [9001-73-4].

Enzyme protéolytique obtenue à partir du fruit vert et des feuilles de *Carica papaya* L.

**Papavérine (chlorhydrate de).** *1061800.* [61-25-6].

Voir *Chlorhydrate de papavérine (0102).*

**Papier à l'acétate de plomb.** *1048102.*

Voir *Plomb (acétate de) R.*

**Papier amidonné à l'iodate de potassium.** *1085101.*

Voir *Amidon soluble R.*

**Papier au bromure mercurique.** *1052101.*

Voir *Mercurique (bromure) R.*

**Papier à l'iodomercurate de vert de méthyle.** *1054201.*

Voir *Vert de méthyle R.*

**Papier au jaune titane.** *1090901.*

Voir *Jaune titane R.*

**Papier au nitrobenzaldéhyde.** *1058701.*

Voir *Nitrobenzaldéhyde R.*

**Papier manganèse-argent.** *1078200.*

Plongez des bandelettes de papier à filtration lente dans une solution de *sulfate de manganèse R* à 8,5 g/L et de *nitrate d'argent R* à 8,5 g/L pendant quelques minutes. Faites sécher sur du *pentoxyde de diphosphore R* à l'abri des vapeurs acides et alcalines.

**Papier pour chromatographie.** *1150900.*

Papier fin de qualité pure cellulose, à surface lisse et d'une épaisseur d'environ 0,2 mm.

*Séparation chromatographique.* Déposez 2-5 µL des *solutions d'essai de performance de papier pour chromatographie R* (solution à examiner (a) et solution à examiner (b) séparément) sur 2 bandes de *papier pour chromatographie R*. Développez sur les 3/4 de la hauteur du papier, en utilisant un mélange à volumes égaux de *méthanol R* et d'*eau R*. Laissez sécher et déterminez la répartition de la radioactivité à l'aide d'un détecteur approprié. Le papier n'est satisfaisant que si le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a) présente une tache unique de radioactivité présentant un $R_F$ de 0,8-1,0 et si le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b) présente une tache unique de radioactivité au point de dépôt ($R_F$ de 0,0-0,1).

**Papier tournesol bleu.** *1049301.*

Voir *Tournesol R.*

**Papier tournesol rouge.** *1049302.*

Voir *Tournesol R.*

**Paracétamol.** *1061900.* [103-90-2].

Voir *Paracétamol (0049).*

**Paracétamol exempt de 4-aminophénol.** *1061901.*

Faites cristalliser le *paracétamol R* dans de l'*eau R* et desséchez sous vide à 70 °C ; répétez ces opérations jusqu'à ce que la substance satisfasse à l'essai suivant : dissolvez 5 g de la substance desséchée dans un mélange à volumes égaux de *méthanol R* et d'*eau R*, puis complétez à 100 mL avec le même mélange de solvants ; ajoutez 1 mL d'une solution récemment préparée contenant 10 g/L de *nitroprussiate de sodium R* et 10 g/L de *carbonate de sodium anhydre R* ; mélangez et laissez reposer pendant 30 min à l'abri de la lumière. Il ne se développe aucune coloration bleue ou verte.

**Paraffine liquide.** *1062000.* [8042-47-5].

Voir *Paraffine liquide (0239).*

**Paraldéhyde.** *1151000.* [123-63-7].

Voir *Paraldéhyde (0351).*

**Pararosaniline (chlorhydrate de).** $C_{19}H_{18}ClN_3$. ($M_r$ 323,8). *1062200.* [569-61-9].

Schultz No. 779.

Colour Index No. 42500.

4. Réactifs

Chlorure de 4-[bis(4-aminophényl)méthylène]cyclohexa-2,5-dièniminium.

Poudre cristalline rouge-bleu, peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol anhydre. Les solutions dans l'eau et dans l'éthanol anhydre sont colorées en rouge foncé. Les solutions dans l'acide chlorhydrique et dans l'acide sulfurique sont colorées en jaune.

F : environ 270 °C, avec décomposition.

**Solution de pararosaniline décolorée.** *1062201.*

Dans un flacon à bouchon rodé, ajoutez à 0,1 g de *chlorhydrate de pararosaniline R*, 60 mL d'*eau R* et une solution de 1,0 g de *sulfite de sodium anhydre R* ou de 2,0 g de *sulfite de sodium R* ou de 0,75 g de *métabisulfite de sodium R* dans 10 mL d'*eau R*. En agitant, ajoutez lentement 6 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* ; bouchez le flacon et continuez à agiter jusqu'à dissolution complète. Complétez à 100 mL avec de l'*eau R* et laissez reposer pendant 12 h avant l'emploi.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Parthénolide.** $C_{15}H_{20}O_3$. ($M_r$ 248,3). *1129900.* [20554-84-1]. (4*E*)-(1a*R*,7a*S*,10a*S*,10b*S*)-1a,5-Diméthyl-8-méthylène-2,3,6,7,7a,8,10a,10b-octahydrooxiréno[9,10]cyclodéca[1,2-*b*]furan-9(1a*H*)-one. (*E*)-(5*S*,6*S*)-4,5-Époxygermacra-1(10),11(13)-diéno-12(6)-lactone.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, très peu soluble dans l'eau, très soluble dans le chlorure de méthylène, soluble dans le méthanol.

$[\alpha]_D^{22}$ : – 71,4, déterminé avec une solution à 2,2 g/L dans le *chlorure de méthylène R*.

F : 115 °C à 116 °C.

*Absorbance* (*2.2.25*). Une solution à 0,01 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R* présente un maximum d'absorption à 214 nm.

*Dosage*. Chromatographie liquide (*2.2.29*), selon les indications données dans la monographie *Grande camomille (1516)* à la concentration de la solution témoin.

*Teneur* : au minimum 90 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Pénicillinase (solution de).** *1062300.*

Dissolvez 10 g d'hydrolysat de caséine, 2,72 g de *phosphate monopotassique R* et 5,88 g de *citrate de sodium R* dans 200 mL d'*eau R*, ajustez à pH 7,2 avec une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 200 g/L et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*. Dissolvez 0,41 g de *sulfate de magnésium R* dans 5 mL d'*eau R* et ajoutez 1 mL d'une solution de *sulfate ferreux et d'ammonium R* à 1,6 g/L, puis complétez à 10 mL avec de l'*eau R*. Stérilisez les 2 solutions à l'autoclave, refroidissez, mélangez, répartissez par couches peu profondes dans des fioles coniques et inoculez *Bacillus cereus* (NCTC 9946). Laissez reposer les fioles à 18-37 °C jusqu'aux premiers signes de croissance et maintenez à 35-37 °C pendant 16 h, en agitant continuellement pour assurer l'aération. Centrifugez et stérilisez le surnageant par filtration sur membrane.
1,0 mL de solution de pénicillinase contient au minimum 0,4 microkatal (correspondant à une hydrolyse d'au moins 500 mg de benzylpénicilline en acide benzylpénicilloïque par heure) à 30 °C et à pH 7 à condition que la concentration en benzylpénicilline ne tombe pas au-dessous du niveau nécessaire pour la saturation enzymatique. La constante de Michaelis, pour la benzylpénicilline, de la pénicillinase dans la solution de pénicillinase est égale à environ 12 µg/mL.

*Stérilité (2.6.1).* La solution satisfait à l'essai de stérilité.

*Conservation* : à une température de 0 °C à 2 °C, pendant 2 à 3 jours. A l'état cryodesséché, la substance peut être conservée pendant plusieurs mois dans des ampoules scellées.

**Pentaérythrityle [tétrakis[3-[3,5-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-hydroxyphényl]propanoate] de].** $C_{73}H_{108}O_{12}$. ($M_r$ 1 178). *1062400.* [6683-19-8]. Tétrakis[3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphényl)]propionate de pentaérythrityle. Tétrakis[3-[3,5-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-hydroxyphényl]]propionate de 2,2′-bis(hydroxyméthyl)propane-1,3-diol.

Poudre cristalline blanche ou légèrement jaunâtre, pratiquement insoluble dans l'eau, très soluble dans l'acétone, soluble dans le méthanol, peu soluble dans l'hexane.

F : 110 °C à 125 °C.

Forme α : 120 °C à 125 °C.

Forme β : 110 °C à 115 °C.

**Pentafluoropropanoïque (acide).** $C_3HF_5O_2$. ($M_r$ 164,0). *1151100.* [422-64-0].

Liquide limpide et incolore.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,561.

$n_D^{20}$ : environ 1,284.

Eb : environ 97 °C.

**Pentafluoropropionique (anhydride).** $C_6F_{10}O_3$. ($M_r$ 310,0). *1177300.* [356-42-3]. Anhydride pentafluoropropanoïque.

**Pentane.** $C_5H_{12}$. ($M_r$ 72,2). *1062500.* [109-66-0].

Liquide limpide et incolore, inflammable, très peu soluble dans l'eau, miscible à l'acétone et à l'éthanol anhydre.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,63.

$n_D^{20}$ : environ 1,359.

Eb : environ 36 °C.

*Le pentane utilisé en spectrophotométrie satisfait également à l'essai suivant.*

*Transmittance minimale* (*2.2.25*) déterminée en utilisant l'*eau R* comme liquide de compensation : 20 pour cent à 200 nm, 50 pour cent à 210 nm, 85 pour cent à 220 nm, 93 pour cent à 230 nm, 98 pour cent à 240 nm.

**1,2-Pentanediol.** $C_5H_{12}O_2$. ($M_r$ 104,2). *1155800.* [5343-92-0]. (2*RS*)-Pentane-1,2-diol.

$d_4^{20}$ : environ 0,971.

$n_D^{20}$ : environ 1,439.

Eb : environ 201 °C.

**Pentanol.** $C_5H_{12}O$. ($M_r$ 88,1). *1062600.* [71-41-0]. 1-Pentanol.

Liquide incolore, assez soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$n_D^{20}$ : environ 1,410.

Eb : environ 137 °C.

**3-Pentanone.** $C_5H_{10}O$. ($M_r$ 86,13). *1173600.* [96-22-0]. Diéthylcétone.

**Pentoxyde de diphosphore.** $P_2O_5$. ($M_r$ 141,9). *1032900.* [1314-56-3]. Pentoxyde de phosphore. Anhydride phosphorique.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, amorphe, déliquescente. Le pentoxyde de diphosphore s'hydrate dans l'eau avec production de chaleur.

*Conservation* : en récipient étanche.

***tert*-Pentylique (alcool).** $C_5H_{12}O$. ($M_r$ 88,1). *1062700.* [75-85-4]. Alcool amylique tertiaire. 2-Méthyl-2-butanol.

Liquide volatil, inflammable, facilement soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent et au glycérol.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,81.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : au minimum 95 pour cent distillent de 100 °C à 104 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Pepsine (poudre de).** *1062800.* [9001-75-6].

Voir *Poudre de pepsine (0682).*

**Perchlorique (acide).** $HClO_4$. ($M_r$ 100,5). *1062900.* [7601-90-3].

*Teneur* : 70,0 pour cent *m/m* à 73,0 pour cent *m/m*.

Liquide limpide et incolore, miscible à l'eau.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,7.

*Dosage.* A 2,50 g d'acide perchlorique, ajoutez 50 mL d'*eau R* et titrez par l'*hydroxyde de sodium 1 M* en présence de 0,1 mL de *solution de rouge de méthyle R*.

1 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* correspond à 100,5 mg de $HClO_4$.

**Solution d'acide perchlorique.** *1062901.*

Prélevez 8,5 mL d'*acide perchlorique R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

**Periodique (acide).** $H_5IO_6$. ($M_r$ 227,9). *1108900.* [10450-60-9].

Cristaux facilement solubles dans l'eau et solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 122 °C.

**Periodique (solution acétique d'acide).** *1063000.*

Dissolvez 0,446 g de *periodate de sodium R* dans 2,5 mL d'une solution d'*acide sulfurique R* à 25 pour cent *V/V*, puis complétez à 100,0 mL avec de l'*acide acétique glacial R*.

**Perméthrine.** $C_{21}H_{20}Cl_2O_3$. ($M_r$ 391,3). *1130000.* [52645-53-1].

F : 34 °C à 35 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Pérylène.** $C_{20}H_{12}$ . ($M_r$ 252,3). *1130100.* [198-55-0]. Dibenz(de,kl)anthracène.

Poudre orange.

F : environ 279 °C.

**α-Phellandrène.** $C_{10}H_{16}$. ($M_r$ 136,2). *1130400.* [4221-98-1]. (*R*)-5-Isopropyl-2-methyl-cyclohexa-1,3-diène. (−)-p-Mentha-1,5-diène.

$n_D^{20}$ : environ 1,471.

Eb : 171 °C à 174 °C.

*L'α-phellandrène utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle d'eucalyptus (0390).*

*Solution à examiner.* L'α-phellandrène à examiner.

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Phénanthrène.** $C_{14}H_{10}$. ($M_r$ 178,2). *1063200.* [85-01-8].

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, pratiquement insolubles dans l'eau, assez solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 100 °C.

**Phénanthroline (chlorhydrate de).** $C_{12}H_9ClN_2,H_2O$. ($M_r$ 234,7). *1063300.* [3829-86-5]. Chlorhydrate de 1,10-phénanthroline monohydraté.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, facilement soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 215 °C, avec décomposition.

**Phénazone.** *1063400.* [60-80-0].

Voir *Phénazone (0421).*

**Phénol.** *1063500.* [108-95-2].

Voir *Phénol (0631).*

**Phénolphtaléine.** $C_{20}H_{14}O_4$. ($M_r$ 318,3). *1063700.* [77-09-8]. 3-3-Bis(4-hydroxyphényl)-3*H*-isobenzofuran-1-one.

Poudre blanche ou blanc-jaune, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Papier à la phénolphtaléine.** *1063704.*

Plongez des bandelettes de papier filtre dans la *solution de phénolphtaléine R*. Maintenez-les immergées pendant quelques minutes, puis laissez sécher.

**Solution de phénolphtaléine.** *1063702.*

Dissolvez 0,1 g de *phénolphtaléine R* dans 80 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

*Essai de sensibilité.* A 0,1 mL de solution de phénolphtaléine, ajoutez 100 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R*. La solution est incolore. Le virage au rose de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,2 mL d'*hydroxyde de sodium 0,02 M*.

*Zone de virage* : pH 8,2 (incolore) à pH 10,0 (rouge).

**Solution de phénolphtaléine R1.** *1063703.*

Solution à 10 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*.

**Phénoxyacétique (acide).** $C_8H_8O_3$. ($M_r$ 152,1). *1063800.* [122-59-8]. Acide 2-phénoxyéthanoïque.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, assez solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent et dans l'acide acétique glacial.

F : environ 98 °C.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Phénoxyméthylpénicilline (0148)* ; le chromatogramme présente une seule tache principale.

**2-Phénoxyaniline.** $C_{12}H_{11}NO$. ($M_r$ 185,2). *1165500.* [2688-84-8]. 2-Phénoxybenzénamine. Oxyde de 2-aminophényle et de phényle.

**Phénoxybenzamine (chlorhydrate de).** $C_{18}H_{23}Cl_2NO$. ($M_r$ 340,3). *1063900.* Chlorhydrate de *N*-(2-chloroéthyl)-*N*-(1-méthyl-2-phénoxyéthyl)benzylamine.

*Teneur* : 97,0 pour cent à 103,0 pour cent (substance desséchée).

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, assez soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 138 °C.

*Perte à la dessiccation* (*2.2.32*) : au maximum 0,5 pour cent, déterminée en présence de *pentoxyde de diphosphore R*, sous une pression ne dépassant pas 670 Pa, pendant 24 h.

*Dosage.* Dissolvez 0,500 g de chlorhydrate de phénoxybenzamine dans 50,0 mL de *chloroforme exempt d'éthanol R*. Agitez avec 3 fois 20 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M*. Rejetez les solutions acides, filtrez sur coton la phase chloroformique. Prélevez 5,0 mL du filtrat et complétez à 500,0 mL avec du *chloroforme exempt d'éthanol R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution au maximum à 272 nm dans une cuve fermée. Calculez la teneur en $C_{18}H_{23}Cl_2NO$ en prenant 56,3 comme valeur de l'absorbance spécifique.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Phénoxyéthanol.** $C_8H_{10}O_2$. ($M_r$ 138,2). *1064000.* [122-99-6]. 2-Phénoxyéthanol.

Liquide limpide, incolore et huileux, peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,11.

$n_D^{20}$ : environ 1,537.

*Point de solidification (2.2.18)* : au minimum 12 °C.

**Phénylacétique (acide).** $C_8H_8O_2$. ($M_r$ 136,2). *1160000.* [103-82-2].

Poudre blanche ou sensiblement blanche, soluble dans l'eau.

Eb : environ 265 °C.

F : environ 75 °C.

**Phénylalanine.** *1064100.* [63-91-2].

Voir *Phénylalanine (0782).*

**Phényle (isothiocyanate de).** $C_7H_5NS$. ($M_r$ 135,2). *1121500.* [103-72-0].

Liquide insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,13.

$n_D^{20}$ : environ 1,65.

Eb : environ 221 °C.

F : environ – 21 °C.

Utilisez une qualité appropriée pour le séquençage des protéines.

***p*-Phénylènediamine (dichlorhydrate de).** $C_6H_{10}Cl_2N_2$. ($M_r$ 181,1). *1064200.* [615-28-1]. Dichlorhydrate de 1,4-diaminobenzène.

Poudre cristalline ou cristaux blancs ou légèrement colorés, se colorant en rougeâtre au contact de l'air, facilement solubles dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**α-Phénylglycine.** $C_8H_9NO_2$. ($M_r$ 151,2). *1064300.* [2835-06-5]. Acide (*RS*)-2-amino-2-phénylacétique.

**D-Phénylglycine.** $C_8H_9NO_2$. ($M_r$ 151,2). *1144500.* [875-74-1]. Acide (2*R*)-2-amino-2-phénylacétique.

*Teneur* : au minimum 99 pour cent.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche.

**Phénylhydrazine (chlorhydrate de).** $C_6H_9ClN_2$. ($M_r$ 144,6). *1064500.* [59-88-1].

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, brunissant à l'air, soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 245 °C, avec décomposition.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Solution de chlorhydrate de phénylhydrazine.** *1064501.*

Dissolvez 0,9 g de *chlorhydrate de phénylhydrazine R* dans 50 mL d'*eau R*. Décolorez la solution avec du *charbon activé R* et filtrez. Au filtrat, ajoutez 30 mL d'*acide chlorhydrique R* et complétez à 250 mL avec de l'*eau R*.

**Solution sulfurique de phénylhydrazine.** *1064502.*

Dissolvez 65 mg de *chlorhydrate de phénylhydrazine R*, cristallisé au préalable dans l'*éthanol à 85 pour cent V/V R*, dans un mélange de 170 volumes d'*acide sulfurique R* et de 80 volumes d'*eau R*. Complétez à 100 mL avec le même mélange de solvants. Préparez extemporanément.

**1-Phénylpipérazine.** $C_{10}H_{14}N_2$. ($M_r$ 162,2). *1130500.* [92-54-6].

Liquide jaune légèrement visqueux, non miscible à l'eau.

$d_4^{20}$ : environ 1,07.

$n_D^{20}$ : environ 1,588.

**Phloroglucide.** $C_{12}H_{10}O_5$. ($M_r$ 234,2). *1177400.* [491-45-2]. 2,3′,4,5′,6-Biphénylpentol.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique, sensible à la lumière. Se décolore lentement lorsqu'elle est exposée à la lumière.

**Phloroglucine.** $C_6H_6O_3,2H_2O$. ($M_r$ 162,1). *1064600.* [6099-90-7]. Benzène-1,3,5-triol.

Cristaux blancs ou jaunâtres, peu solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : 223 °C environ (fusion instantanée).

**Solution de phloroglucine.** *1064601.*

A 1 mL d'une solution de *phloroglucine R* à 100 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*, ajoutez 9 mL d'*acide chlorhydrique R*.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Phosalone.** $C_{12}H_{15}ClNO_4PS_2$. ($M_r$ 367,8). *1130200.* [2310-17-0].

F : 45 °C à 48 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/μL dans l'isooctane) peut être utilisée.

**Phosphate diammonique.** *1006100.* [7783-28-0].

Voir *Ammonium (phosphate d') R.*

**Phosphate dipotassique.** $K_2HPO_4$. ($M_r$ 174,2). *1033000.* [7758-11-4]. Hydrogénophosphate de dipotassium.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique, très soluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Phosphate dipotassique trihydraté.** $K_2HPO_4,3H_2O$. ($M_r$ 228,2). *1157600.* [16788-57-1].

Poudre ou cristaux blancs ou sensiblement blancs ou incolores, facilement solubles dans l'eau.

**Phosphate disodique.** *1033300.* [10039-32-4].

Voir *Phosphate disodique dodécahydraté (0118).*

**Solution de phosphate disodique.** *1033301.*

Solution à 90 g/L.

**Phosphate disodique anhydre.** $Na_2HPO_4$. ($M_r$ 142,0). *1033400.* [7558-79-4].

**Phosphate disodique dihydraté.** *1033500.* [10028-24-7].

Voir *Phosphate disodique dihydraté (0602).*

**Phosphate monopotassique.** *1069600.* [7778-77-0].

Voir *Phosphate monopotassique (0920).*

**Solution de phosphate monopotassique 0,2 M.** *1069601.*

Contient une quantité de *phosphate monopotassique R* correspondant à 27,22 g de $KH_2PO_4$ dans 1000,0 mL.

**Phosphate monosodique.** *1080100.* [13472-35-0].

Voir *Phosphate monosodique dihydraté (0194).*

**Phosphate monosodique anhydre.** $NaH_2PO_4$. ($M_r$ 120,0). *1080200.* [7558-80-7].

Poudre blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Phosphate monosodique monohydraté.** $NaH_2PO_4,H_2O$. ($M_r$ 138,0). *1080300.* [10049-21-5].

Cristaux légèrement déliquescents ou granulés, blancs ou sensiblement blancs, facilement solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Phosphate tripotassique trihydraté.** $K_3PO_4,3H_2O$. ($M_r$ 266,3). *1155300.* [22763-03-7].

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, facilement soluble dans l'eau.

**Phosphate trisodique dodécahydraté.** $Na_3PO_4,12H_2O$. ($M_r$ 380,1). *1094300.* [10101-89-0].

Cristaux blancs ou sensiblement blancs ou incolores, facilement solubles dans l'eau.

**Phosphite de tris[2,4-di(1,1-diméthyléthyl)phényle].** $C_{42}H_{63}O_3P$. ($M_r$ 647). *1094100.* [31570-04-4].

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

F : 182 °C à 186 °C.

**Phosphomolybdique (acide).** $12MoO_3,H_3PO_4,xH_2O$. *1064900.* [51429-74-4].

Cristaux fins jaune orangé, facilement solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution d'acide phosphomolybdique.** *1064901.*

Dissolvez 4 g d'*acide phosphomolybdique R* dans de l'*eau R* et complétez à 40 mL avec le même solvant, puis ajoutez prudemment et en refroidissant 60 mL d'*acide sulfurique R*. Préparez extemporanément.

**Phosphomolybdotungstique (réactif).** *1065000.*

Dissolvez 100 g de *tungstate de sodium R* et 25 g de *molybdate de sodium R* dans 700 mL d'*eau R*. Ajoutez 100 mL d'*acide chlorhydrique R* et 50 mL d'*acide phosphorique R*. Dans un

appareillage en verre, chauffez à reflux pendant 10 h. Ajoutez 150 g de *sulfate de lithium R*, 50 mL d'*eau R* et quelques gouttes de *brome R*. Faites bouillir jusqu'à élimination de l'excès de brome (15 min), laissez refroidir, complétez à 1000 mL avec de l'*eau R* et filtrez. Le réactif est jaune. Si le réactif prend une coloration verdâtre, il n'est pas indiqué de l'utiliser, mais il peut être régénéré par ébullition avec quelques gouttes de *brome R*. Veillez à éliminer par ébullition tout excès de brome.

*Conservation* : à une température de 2 °C à 8 °C.

**Réactif phosphomolybdotungstique dilué.** *1065001.*

Diluez 1 volume de *réactif phosphomolybdotungstique R* avec 2 volumes d'*eau R*.

**Phosphonoformiate de triéthyle.** $C_7H_{15}O_5P$. ($M_r$ 210,2). *1132900.* [1474-78-8]. (Diéthoxyphosphoryl)formiate d'éthyle.

Liquide incolore.

$Eb_{12\ mm}$ : environ 135 °C.

**Phosphoreux (acide).** $H_3PO_3$. ($M_r$ 82,0). *1130600.* [13598-36-2].

Masse cristalline, blanche ou sensiblement blanche, très hygroscopique et déliquescente, lentement oxydée par l'oxygène (air) en $H_3PO_4$.

Cristaux orthorhombiques, instables, solubles dans l'eau, dans l'éthanol à 96 pour cent et dans un mélange de 3 volumes d'éther et de 1 volume d'éthanol à 96 pour cent.

$d_4^{21}$ : 1,651.

F : environ 73 °C.

**Phosphorique (acide).** *1065100.* [7664-38-2].

Voir *Acide phosphorique concentré (0004).*

**Acide phosphorique dilué.** *1065101.*

Voir *Acide phosphorique dilué (0005).*

**Acide phosphorique dilué R1.** *1065102.*

Prélevez 93 mL d'*acide phosphorique dilué R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

**Phosphorique (anhydride).** *1032900.* [1314-56-3].

Voir *Pentoxyde de diphosphore R*.

**Phosphotungstique (acide), solution d'.** *1065200.*

Chauffez à reflux 10 g de *tungstate de sodium R* avec 8 mL d'*acide phosphorique R* et 75 mL d'*eau R* pendant 3 h. Laissez refroidir et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

**Phtalaldéhyde.** $C_8H_6O_2$. ($M_r$ 134,1). *1065300.* [643-79-8]. Benzène-1,2-dicarboxaldéhyde.

Poudre cristalline, jaune.

F : environ 55 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière et de l'air.

**Réactif au phtalaldéhyde.** *1065301.*

Dissolvez 2,47 g d'*acide borique R* dans 75 mL d'*eau R*, ajustez à pH 10,4 avec une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 450 g/L et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*. Dissolvez 1,0 g de *phtalaldéhyde R* dans 5 mL de *méthanol R*, ajoutez 95 mL de la solution d'acide borique et 2 mL d'*acide thioglycolique R* et ajustez à pH 10,4 avec une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 450 g/L.

*Conservation* : à l'abri de la lumière pendant 3 jours.

**Phtalazine.** $C_8H_6N_2$. ($M_r$ 130,1). *1065400.* [253-52-1].

Cristaux jaune pâle, facilement solubles dans l'eau, solubles dans l'acétate d'éthyle, dans l'éthanol anhydre et dans le méthanol.

F : 89 °C à 92 °C.

**Phtalique (acide).** $C_8H_6O_4$. ($M_r$ 166,1). *1065600.* [88-99-3]. Acide benzène-1,2-dicarboxylique.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, soluble dans l'eau chaude et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Phtalique (anhydride).** $C_8H_4O_3$. ($M_r$ 148,1). *1065700.* [85-44-9]. Isobenzofuran-1,3-dione.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent.

Paillettes blanches ou sensiblement blanches.

F : 130 °C à 132 °C.

*Dosage.* Dissolvez 2,000 g d'anhydride phtalique dans 100 mL d'*eau R* et chauffez à reflux pendant 30 min. Refroidissez et titrez par l'*hydroxyde de sodium 1 M* en présence de *solution de phénolphtaléine R*.

1 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* correspond à 74,05 mg de $C_8H_4O_3$.

**Solution d'anhydride phtalique.** *1065701.*

Dissolvez 42 g d'*anhydride phtalique R* dans 300 mL de *pyridine anhydre R*. Laissez reposer pendant 16 h.

*Conservation* : à l'abri de la lumière pendant 1 semaine.

4. Réactifs

**Picéine.** $C_{14}H_{18}O_7$. ($M_r$ 298,3). *1130700.* [530-14-3]. 1-[4-(β-D-Glucopyranosyloxy)phényl]éthanone. *p*-(Acétylphényl)-β-D-glucopyranoside.

F : 194 °C à 195 °C.

**Picrique (acide).** $C_6H_3N_3O_7$. ($M_r$ 229,1). *1065800.* [88-89-1]. 2,4,6-Trinitrophénol.

Prismes ou paillettes jaunes, solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : humidifié par l'*eau R*.

**Solution d'acide picrique.** *1065801.*

Solution à 10 g/L.

**Solution d'acide picrique R1.** *1065802.*

Préparez 100 mL d'une solution saturée d'*acide picrique R* et ajoutez 0,25 mL de *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R*.

**α-Pinène.** $C_{10}H_{16}$. ($M_r$ 136,2). *1130800.* [7785-70-8]. (1*R*,5*R*)-2,6,6-Triméthylbicyclo[3.1.1]hept-2-ène.

Liquide non miscible à l'eau.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,859.

$n_D^{20}$ : environ 1,466.

Eb : 154 °C à 156 °C.

*L'α-pinène utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de fleur d'oranger amer (1175)*.

*Solution à examiner*. L'α-pinène à examiner.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**β-Pinène.** $C_{10}H_{16}$. ($M_r$ 136,2). *1109000.* [127-91-3]. 6,6-Diméthyl-2-méthylènedicyclo[3.1.1]heptane.

Liquide huileux, incolore, à odeur rappelant celle de l'essence de térébenthine, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

*Le β-pinène utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de fleur d'oranger amer (1175)*.

*Solution à examiner*. Le β-pinène à examiner.

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent.

**Pipérazine (hydrate de).** *1065900.* [142-63-2].

Voir *Hydrate de pipérazine (0425).*

**Pipéridine.** $C_5H_{11}N$. ($M_r$ 85,2). *1066000.* [110-89-4]. Hexahydropyridine.

Liquide incolore ou faiblement jaune, alcalin, miscible à l'eau, à l'éthanol à 96 pour cent et à l'éther de pétrole.

Eb : environ 106 °C.

**Pipéritone.** $C_{10}H_{16}O$. ($M_r$ 152,2). *1151200.* [89-81-6]. 6-Isopropyl-3-méthyl-cyclohex-2-én-1-one.

**Pirimiphos-éthyl.** $C_{13}H_{24}N_3O_3PS$. ($M_r$ 333,4). *1130300.* [23505-41-1].

F : 15 °C à 18 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/μL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Plaque à l'oxyde d'aluminium G pour CCM.** *1165200.*

Support de métal, verre ou plastique, recouvert d'une couche d'oxyde d'aluminium (de granulométrie 5-40 μm) contenant environ 10 pour cent de sulfate de calcium hémihydraté comme liant.

**Plaque au gel de silice pour CCM.** *1116700.*

Support de verre, métal ou plastique recouvert d'une couche de gel de silice d'épaisseur et de granulométrie appropriées (généralement 2-10 μm pour les plaques de fine granulométrie [chromatographie sur couche mince haute performance, CCMHP] et 5-40 μm pour les plaques CCM ordinaires). Si nécessaire, la taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

La plaque peut contenir un liant organique.

*Pouvoir de séparation chromatographique.* Déposez sur la plaque un volume approprié (10 μL pour une plaque CCM ordinaire et 1-2 μL pour une plaque de fine granulométrie) de *solution pour essai de performance pour CCM R.* Développez sur un parcours égal aux 2/3 de la hauteur de la plaque avec un mélange de 20 volumes de *méthanol R* et de 80 volumes de *toluène R.* La plaque n'est valable que si le chromatogramme présente 4 taches nettement séparées : une tache due au vert de bromocrésol à un $R_F$ inférieur à 0,15, une tache due au méthylorange à un $R_F$ de 0,1-0,25, une tache due au rouge de méthyle à un $R_F$ de 0,35-0,55 et une tache due au rouge Soudan G à un $R_F$ de 0,75-0,98.

**Plaque au gel de silice pour CCM pour l'essai de l'aminopolyéther.** *1172700.*

Immergez une *plaque au gel de silice pour CCM R* dans du *réactif à l'iodoplatinate R1* pendant 5-10 s. Séchez à température ambiante pendant 12 h, à l'abri de la lumière.

*Conservation* : à l'abri de la lumière, en récipient ouvert. Utilisez dans les 30 jours suivant la préparation.

**Plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM.** *1116800.*

Satisfait aux spécifications décrites pour la *plaque au gel de silice pour CCM R,* avec la modification suivante.

Contient un indicateur de fluorescence dont l'absorbance est maximale en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Suppression de fluorescence.* Déposez séparément sur la plaque, en 5 points, des volumes croissants (1-10 μL pour les plaques CCM ordinaires et 0,2-2 μL pour les plaques de fine granulométrie) d'une solution d'*acide benzoïque R* à 1 g/L dans un mélange de 15 volumes d'*éthanol anhydre R* et de 85 volumes de *cyclohexane R.* Développez sur un parcours égal à la moitié de la hauteur de la plaque avec le même mélange de solvants. Laissez évaporer les solvants, puis examinez en lumière ultraviolette à 254 nm. Dans le cas des plaques CCM ordinaires, pour les dépôts égaux ou supérieurs à 2 μg, l'acide benzoïque apparaît sous la forme de taches sombres sur fond fluorescent environ au milieu du chromatogramme. Dans le cas des plaques de fine granulométrie, pour les dépôts égaux ou supérieurs à 0,2 μg, l'acide benzoïque apparaît sous la forme de taches sombres sur fond fluorescent environ au milieu du chromatogramme.

**Plaque au gel de silice G pour CCM.** *1116900.*

Satisfait aux spécifications décrites pour la *plaque au gel de silice pour CCM R,* avec la modification suivante.

Contient du sulfate de calcium hémihydraté comme liant.

**Plaque au gel de silice $GF_{254}$ pour CCM.** *1117000.*

Satisfait aux spécifications décrites pour la *plaque au gel de silice pour CCM R,* avec les modifications suivantes.

Contient du sulfate de calcium hémihydraté comme liant et un indicateur de fluorescence dont l'absorbance est maximale en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Suppression de fluorescence.* Satisfait à l'essai décrit pour la *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R.*

**Plaque au gel de silice octadécylsilylé $F_{254}$ pour CCM.** *1146600.*

Support de verre, métal ou plastique recouvert d'une couche de gel de silice octadécylsilylé.

Contient un indicateur de fluorescence dont l'absorbance est maximale en lumière ultraviolette à 254 nm.

**Plaque au gel de silice octadécylsilylé pour CCM.** *1148600.*

Support de verre, métal ou plastique recouvert d'une couche de gel de silice octadécylsilylé. La plaque peut contenir un liant organique.

**Plaque au gel de silice octadécylsilylé pour CCM pour séparation des composés chiraux .** *1137700.*

Support de verre, de métal ou de plastique, recouvert d'une couche de gel de silice octadécylsilylé, imprégné d'ions $Cu^{2+}$ et d'hydroxyproline énantiomériquement pure. La plaque peut contenir un liant organique.

**Plaque au gel de silice silanisée pour CCM.** *1117100.*

Support de verre, métal ou plastique recouvert d'une couche de gel de silice silanisée d'épaisseur et de granulométrie appropriées (généralement 2-10 μm pour les plaques de fine granulométrie [chromatographie sur couche mince haute performance, CCMHP] et 5-40 μm pour les plaques CCM ordinaires). Si nécessaire, la taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

La plaque peut contenir un liant organique.

*Pouvoir de séparation chromatographique.* Dans une fiole conique de 250 mL, introduisez 0,1 g respectivement de *laurate de méthyle R,* de *myristate de méthyle R,* de *palmitate de méthyle R* et de *stéarate de méthyle R.* Ajoutez 40 mL de *solution alcoolique d'hydroxyde de potassium R* et chauffez à reflux au bain-marie pendant 1 h. Laissez refroidir, transvasez dans une ampoule à décantation à l'aide de 100 mL d'*eau R,* acidifiez avec de l'*acide chlorhydrique dilué R* (pH de 2 à 3) et agitez avec 3 fois 10 mL de *chlorure de méthylène R.* Réunissez les couches organiques, séchez-les sur du *sulfate de sodium anhydre R,* filtrez et évaporez à siccité au bain-marie. Dissolvez le résidu dans 50 mL de *chlorure de méthylène R.* Opérez par chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) en utilisant une *plaque au gel de silice silanisée pour CCM R.* Déposez respectivement sur 3 points de dépôt séparés, une quantité appropriée (environ 10 μL pour les plaques CCM ordinaires et environ 1-2 μL pour les plaques de fine granulométrie) de la solution préparée ci-dessus. Développez sur un parcours égal aux 2/3 de la hauteur de la plaque avec un mélange de 10 volumes d'*acide acétique glacial R,* de 25 volumes d'*eau R* et de 65 volumes de *dioxane R.* Laissez sécher la plaque à 120 °C pendant 30 min. Laissez refroidir, pulvérisez une solution d'*acide phosphomolybdique R* à 35 g/L dans du *2-propanol R* et chauffez à l'étuve à 150 °C jusqu'à apparition des taches. Traitez la plaque par des vapeurs d'ammoniaque jusqu'à obtention d'un fond blanc. Les chromatogrammes obtenus présentent 4 taches nettement séparées et délimitées.

**Plaque au gel de silice silanisée $F_{254}$ pour CCM.** *1117200.*

Satisfait aux spécifications décrites pour la *plaque au gel de silice silanisée pour CCM R,* avec la modification suivante.

Contient un indicateur de fluorescence dont l'absorbance est maximale en lumière ultraviolette à 254 nm.

**Plasma citraté de lapin.** *1020900.*

A l'aide d'une seringue en matière plastique munie d'une aiguille n°1, contenant le volume nécessaire de solution de *citrate de sodium R* à 38 g/L pour obtenir un rapport volume citrate/sang de 1:9, prélevez un échantillon de sang par ponction intracardiaque sur un lapin à jeun depuis 12 h. Séparez le plasma par centrifugation à 1500-1800 *g* à 15-20 °C pendant 30 min.

*Conservation* : à une température de 0 °C à 6 °C. Utilisez le plasma dans les 4 h qui suivent le prélèvement.

**Plasma pauvre en plaquettes.** *1066100.*

Recueillez 45 mL de sang humain dans une seringue de plastique de 50 mL contenant 5 mL d'une solution stérile de *citrate de sodium R* à 38 g/L. Sans délai, centrifugez à 1500 *g* à 4 °C pendant 30 min. Prélevez les deux tiers supérieurs du plasma surnageant à l'aide d'une seringue de plastique et, sans délai, centrifugez à 3500 *g* à 4 °C pendant 30 min. Prélevez les deux tiers supérieurs du liquide et congelez rapidement en quantités appropriées dans des tubes de plastique à une température égale ou inférieure à – 40 °C. Utilisez un appareillage en plastique ou en verre siliconé.

**Plasma (substrat de).** *1066200.*

Séparez le plasma de sang humain ou bovin recueilli dans $1/9^e$ de son volume de solution de *citrate de sodium R* à 38 g/L, ou dans $2/7^e$ de son volume d'une solution contenant 20 g/L de *citrate acide de sodium R* et 25 g/L de *glucose R*. Dans le premier cas, le substrat doit être préparé le jour du prélèvement du sang, dans le dernier cas, le substrat de plasma peut être préparé dans les 2 jours qui suivent le prélèvement.

*Conservation* : à – 20 °C.

**Plasma (substrat de) R1.** *1066201.*

*Utilisez un équipement hydrophobe fabriqué à partir de matériaux tels que des plastiques appropriés ou du verre siliconé pour prélever et manipuler le sang.*

Sur au moins 5 moutons, recueillez un volume de sang approprié ; un volume de 285 mL de sang ajouté à 15 mL de solution d'anticoagulant convient mais des volumes plus petits peuvent être recueillis, sur des animaux vivants ou au moment de leur abattage, au moyen d'une aiguille adaptée à une canule appropriée d'une longueur suffisante pour atteindre le fond du récipient collecteur. Rejetez les quelques premiers millilitres et recueillez uniquement le sang qui s'écoule librement. Mélangez le sang à une quantité suffisante d'une solution anticoagulante contenant 8,7 g de *citrate de sodium R* et 4 mg d'*aprotinine R* dans 100 mL d'*eau R* pour obtenir une proportion finale de 19 volumes de sang pour 1 volume de solution anticoagulante. Pendant et immédiatement après le prélèvement, imprimez au récipient un mouvement rotatoire afin que le mélange se fasse sans former de mousse. Lorsque le prélèvement est terminé, fermez la fiole et laissez refroidir à 10-15 °C. Une fois refroidi, réunissez le contenu de tous les flacons à l'exception de ceux qui présentent des signes évidents d'hémolyse ou de coagulation et maintenez le sang recueilli à 10-15 °C.

Dès que possible et dans les 4 h qui suivent le prélèvement, centrifugez le sang recueilli à 1000-2000 *g* à 10-15 °C pendant 30 min. Séparez le surnageant et centrifugez-le à 5000 *g* pendant 30 min. Une centrifugation plus rapide, par exemple à 20 000 *g* pendant 30 min, peut être appliquée si nécessaire pour clarifier le plasma ; des procédés de filtration ne doivent pas être utilisés. Séparez les liquides surnageants et, sans délai, mélangez soigneusement et répartissez le substrat de plasma dans de petits récipients qui seront bouchés à la fin de l'opération, en quantités suffisantes pour permettre un titrage complet de l'héparine (par exemple, 10 mL à 30 mL). Sans attendre, congelez rapidement à une température inférieure à – 70 °C (par exemple, en plongeant les récipients dans de l'azote liquide) et conservez à une température inférieure à – 30 °C.

Le plasma préparé dans ces conditions peut être utilisé comme substrat de plasma dans le titrage de l'héparine si, dans les conditions du titrage, il donne un temps de coagulation approprié à la méthode de détection utilisée et s'il donne des courbes réponse/log.dose reproductibles à fortes pentes.

Au moment de l'utilisation, décongelez une certaine quantité du substrat de plasma dans un bain-marie à 37 °C en remuant doucement jusqu'à liquéfaction complète ; une fois liquéfié, le plasma doit être maintenu à 10-20 °C et utilisé sans délai. Le substrat de plasma décongelé peut être légèrement centrifugé si nécessaire ; aucun procédé de filtration ne doit être utilisé.

**Plasma (substrat de) R2.** *1066202.*

Préparez à partir de sang humain ayant un taux de facteur IX inférieur à 1 pour cent du taux normal. Recueillez le sang dans $1/9^e$ de son volume d'une solution de *citrate de sodium R* à 38 g/L.

*Conservation* : en tube de plastique, en petites quantités, à une température égale ou inférieure à – 30 °C.

**Plasma (substrat de) R3.** *1066203.*

Préparez à partir de sang humain ayant un taux de facteur XI inférieur à 1 pour cent du taux normal. Recueillez le sang dans $1/9^e$ de son volume d'une solution de *citrate de sodium R* à 38 g/L.

*Conservation* : en tube en plastique, en petites quantités, à une température égale ou inférieure à – 30 °C.

**Plasma (substrat de) déficient en facteur V.** *1066300.*

Utilisez de préférence un plasma congénitalement déficient ou préparez-le comme suit : séparez le plasma du sang humain qui a été recueilli dans $1/10^e$ de son volume dans une solution d'*oxalate de sodium R* à 13,4 g/L. Faites incuber à 37 °C pendant 24 h à 36 h. Examiné par la méthode décrite pour la *solution du facteur V de coagulation R*, le plasma doit avoir un temps de coagulation de 70 s à 100 s. Si le temps de coagulation est inférieur à 70 s, faites incuber le plasma de nouveau pendant 12 h à 24 h.

*Conservation* : en petites quantités, à une température égale ou inférieure à – 20 °C.

**Plasminogène humain.** *1109100.* [9001-91-6].

Une substance présente dans le sang qui peut être transformée en plasmine, une enzyme qui provoque la lyse de la fibrine des caillots sanguins.

**Plomb (acétate basique de), solution d'.** *1048400.* [1335-32-6].

Le plomb est présent sous forme d'un acétate correspondant approximativement à la formule $C_8H_{14}O_{10}Pb_3$.

*Teneur* : 16,7 pour cent *m/m* à 17,4 pour cent *m/m* de Pb ($A_r$ 207,2).

Dissolvez 40,0 g d'*acétate de plomb R* dans 90 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R*. Ajustez à pH 7,5 avec la *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R*. Centrifugez et utilisez la solution surnageante, limpide et incolore.

Conservée en récipient bien fermé, la solution reste limpide.

**Plomb (acétate de).** $C_4H_6O_4Pb,3H_2O$. ($M_r$ 379,3). *1048100.* [6080-56-4]. Diacétate de plomb trihydraté.

Cristaux incolores, efflorescents, facilement solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Coton à l'acétate de plomb.** *1048101.*

Plongez du coton hydrophile dans un mélange de 1 volume d'*acide acétique dilué R* et de 10 volumes de solution d'*acétate de plomb R*. Laissez égoutter le coton sans le presser en le déposant entre plusieurs épaisseurs de papier buvard et laissez sécher à l'air.

4. Réactifs

*Conservation* : en récipient étanche.

**Papier à l'acétate de plomb.** *1048102.*

Plongez une feuille de papier buvard (80 g/m²) dans un mélange de 1 volume d'*acide acétique dilué R* et de 10 volumes de solution d'*acétate de plomb R*. Laissez sécher et découpez le papier en bandelettes de 15 mm sur 40 mm.

**Solution d'acétate de plomb.** *1048103.*

Solution à 95 g/L dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R*.

**Plomb (dioxyde de).** $PbO_2$. ($M_r$ 239,2). *1048200.* [1309-60-0].

Poudre brun foncé, dégageant de l'oxygène par chauffage, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'acide chlorhydrique avec dégagement de chlore, soluble dans l'acide nitrique dilué en présence de peroxyde d'hydrogène, d'acide oxalique et d'autres substances réductrices, soluble dans des solutions concentrées d'hydroxydes alcalins à chaud.

**Plomb (nitrate de).** $Pb(NO_3)_2$. ($M_r$ 331,2). *1048300.* [10099-74-8]. Dinitrate de plomb.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, ou cristaux incolores, facilement solubles dans l'eau.

**Solution de nitrate de plomb.** *1048301.*

Solution à 33 g/L.

**Poly[(cyanopropyl)méthylphénylméthylsiloxane].** *1066500.*

Voir *Poly[(cyanopropyl)(méthyl)][(phényl)(méthyl)]siloxane R*.

**Poly[(cyanopropyl)(méthyl)][(phényl)(méthyl)]siloxane.** *1066500.*

Contient 25 pour cent de groupes cyanopropyle, 25 pour cent de groupes phényle et 50 pour cent de groupes méthyle (masse moléculaire relative moyenne 8000).

Liquide très visqueux (d'une viscosité d'environ 9000 mPa·s).

$d_{25}^{25}$ : environ 1,10.

$n_D^{25}$ : environ 1,502.

**Poly[(cyanopropyl)(phényl)][diméthyl]siloxane.** *1114800.*

Phase stationnaire pour chromatographie en phase gazeuse.

Contient 6 pour cent de groupes (cyanopropyl)(phényl) et 94 pour cent de groupes diméthyle.

**Poly(cyanopropyl)(phénylméthyl)siloxane.** *1066600.*

Phase stationnaire pour chromatographie.

Contient 90 pour cent de groupes cyanopropyle et 10 pour cent de groupes phénylméthyle.

**Poly(cyanopropyl)(7)(phényl)(7)(méthyl)(86)siloxane.** *1109200.*

Phase stationnaire pour chromatographie en phase gazeuse.

Contient 7 pour cent de groupes cyanopropyle, 7 pour cent de groupes phényle et 86 pour cent de groupes diméthyle.

**Poly(cyanopropylphényl)(14)(méthyl)(86)siloxane.** *1173700.*

Phase stationnaire pour chromatographie.

Contient 14 pour cent de groupes cyanopropylphényle et 86 pour cent de groupes méthyle.

**Poly(cyanopropyl)siloxane.** *1066700.*

Contient 100 pour cent de groupes cyanopropyle.

**Poly(diméthyl)(diphényl)(divinyl)siloxane.** *1100000.*

Phase stationnaire pour chromatographie.

Contient 94 pour cent de groupes méthyle, 5 pour cent de groupes phényle et 1 pour cent de groupes vinyle. SE54.

**Poly(diméthyl)(diphényl)siloxane.** *1066900.*

Phase stationnaire pour chromatographie.

Contient 95 pour cent de groupes méthyle et 5 pour cent de groupes phényle. DB-5, SE52.

**Poly(diméthyl)(diphényl)siloxane désactivé pour les bases.** *1176600.*

Phase stationnaire pour chromatographie en phase gazeuse désactivée pour les bases spécialement conçue pour l'analyse d'amines.

Contient 95 pour cent de groupes méthyle et 5 pour cent de groupes phényle.

**Poly(diméthyl)(75)(diphényl)(25)siloxane.** *1171500.*

Phase stationnaire pour chromatographie.

Contient 75 pour cent de groupes méthyle et 25 pour cent de groupes phényle.

**Poly(diméthyl)(85)(diphényl)(15)siloxane.** *1154700.*

Phase stationnaire pour chromatographie.

Contient 85 pour cent de groupes méthyle et 15 pour cent de groupes phényle. PS086.

**Poly(diméthyl)siloxane.** *1066800.*

Caoutchouc de méthylsilicone. Polymère organosilicique ayant l'aspect d'une gomme semi-liquide, incolore.

La viscosité intrinsèque déterminée par le procédé ci-après est d'environ 115 mL·g$^{-1}$. Pesez à 0,1 mg près, 1,5 g, 1 g et 0,3 g de polymère dans des fioles jaugées de 100 mL. Introduisez 40-50 mL de *toluène R*, agitez pour obtenir la dissolution complète, puis complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Déterminez la viscosité (*2.2.9*) de chaque solution. Déterminez également la viscosité du *toluène R* dans les mêmes conditions. Réduisez la concentration de chaque solution de moitié en la diluant avec du *toluène R*. Déterminez la viscosité de ces solutions, soit :

$c$ = concentration, en grammes par 100 mL,

$t_1$ = temps d'écoulement de la solution à examiner,

$t_2$ = temps d'écoulement du toluène,

$\eta_1$ = viscosité de la solution à examiner, en millipascals secondes,

$\eta_2$ = viscosité du toluène, en millipascals secondes,

$d_1$ = densité de la solution à examiner,

$d_2$ = densité du toluène.

Pour les densités, prenez les valeurs suivantes.

| Concentration en g/100 mL | Densité ($d_1$) |
|---|---|
| 0 - 0,5 | 1,000 |
| 0,5 - 1,25 | 1,001 |
| 1,25 - 2,20 | 1,002 |
| 2,20 - 2,75 | 1,003 |
| 2,75 - 3,20 | 1,004 |
| 3,20 - 3,75 | 1,005 |
| 3,75 - 4,50 | 1,006 |

La viscosité spécifique s'obtient à l'aide de l'équation suivante :

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_1 - \eta_2}{\eta_2} = \frac{t_1 d_1}{t_2 d_2} - 1$$

et la viscosité réduite à l'aide de l'équation suivante :

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c}$$

La viscosité intrinsèque η est obtenue en extrapolant à $c = 0$ la relation précédente. Pour cela, tracez la courbe $\eta_{sp}/c$ ou log $\eta_{sp}/c$ en fonction de $c$. L'extrapolation à $c = 0$ permet de déduire η. La viscosité intrinsèque est exprimée en millilitres par gramme, il est donc nécessaire de multiplier la valeur obtenue par 100.

Le spectre d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*) obtenu avec la substance dispersée, si nécessaire, dans quelques gouttes de *tétrachlorure de carbone R*, et déposée sur une plaque de chlorure de sodium, ne présente pas, à 3053 $cm^{-1}$, d'absorption correspondant à des groupes vinyliques.

*Perte à la dessiccation* (*2.2.32*) : au maximum 2,0 pour cent, si déterminé par chauffage sous vide à 350 °C pendant 15 min sur 1,000 g de poly(diméthyl)siloxane et au maximum 0,8 pour cent si déterminé par chauffage à 200 °C pendant 2 h sur 2,000 g de poly(diméthyl)siloxane.

**Polyéthylèneglycol (adipate de).** $(C_8H_{12}O_4)_n$. ($M_r$ $(172,2)_n$). *1067700.*

Masse blanche ou sensiblement blanche d'aspect cireux, pratiquement insoluble dans l'eau.

F : environ 43 °C.

**Polyéthylèneglycol avec désactivation polaire.** *1179000.*

Phase stationnaire pour chromatographie en phase gazeuse.

**Polyéthylèneglycol désactivé pour les bases.** *1170300.*

Phase stationnaire pour chromatographie en phase gazeuse.

Polyéthylèneglycol réticulé désactivé pour les bases spécialement conçu pour l'analyse d'amines.

**Polyéthylèneglycol (succinate de).** $(C_6H_8O_4)_n$. ($M_r$ $(144,1)_n$). *1067800.*

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau.

F : environ 102 °C.

**Polymère vinylique octadécylé pour chromatographie.** *1155400.*

Particules sphériques (5 µm) d'un copolymère d'alcool vinylique modifié chimiquement par greffage de groupes octadécylés sur les groupements hydroxyle.

**Polymère vinylique octadécylsilylé pour chromatographie.** *1121600.*

Particules sphériques (5 µm) d'un copolymère d'alcool vinylique greffé avec un octadécylsilane. Taux de carbone de 17 pour cent.

**Polyméthacrylate hydroxylé (gel de).** *1151300.*

Phase stationnaire pour chromatographie d'exclusion.

Gel à base de polymère de l'acide méthacrylique hydroxylé.

**Polyméthylphénylsiloxane.** *1067900.*

Phase stationnaire pour chromatographie.

Contient 50 pour cent de groupes méthyles et 50 pour cent de groupes phényles. (Masse moléculaire relative moyenne 4000).

Liquide très visqueux (viscosité d'environ 1300 mPa·s).

$d_{25}^{25}$ : environ 1,09.

$n_D^{25}$ : environ 1,540.

**Poly[méthyl(95)phényl(5)]siloxane.** *1068000.*

Voir *Poly(diméthyl)(diphényl)siloxane R.*

**Poly[méthyl(94)phényl(5)vinyl(1)]siloxane.** *1068100.*

Voir *Poly(diméthyl)(diphényl)(divinyl)siloxane R.*

**Poly[méthyl(trifluoropropylméthyl)siloxane].** *1171600.*

Phase stationnaire pour chromatographie en phase gazeuse.

Contient 50 pour cent de groupes trifluoropropylméthyle et 50 pour cent de groupes méthyle.

**Polysorbate 20.** *1068300.* [9005-64-5].

Voir *Polysorbate 20 (0426).*

**Polysorbate 80.** *1068400.* [9005-65-6].

Voir *Polysorbate 80 (0428).*

**Polystyrène 900-1000.** *1112200.* [9003-53-6].

Substance étalon organique, utilisée pour la calibration en chromatographie en phase gazeuse.

$M_w$ : environ 950.

$M_w/M_n$ : environ 1,10.

**Potassium-antimoine (tartrate de).** $C_4H_4KO_7Sb,{}^1/_2H_2O$. ($M_r$ 333,9). *1007600.* Aqua[tartrato(4−)-$O^1$, $O^2$, $O^3$]antimoniate(III) de potassium hémihydraté.

Poudre granulée blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores transparents, solubles dans l'eau et dans le glycérol, facilement solubles dans l'eau bouillante, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent. La solution aqueuse est faiblement acide.

**Potassium (acétate de).** *1175900.* [127-08-2].

Voir *Potassium (acétate de) (1139).*

**Potassium (bicarbonate de).** $KHCO_3$. ($M_r$ 100,1). *1069900.* [298-14-6]. Hydrogénocarbonate de potassium.

Cristaux transparents et incolores, facilement solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution méthanolique saturée de bicarbonate de potassium.** *1069901.*

Dissolvez 0,1 g de *bicarbonate de potassium R* dans 0,4 mL d'*eau R* en chauffant au bain-marie. Ajoutez 25 mL de *méthanol R* et agitez par rotation, en maintenant la solution sur le bain-marie jusqu'à dissolution complète. Préparez extemporanément.

**Potassium (bromate de).** $KBrO_3$. ($M_r$ 167,0). *1068700.* [7758-01-2].

Poudre granuleuse ou cristaux blancs ou sensiblement blancs, solubles dans l'eau, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Potassium (bromure de).** *1068800.* [7758-02-3]. Voir *Bromure de potassium (0184).*

*Le bromure de potassium utilisé pour la spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (2.2.24) satisfait également à l'essai suivant.*

Une pastille de 2 mm d'épaisseur préparée à partir de la substance préalablement desséchée à 250 °C pendant 1 h, présente un seuil pratiquement linéaire dans l'intervalle de 4000-620 $cm^{-1}$. Elle ne présente aucun maximum dont l'absorbance est supérieure à 0,02 au-dessus du seuil, à l'exception de ceux dus à l'eau à 3440 $cm^{-1}$ et à 1630 $cm^{-1}$.

**Potassium (carbonate de).** $K_2CO_3$. ($M_r$ 138,2). *1068900.* [584-08-7]. Carbonate de dipotassium.

Poudre granuleuse blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique, très soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'éthanol anhydre.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Potassium (chlorate de).** $KClO_3$. ($M_r$ 122,6). *1069000.* [3811-04-9].

Poudre, granules ou cristaux blancs ou sensiblement blancs, solubles dans l'eau.

**Potassium (chlorure de).** *1069100.* [7447-40-7]. Voir *Chlorure de potassium (0185).*

*Le chlorure de potassium utilisé pour la spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (2.2.24) satisfait également à l'essai suivant.*

Une pastille de 2 mm d'épaisseur préparée à partir de la substance préalablement desséchée à 250 °C pendant 1 h, présente un seuil pratiquement linéaire dans l'intervalle de 4000-620 $cm^{-1}$. Elle ne présente aucun maximum dont l'absorbance est supérieure à 0,02 au-dessus du seuil, à l'exception de ceux dus à l'eau à 3440 $cm^{-1}$ et à 1630 $cm^{-1}$.

**Solution de chlorure de potassium 0,1 M.** *1069101.*

Contient une quantité de *chlorure de potassium R* correspondant à 7,46 g de KCl dans 1000,0 mL.

**Potassium (chromate de).** $K_2CrO_4$. ($M_r$ 194,2). *1069200.* [7789-00-6]. Chromate de dipotassium.

Cristaux jaunes, facilement solubles dans l'eau.

**Solution de chromate de potassium.** *1069201.*

Solution à 50 g/L.

**Potassium (citrate de).** *1069300.* [6100-05-6].

Voir *Citrate de potassium (0400).*

**Potassium (cyanure de).** KCN. ($M_r$ 65,1). *1069400.* [151-50-8].

Poudre cristalline, masses ou granules blancs ou sensiblement blancs, facilement solubles dans l'eau, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution de cyanure de potassium.** *1069401.*

Solution à 100 g/L.

**Solution de cyanure de potassium exempte de plomb.** *1069402.*

Dissolvez 10 g de *cyanure de potassium R* dans 90 mL d'*eau R,* ajoutez 2 mL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R* diluée au 1/5. Laissez reposer pendant 24 h, complétez à 100 mL avec de l'*eau R* et filtrez.

La solution satisfait à l'essai suivant : prélevez 10 mL de la solution, ajoutez 10 mL d'*eau R* et 10 mL de *solution de sulfure d'hydrogène R*. Il ne se développe pas de coloration dans la solution, même après addition de 5 mL d'*acide chlorhydrique dilué R.*

**Potassium (dichromate de).** $K_2Cr_2O_7$. ($M_r$ 294,2). *1069500.* [7778-50-9]. Dichromate de dipotassium.

Le dichromate de potassium utilisé pour l'étalonnage des spectrophotomètres (*2.2.25*) contient au minimum 99,9 pour cent de $K_2Cr_2O_7$, calculé par rapport à la substance desséchée à 130 °C.

Cristaux rouge orangé, solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Dosage.* Dissolvez 1,000 g de dichromate de potassium dans de l'*eau R* et complétez à 250,0 mL avec le même solvant. Dans un ballon de 500 mL, introduisez 50,0 mL de cette solution, ajoutez une solution extemporanée contenant dans 100 mL d'*eau R,* 4 g d'*iodure de potassium R,* 2 g de *bicarbonate de sodium R* et 6 mL d'*acide chlorhydrique R*. Bouchez le ballon et laissez reposer à l'abri de la lumière pendant 5 min. Titrez l'iode libéré par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* en présence de 1 mL de solution d'amidon exempte d'iodure R.

1 mL de *thiosulfate de sodium 0,1 M* correspond à 4,903 mg de $K_2Cr_2O_7$.

**Solution de dichromate de potassium.** *1069501.*

Solution à 106 g/L.

**Solution de dichromate de potassium R1.** *1069502.*

Solution à 5 g/L.

**Potassium (ferricyanure de).** $K_3[Fe(CN)_6]$. ($M_r$ 329,3). *1069700.* [13746-66-2]. Hexacyanoferrate(III) de potassium.

Cristaux rouges, facilement solubles dans l'eau.

**Solution de ferricyanure de potassium.** *1069701.*

Lavez 5 g de *ferricyanure de potassium R* avec un peu d'*eau R*. Dissolvez-les ensuite dans de l'*eau R* et complétez à 100 mL avec le même solvant. Préparez extemporanément.

**Potassium (ferriperiodate de), solution de.** *1070801.*

Dissolvez 1 g de *periodate de potassium R* dans 5 mL d'une solution récemment préparée d'*hydroxyde de potassium R* à 120 g/L, ajoutez 20 mL d'*eau R* puis 1,5 mL de *solution de chlorure ferrique R1.* Complétez à 50 mL avec une solution récemment préparée d'*hydroxyde de potassium R* à 120 g/L.

**Potassium (ferrocyanure de).** $K_4[Fe(CN)_6],3H_2O$. ($M_r$ 422,4). *1069800.* [14459-95-1]. Hexacyanoferrate(II) de potassium.

Cristaux jaunes transparents, facilement solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution de ferrocyanure de potassium.** *1069801.*

Solution à 53 g/L.

**Potassium (fluorure de).** KF. ($M_r$ 58,1). *1137800.* [7789-23-3].

Cristaux incolores ou poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, déliquescents, solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Potassium (hydrogénosulfate de).** *1070100.* [7646-93-7].

Voir *Sulfate monopotassique R.*

**Potassium (hydroxyde de).** *1070300.* [1310-58-3].

Voir *Hydroxyde de potassium (0840).*

**Solution alcoolique d'hydroxyde de potassium.** *1070303.*

Dissolvez 3 g d'*hydroxyde de potassium R* dans 5 mL d'*eau R* et complétez à 100 mL avec de l'*alcool exempt d'aldéhyde R*. Décantez la solution limpide. La solution doit être sensiblement incolore.

**Solution alcoolique d'hydroxyde de potassium R1.** *1070304.*

Dissolvez 6,6 g d'*hydroxyde de potassium R* dans 50 mL d'*eau R* et complétez à 1000 mL avec de l'*éthanol anhydre R*.

**Solution alcoolique d'hydroxyde de potassium 2 M.** *1070301.*

Dissolvez 12 g d'*hydroxyde de potassium R* dans 10 mL d'*eau R* et complétez à 100 mL avec de l'*éthanol à 96 pour cent R.*

**Solution d'hydroxyde de potassium 0,5 M dans l'alcool à 10 pour cent *V/V*.** *1070302.*

Dissolvez 28 g d'*hydroxyde de potassium R* dans 100 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R.*

**Potassium (iodate de).** $KIO_3$. ($M_r$ 214,0). *1070400.* [7758-05-6].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, soluble dans l'eau.

**Potassium (iodobismuthate de), solution d'.** *1070600.*

A 0,85 g de *sous-nitrate de bismuth R,* ajoutez 40 mL d'*eau R,* 10 mL d'*acide acétique glacial R* et 20 mL d'une solution d'*iodure de potassium R* à 400 g/L.

**Solution diluée d'iodobismuthate de potassium.** *1070603.*

Dissolvez 100 g d'*acide tartrique R* dans 500 mL d'*eau R* et ajoutez 50 mL de *solution d'iodobismuthate de potassium R1.*

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Potassium (iodobismuthate de), solution d' R1.** *1070601.*

Dissolvez 100 g d'*acide tartrique R* dans 400 mL d'*eau R* et ajoutez 8,5 g de *sous-nitrate de bismuth R*. Agitez pendant 1 h, ajoutez 200 mL d'une solution d'*iodure de potassium R* à 400 g/L et agitez. Laissez reposer pendant 24 h et filtrez.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Potassium (iodobismuthate de), solution d' R2.** *1070602.*

*Solution mère.* Mettez en suspension 1,7 g de *sous-nitrate de bismuth R* et 20 g d'*acide tartrique R* dans 40 mL d'*eau R.* A cette suspension, ajoutez 40 mL d'une solution d'*iodure*

*de potassium R* à 400 g/L et agitez pendant 1 h. Filtrez. La solution peut être conservée pendant plusieurs jours dans des flacons bruns.

*Solution à pulvériser.* Mélangez immédiatement avant utilisation de 5 mL de solution mère avec 15 mL d'*eau R.*

**Potassium (iodobismuthate de), solution d' R3.** *1070604.*

Dissolvez 0,17 g de *sous-nitrate de bismuth R* dans un mélange de 2 mL d'*acide acétique glacial R* et de 18 mL d'*eau R.* Ajoutez 4 g d'*iodure de potassium R* et 1 g d'*iode R* et complétez à 100 mL avec de l'*acide sulfurique dilué R.*

**Potassium (iodobismuthate de), solution d' R4.** *1070605.*

Dissolvez 1,7 g de *sous-nitrate de bismuth R* dans 20 mL d'*acide acétique glacial R.* Ajoutez 80 mL d'*eau distillée R,* 100 mL d'une solution d'*iodure de potassium R* à 400 g/L, 200 mL d'*acide acétique glacial R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau distillée R.* Mélangez 2 volumes de cette solution avec 1 volume d'une solution de *chlorure de baryum R* à 200 g/L.

**Potassium (iodobismuthate de), solution d' R5.** *1070606.*

A 0,85 g de *sous-nitrate de bismuth R,* ajoutez 10 mL d'*acide acétique glacial R* et chauffez doucement jusqu'à dissolution complète. Ajoutez 40 mL d'*eau R* et laissez refroidir. A 5 mL de cette solution, ajoutez 5 mL d'une solution à 400 g/L d'*iodure de potassium R,* 20 mL d'*acide acétique glacial R* et 70 mL d'*eau R.*

**Potassium (iodure de).** *1070500.* [7681-11-0].

Voir *Iodure de potassium (0186).*

**Solution amidonnée d'iodure de potassium.** *1070501.*

Dissolvez 0,75 g d'*iodure de potassium R* dans 100 mL d'*eau R.* Chauffez à ébullition et ajoutez, en agitant, une solution de 0,5 g d'*amidon soluble R* dans 35 mL d'*eau R.* Chauffez à ébullition pendant 2 min et laissez refroidir.

*Essai de sensibilité.* A 15 mL de solution amidonnée d'iodure de potassium, ajoutez 0,05 mL d'*acide acétique glacial R* et 0,3 mL de *solution d'iode R2.* La solution est bleue.

**Solution d'iodure de potassium.** *1070502.*

Solution à 166 g/L.

**Solution d'iodure de potassium iodée.** *1070503.*

Dissolvez 2 g d'*iode R* et 4 g d'*iodure de potassium R* dans 10 mL d'*eau R.* Après dissolution, complétez à 100 mL avec de l'*eau R.*

**Solution d'iodure de potassium iodée R1.** *1070505.*

Dissolvez 500 mg d'*iode R* et 1,5 g d'*iodure de potassium R* dans de l'*eau R* et complétez à 25 mL avec le même solvant.

**Solution saturée d'iodure de potassium.** *1070504.*

Solution saturée d'*iodure de potassium R* dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R.* Il faut s'assurer que la solution reste saturée, ce qui est indiqué par la présence de cristaux non dissous.

Vérifiez le réactif en ajoutant à 0,5 mL de la solution saturée d'iodure de potassium, 30 mL d'un mélange de 2 volumes de *chloroforme R* et de 3 volumes d'*acide acétique glacial R,* ainsi que 0,1 mL de *solution d'amidon R.* S'il apparaît une coloration bleue, celle-ci doit disparaître par addition de 0,05 mL de *thiosulfate de sodium 0,1 M.*

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Potassium (nitrate de).** $KNO_3$. ($M_r$ 101,1). *1070700.* [7757-79-1].

Cristaux incolores, très solubles dans l'eau.

**Potassium (periodate de).** $KIO_4$. ($M_r$ 230,0). *1070800.* [7790-21-8].

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores, solubles dans l'eau.

**Potassium (permanganate de).** *1070900.* [7722-64-7].

Voir *Permanganate de potassium (0121).*

**Solution de permanganate de potassium.** *1070902.*

Solution à 30 g/L.

**Solution phosphorique de permanganate de potassium.** *1070901.*

Dissolvez 3 g de *permanganate de potassium R* dans un mélange de 15 mL d'*acide phosphorique R* et de 70 mL d'*eau R,* puis complétez à 100 mL avec de l'*eau R.*

**Potassium (perrhénate de).** $KReO_4$. ($M_r$ 289,3). *1071000.* [10466-65-6].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, soluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, dans le méthanol et dans le propylèneglycol.

**Potassium (persulfate de).** $K_2S_2O_8$. ($M_r$ 270,3). *1071100.* [7727-21-1]. Peroxodisulfate de dipotassium.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores, assez solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent. Les solutions aqueuses se décomposent à la température ambiante et plus rapidement à chaud.

**Potassium (phtalate acide de).** $C_8H_5KO_4$. ($M_r$ 204,2). *1070000.* [877-24-7]. Benzène-1,2-dicarboxylate acide de potassium.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, solubles dans l'eau, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution de phtalate acide de potassium 0,2 M.** *1070001.*

Contient une quantité de *phtalate acide de potassium R* correspondant à 40,84 g de $C_8H_5KO_4$ dans 1000,0 mL.

**Potassium (plombite de), solution de.** *1071200.*

Dissolvez 1,7 g d'*acétate de plomb R,* 3,4 g de *citrate de potassium R* et 50 g d'*hydroxyde de potassium R* dans de l'*eau R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

**Potassium (pyroantimoniate de).** $KSb(OH)_6$. ($M_r$ 262,9). *1071300.* [12208-13-8]. Hexahydroxoantimoniate de potassium.

Poudre cristalline ou cristaux, blancs ou sensiblement blancs, assez solubles dans l'eau.

**Solution de pyroantimoniate de potassium.** *1071301.*

Dissolvez 2 g de *pyroantimoniate de potassium R* dans 95 mL d'*eau R* chaude. Refroidissez rapidement et ajoutez une solution de 2,5 g d'*hydroxyde de potassium R* dans 50 mL d'*eau R* et 1 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R.* Laissez reposer pendant 24 h. Filtrez et complétez à 150 mL avec de l'*eau R.*

**Potassium (tartrate acide de).** $C_4H_5KO_6$. ($M_r$ 188,2). *1070200.* [868-14-4]. (2,3)-2,3-Dihydroxybutane-1,4-dioate acide de potassium.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, ou cristaux incolores à légèrement opaques, peu solubles dans l'eau, solubles dans l'eau bouillante, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Potassium (tartrate de).** $C_4H_4K_2O_6,{}^1/_2H_2O$. ($M_r$ 235,3). *1071400.* [921-53-9]. (2*R*,3 *R*)-2,3-Dihydroxybutane-1,4-dioate de dipotassium hémihydraté.

Poudre granuleuse ou cristaux blancs ou sensiblement blancs, très solubles dans l'eau, très peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Potassium (tartrate de sodium et de).** *1083500.* [6381-59-5].

Voir *Sodium et de potassium (tartrate de) R.*

4. Réactifs

**Potassium (tétraiodomercurate de), solution alcaline de.** *1071600.*

Dissolvez 11 g d'*iodure de potassium R* et 15 g d'*iodure mercurique R* dans de l'*eau R*, puis complétez à 100 mL avec le même solvant. Mélangez extemporanément 1 volume de cette solution et 1 volume de solution d'*hydroxyde de sodium R* à 250 g/L.

**Potassium (tétraiodomercurate de), solution de.** *1071500.*

Dissolvez 1,35 g de *chlorure mercurique R* dans 50 mL d'*eau R*. Ajoutez 5 g d'*iodure de potassium R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

**Potassium (tétroxalate de).** $C_4H_3KO_8,2H_2O$. ($M_r$ 254,2). *1071700.* [6100-20-5].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, assez soluble dans l'eau, soluble dans l'eau bouillante, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Potassium (thiocyanate de).** KSCN. ($M_r$ 97,2). *1071800.* [333-20-0].

Cristaux incolores, déliquescents, très solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Solution de thiocyanate de potassium.** *1071801.*

Solution à 97 g/L.

**Pourpre de bromocrésol.** $C_{21}H_{16}Br_2O_5S$. ($M_r$ 540,2). *1012700.* [115-40-2]. 3′,3″-Dibromo-*o*-crésolsulfonephtaléine. 4,4′-(3*H*-2,1-Benzoxathiazole-3-ylidène)bis(2-bromo-6-méthylphénol) *S,S*-dioxyde.

Poudre rosée, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins.

**Solution de pourpre de bromocrésol.** *1012701.*

Dissolvez 50 mg de *pourpre de bromocrésol R* dans 0,92 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* et 20 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*, puis complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

*Essai de sensibilité.* A 0,2 mL de solution de pourpre de bromocrésol, ajoutez 100 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R* et 0,05 mL d'*hydroxyde de sodium 0,02 M*. La solution est bleu violacé. Le virage au jaune de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,2 mL d'*acide chlorhydrique 0,02 M*.

*Zone de virage* : pH 5,2 (jaune) à pH 6,8 (bleu-violet).

**Pourpre de *m*-crésol.** $C_{21}H_{18}O_5S$. ($M_r$ 382,44). *1121700.* [2303-01-7]. *m*-Crésolsulfonephtaléine.

Poudre cristalline vert-jaune, peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, dans l'acide acétique glacial et dans le méthanol.

**Solution de pourpre de *m*-crésol.** *1121701.*

Dissolvez 0,1 g de *pourpre de m-crésol R* dans 13 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*, complétez à 100 mL avec de l'*eau R* et mélangez.

*Zones de virage* : pH 1,2 (rouge) à pH 2,8 (jaune) ; pH 7,4 (jaune) à pH 9,0 (pourpre).

**Pourpre de phtaléine.** $C_{32}H_{32}N_2O_{12},xH_2O$. ($M_r$ 637, substance anhydre). *1065500.* [2411-89-4]. Metalphtaléine. Acide 2,2′,2″,2′,3″-bis(méthylènenitrilo)]tétraacétique. Acide (1,3-dihydro-3-oxo-isobenzofuran-1-ylidène)bis[(6-hydroxy-5-méthyl-3,1-phénylène)bis(méthylènimino)bisacétique.

Poudre blanc-jaune ou brunâtre, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent. Le produit peut être commercialisé sous forme de sel de sodium : poudre blanc-jaune ou rose, soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Essai de sensibilité.* Dissolvez 10 mg de pourpre de phtaléine dans 1 mL d'*ammoniaque concentrée R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*. A 5 mL de la solution, ajoutez 95 mL d'*eau R*, 4 mL d'*ammoniaque concentrée R*, 50 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et 0,1 mL de *chlorure de baryum 0,1 M*. La solution est bleu violacé. Ajoutez 0,15 mL d'*édétate de sodium 0,1 M*. La solution devient incolore.

**Povidone.** *1068500.* [9003-39-8].

Voir *Povidone (0685)*.

**Procaïne (chlorhydrate de).** *1109400.*

Voir *Chlorhydrate de procaïne (0050)*.

**Proline.** $C_5H_9NO_2$. ($M_r$ 115,1). *1152200.* [147-85-3]. L-Proline. Acide (*S*)-pyrrolidine-2-carboxylique.

Poudre finement cristallisée, blanche ou sensiblement blanche, facilement soluble dans l'eau et dans les acides minéraux, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent.

$[\alpha]_D^{22}$ : – 51 à – 53, déterminé avec une solution à 50 g/L dans l'*acide chlorhydrique 1 M*.

**D-Prolyl-L-phénylalanyl-L-arginine 4-nitroanilide (dichlorhydrate de).** $C_{26}H_{36}Cl_2N_8O_5$. ($M_r$ 612). *1072800.*

**Propanol.** $C_3H_8O$. ($M_r$ 60,1). *1072000.* [71-23-8]. 1-Propanol.

Liquide limpide, incolore, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : 0,802 à 0,806.

Eb : environ 97,2 °C.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : au minimum 95 pour cent distillent de 96 °C à 99 °C.

**2-Propanol.** $C_3H_8O$. ($M_r$ 60,1). *1072100.* [67-63-0]. Alcool isopropylique.

Liquide limpide et incolore, inflammable, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,785.

Eb : 81 °C à 83 °C.

**2-Propanol R1.** *1072101.*

Satisfait aux spécifications du *2-propanol R* et aux spécifications supplémentaires suivantes :

$n_D^{20}$ : environ 1,378.

*Eau* (*2.5.12*) : au maximum 0,05 pour cent, déterminé sur 10 g de 2-propanol.

*Transmittance minimale* (*2.2.25*) déterminée en utilisant l'*eau R* comme liquide de compensation : 25 pour cent à 210 nm, 55 pour cent à 220 nm, 75 pour cent à 230 nm, 95 pour cent à 250 nm, 98 pour cent à 260 nm.

**Propétamphos.** $C_{10}H_{20}NO_4PS$. ($M_r$ 281,3). *1130900.* [31218-83-4].

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/μL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**Propidium (iodure de).** $C_{27}H_{34}I_2N_4$. ($M_r$ 668,4). *1154200.* [25535-16-4]. Diiodure de 3,8-diamino-5-[3-(diéthylméthylammonio)propyl]-6-phénylphénanthridinium.

Solide rouge foncé.

**Propionaldéhyde.** $C_3H_6O$. ($M_r$ 58,1). *1072300.* [123-38-6]. Propanal.

Liquide facilement soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,81.

$n_D^{20}$ : environ 1,365.

Eb : environ 49 °C.

F : environ – 81 °C.

**Propionique (acide).** $C_3H_6O_2$. ($M_r$ 74,1). *1072400.* [79-09-4].

Liquide huileux, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, miscible à l'eau.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,993.

$n_D^{20}$ : environ 1,387.

Eb : environ 141 °C.

F : environ – 21 °C.

**Propionique (anhydride).** $C_6H_{10}O_3$. ($M_r$ 130,1). *1072500.* [123-62-6].

Liquide limpide et incolore, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,01.

Eb : environ 167 °C.

**Réactif à l'anhydride propionique.** *1072501.*

Dissolvez 1 g d'*acide toluènesulfonique R* dans 30 mL d'*acide acétique glacial R*. Ajoutez 5 mL d'*anhydride propionique R* et laissez reposer pendant 15 min au moins avant l'emploi.

*Conservation* : pendant 24 h.

**Propyle (acétate de).** $C_5H_{10}O_2$. ($M_r$ 102,1). *1072600.* [109-60-4].

$d_{20}^{20}$ : environ 0,888.

Eb : environ 102 °C.

F : environ – 95 °C.

**Propyle (parahydroxybenzoate de).** *1072700.* [94-13-3].

Voir *Parahydroxybenzoate de propyle (0431).*

**Propylèneglycol.** *1072900.* [57-55-6].

Voir *Propylèneglycol (0430).*

**Propylène (oxyde de).** $C_3H_6O$. ($M_r$ 58,1). *1121800.* [75-56-9].

Liquide incolore, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

**Protamine (sulfate de).** *1073000.* [53597-25-4 (salmine) 9007-31-2 (clupéine)].

Voir *Sulfate de protamine (0569).*

**Protéase souche V8 de *Staphylococcus aureus*, type XVII-B.** *1115800.* [66676-43-5].

Enzyme protéolytique microbienne extracellulaire. Poudre lyophilisée contenant 500 à 1000 unités par milligramme de solide.

**Protopine (chlorhydrate de).** $C_{20}H_{20}ClNO_5$. ($M_r$ 389,8). *1163500.* [6164-47-2].

Chlorhydrate de 5-Méthyl-4,6,7,14-tétrahydrobis[1, 3]benzodioxolo[4,5-*c*:5′,6′-*g*]azécin-13(5*H*)-one.

**Ptéroïque (acide).** $C_{14}H_{12}N_6O_3$. ($M_r$ 312,3). *1144600.* [119-24-4]. Acide 4-[[(2-amino-4-oxo-1,4-dihydroptéridin-6-yl)méthyl]amino]benzoïque.

Cristaux solubles dans les solutions d'hydroxydes alcalins.

**Pulégone.** $C_{10}H_{16}O$. ($M_r$ 152,2). *1073100.* [89-82-7]. (*R*)-2-Isopropylidène-5-méthylcyclohexanone. (+)-*p*-Menth-4-én-3-one.

Liquide huileux, incolore, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{15}^{20}$ : environ 0,936.

$n_D^{20}$ : 1,485 à 1,489.

Eb : 222 °C à 224 °C.

*La pulégone utilisée en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de menthe poivrée (0405).*

*Solution à examiner.* La pulégone à examiner.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Putrescine.** $C_4H_{12}N_2$. ($M_r$ 88,15). *1137900.* [110–60–1]. 1,4-Butanediamine. Tétraméthylènediamine.

Liquide huileux incolore, à forte odeur rappelant celle de la pipéridine, très soluble dans l'eau.

Eb : environ 159 °C.

F : environ 23 °C.

**Pyridin-2-amine.** $C_5H_6N_2$. ($M_r$ 94,1). *1073400.* [504-29-0]. 2-Aminopyridine.

Grands cristaux, solubles dans l'eau, dans l'éthanol à 96 pour cent.

Eb : environ 210 °C.

F : environ 58 °C.

**Pyridine.** $C_5H_5N$. ($M_r$ 79,1). *1073200.* [110-86-1].

Liquide limpide et incolore, hygroscopique, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent.

Eb : environ 115 °C.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Pyridine anhydre.** *1073300.*

Desséchez la *pyridine R* sur du *carbonate de sodium anhydre R*. Filtrez et distillez.

*Eau* (*2.5.12*) : au maximum 0,01 pour cent *m/m*.

**Pyridinium (bromhydrate de perbromure de).** $C_5H_6Br_3N$. ($M_r$ 319,8). *1166100.* [39416-48-3]. Tribromure(1-) de pyridinium.

Cristaux rouges.

**Pyridylazonaphtol.** $C_{15}H_{11}N_3O$. ($M_r$ 249,3). *1073500.* [85-85-8]. 1-(2-Pyridylazo)-2-naphtol.

Poudre rouge brique, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, dans le méthanol et dans les solutions chaudes diluées d'hydroxydes alcalins.

F : environ 138 °C.

**Solution de pyridylazonaphtol.** *1073501.*

Solution à 1 g/L dans l'*éthanol anhydre R*.

*Essai de sensibilité.* A 50 mL d'*eau R*, ajoutez 10 mL de *solution tampon acétate pH 4,4 R*, 0,10 mL d'*édétate de sodium 0,02 M* et 0,25 mL de solution de pyridylazonaphtol. Après addition de 0,15 mL d'une solution de *sulfate de cuivre R* à 5 g/L, la coloration vire du jaune pâle au violet.

**4-(2-Pyridylazo)résorcinol (sel monosodique de).** $C_{11}H_8N_3NaO_2, H_2O$. ($M_r$ 255,2). *1131500.* [16593-81-0].

Poudre cristalline orange.

**Pyrocatéchol.** $C_6H_6O_2$. ($M_r$ 110,1). *1073600.* [120-80-9]. Benzène-1,2-diol.

Cristaux incolores ou légèrement jaunâtres, solubles dans l'eau, dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 102 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Pyrogallol.** $C_6H_6O_3$. ($M_r$ 126,1). *1073700.* [87-66-1]. Benzène-1,2,3-triol.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, devenant brunâtres par exposition à l'air et à la lumière, très solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent, peu solubles dans le disulfure de carbone. Exposées à l'air, les solutions aqueuses, et plus rapidement les solutions alcalines, deviennent brunes par absorption d'oxygène.

F : environ 131 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Solution alcaline de pyrogallol.** *1073701.*

Dissolvez 0,5 g de *pyrogallol R* dans 2 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R*. Dissolvez séparément 12 g d'*hydroxyde de potassium R* dans 8 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R*. Mélangez les 2 solutions immédiatement avant l'utilisation.

**Pyrrolidine.** $C_4H_9N$. ($M_r$ 71,12). *1165000.* [123-75-1].

*Teneur* : au minimum 99 pour cent.

Eb : 87 °C à 88 °C.

**2-Pyrrolidone.** $C_4H_7NO$. ($M_r$ 85,1). *1138000.* [616-45-5]. Pyrrolidin-2-one.

Liquide au-dessus de 25 °C, miscible à l'eau, à l'éthanol anhydre et à l'acétate d'éthyle.

$d_4^{25}$ : 1,116.

*Eau* (*2.5.12*) : au maximum 0,2 pour cent déterminé sur 2,00 g.

*Dosage*. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. Dissolvez 1,0 g de 2-pyrrolidone dans du *méthanol R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *matériau* : verre,
– *dimensions* : $l$ = 30 m ; Ø = 0,53 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (1,0 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : ajusté de façon que le temps de rétention de la 2-pyrrolidone soit d'environ 10 min.

*Rapport de division* : 1:20.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 1 | 80 |
| | 1 - 12 | 80 → 190 |
| | 12 - 32 | 190 |
| Chambre à injection | | 200 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL de solution à examiner.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent.

**Pyruvique (acide).** $C_3H_4O_3$. ($M_r$ 88,1). *1109300.* [127-17-3]. Acide 2-oxopropanoïque.

Liquide jaunâtre, miscible à l'eau et à l'éthanol anhydre.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,267.

$n_D^{20}$ : environ 1,413.

Eb : environ 165 °C.

**Quercétine dihydratée.** $C_{15}H_{10}O_7,2H_2O$. ($M_r$ 338,2). *1138100.* 2-(3,4-Dihydroxyphényl)-3,5,7-trihydroxy-4*H*-1-benzopyran-4-one.

Cristaux jaunes ou poudre jaunâtre, pratiquement insolubles dans l'eau, solubles dans l'acétone et dans le méthanol.

*Eau* (*2.5.12*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé sur 0,100 g de quercétine dihydratée.

*Dosage*. Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications données dans la monographie *Feuille de ginkgo (1828)*.

*Teneur* : au minimum 90 pour cent (substance anhydre), calculé par le procédé de normalisation.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Quercitroside.** $C_{21}H_{20}O_{11}$. ($M_r$ 448,4). *1138200.* [522-12-3]. 3-L-Rhamnopyranoside de quercétine. 3-[(6-Désoxy-α-L-mannopyranosyl)oxy]-2-(3,4-dihydroxyphényl)-5,7-dihydroxy-4*H*-1-benzopyran-4-one. Quercitrine.

Cristaux jaunes, pratiquement insolubles dans l'eau froide, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : 176 °C à 179 °C.

*Chromatographie*. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Solidage (1892)* : déposez 20 µL de la solution ; le chromatogramme présente une bande de fluorescence brun-jaune dont le $R_F$ est d'environ 0,6.

*Conservation* : à une température de 2 °C à 8 °C.

**Quinhydrone.** $C_{12}H_{10}O_4$. ($M_r$ 218,2). *1073900.* [106-34-3]. Composé équimoléculaire de 1,4-benzoquinone et d'hydroquinone.

Cristaux brillants ou poudre cristalline brillante, vert foncé, peu solubles dans l'eau, assez solubles dans l'eau chaude, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent et dans l'ammoniaque concentrée.

F : environ 170 °C.

**Quinidine.** $C_{20}H_{24}N_2O_2$. ($M_r$ 324,4). *1074000.* [56-54-2]. (*S*)-(6-Méthoxyquinol-4-yl)[(2*R*,4*S*,5*R*)-5-vinylquinuclidin-2-yl]méthanol.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, très peu solubles dans l'eau, assez solubles dans l'éthanol à 96 pour cent, peu solubles dans le méthanol.

$[\alpha]_D^{20}$ : environ + 260, déterminé avec une solution à 10 g/L dans l'*éthanol anhydre R*.

F : environ 172 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Quinidine (sulfate de).** *1109500.* [6591-63-5].

Voir *Sulfate de quinidine (0017).*

**Quinine.** $C_{20}H_{24}N_2O_2$. ($M_r$ 324,4). *1074100.* [130-95-0]. (*R*)-(6-Méthoxyquinol-4-yl)[(2*S*,4*S*,5*R*)-5-vinylquinuclidin-2-yl]méthanol.

Poudre microcristalline, blanche ou sensiblement blanche, très peu soluble dans l'eau, peu soluble dans l'eau bouillante, très soluble dans l'éthanol anhydre.

$[\alpha]_D^{20}$ : environ – 167, déterminé avec une solution à 10 g/L dans l'*éthanol anhydre R*.

F : environ 175 °C.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Quinine (chlorhydrate de).** *1074200.* [6119-47-7].

Voir *Chlorhydrate de quinine (0018).*

**Quinine (sulfate de).** *1074300.* [6119-70-6].

Voir *Sulfate de quinine (0019).*

**Raclopride (tartrate de).** $C_{19}H_{26}Cl_2N_2O_9$. ($M_r$ 497,3). *1144700.* [98185-20-7]. L-Tartrate de raclopride.

Masse blanche ou sensiblement blanche, sensible à la lumière, soluble dans l'eau.

$[\alpha]_D^{25}$ : + 0,3, déterminé avec une solution à 3 g/L.

F : environ 141 °C.

**Réactif électrolytique pour microdosage de l'eau.** *1113700.*

Réactif anhydre disponible dans le commerce ou combinaison de réactifs anhydres pour le titrage coulométrique de l'eau, contenant des bases organiques appropriées, du dioxyde de soufre et des iodures dissous dans un solvant approprié.

**Résine à exclusion d'ions pour chromatographie.** *1131000.*

Résine à groupes sulfoniques fixés sur une matrice polymérique constituée de polystyrène réticulé de divinylbenzène.

**Résine cationique faible.** *1096000.*

Résine polyméthacrylique, faiblement acide, à groupes échangeurs carboxyles, présentée sous sa forme protonée.

*Granulométrie* : 75 µm à 160 µm.

*Limites du pH d'utilisation* : 5 à 14.

*Température maximale d'utilisation* : 120 °C.

**Résine d'extraction sélective du strontium.** *1167100.*

Résine disponible dans le commerce préparée en chargeant une suspension de 4,4′(5′)-di-*tert*-butylcyclohexano-18-couronne-6 (éther couronne) dans de l'octanol sur un support chromatographique inerte. La masse volumique du lit de la résine est d'environ 0,35 g/mL.

**Résine échangeuse d'anions.** *1007200.*

Résine échangeuse sous forme chlorée d'anions à groupes ammonium quaternaire [$CH_2N^+(CH_3)_3$] fixés sur une matrice polymérique constituée de polystyrène réticulé à 2 pour cent de divinylbenzène. Elle se présente sous forme de billes sphériques et la taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où la résine est utilisée. Lavez la résine sur un filtre de verre fritté (40) (*2.1.2*) traité avec de l'*hydroxyde de sodium 1 M* jusqu'à disparition de toute trace de chlorures dans l'éluat, puis lavez avec de l'*eau R* jusqu'à neutralité. La résine est mise en suspension dans de l'*eau exempte d'ammonium R* récemment préparée et elle est conservée à l'abri du dioxyde de carbone de l'air.

**Résine échangeuse d'anions R1.** *1123400.*

Résine contenant des groupes ammonium quaternaire [$CH_2N^+(CH_3)_3$] fixée sur une matrice constituée de méthacrylate.

**Résine échangeuse d'anions R2.** *1141900.*

Combinaison de particules homogènes de polyéther hydrophile (10 µm) et d'un sel d'ammonium quaternaire, formant une matrice appropriée à la chromatographie des protéines sur résine échangeuse d'anions forts.

**Résine échangeuse d'anions faible.** *1146700.*

Résine à groupes diéthylaminoéthyle fixés sur une matrice hydrophile constituée de poly(méthacrylate de méthyle).

**Résine échangeuse d'anions fortement basique.** *1026600.*

Résine type gel, sous forme hydroxyde contenant des groupes ammonium quaternaire [$CH_2N^+(CH_3)_3$, type 1], fixés sur une matrice polymère de polystyrène réticulé à 8 pour cent de divinylbenzène.

Perles brunes, transparentes.

*Granulométrie* : 0,2 mm à 1,0 mm.

*Eau* : environ 50 pour cent.

*Capacité totale d'échange* : au minimum 1,2 meq/mL.

**Résine échangeuse d'anions fortement basique pour chromatographie.** *1112700.*

Résine échangeuse à groupes ammonium quaternaire fixés sur une matrice constituée de latex réticulé de divinylbenzène.

**Résine échangeuse de cations.** *1016700.*

Résine échangeuse de cations sous forme protonée à groupes sulfoniques fixés sur une matrice polymérique constituée de polystyrène réticulé à 8 pour cent de divinylbenzène. Elle se présente sous forme de billes sphériques et la taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où la résine est utilisée.

**Résine échangeuse de cations R1.** *1121900.*

Résine échangeuse de cations sous forme protonée, à groupes sulfoniques fixés sur une matrice polymérique constituée de polystyrène réticulé à 4 pour cent de divinylbenzène. Elle se présente sous forme de billes sphériques et la taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où la résine est utilisée.

**Résine échangeuse de cations forte.** *1156800.*

Résine échangeuse de cations, forte, sous forme protonée, à groupements sulfoniques fixés à une matrice polymèrique constituée de polystyrène réticulé avec du divinylbenzène. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où la résine est utilisée.

**Résine échangeuse de cations, forte, sous forme calcique.** *1104600.*

Résine présentée sous forme calcique, avec des groupes sulfoniques fixés sur une structure polymérique consistuée de polystyrène réticulé à 8 pour cent de divinylbenzène. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où la résine est utilisée.

**Résine échangeuse de cations, forte, sous forme sodique.** *1176100.*

Résine échangeuse de cations, forte, sous forme sodique, à groupements sulfoniques fixés à une matrice polymèrique constituée de polystyrène réticulé avec du divinylbenzène. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où la résine est utilisée.

**Résine échangeuse d'ions fortement acide.** *1085400.*

Résine sous forme protonée à groupes sulfoniques fixés sur une matrice de polystyrène réticulé à 8 pour cent de divinylbenzène. Elle se présente sous forme de billes sphériques ; sauf indication contraire, la taille des particules est de 0,3 mm à 1,2 mm.

*Capacité* : 4,5 mmol à 5 mmol par gramme, avec une eau de 50 pour cent à 60 pour cent.

*Préparation de la colonne.* Sauf indication contraire, utilisez un tube muni d'un disque de verre fritté incorporé par fusion, d'une longueur de 400 mm, d'un diamètre intérieur de 20 mm et d'une hauteur de remplissage de 200 mm environ. Introduisez la résine en la mélangeant avec de l'*eau R* et en versant la pâte obtenue dans le tube en évitant la présence de bulles d'air entre les particules. Le niveau du liquide utilisé ne doit pas tomber en-dessous du niveau de la résine.

Si la résine est sous sa forme protonée, elle doit être lavée avec de l'*eau R* jusqu'à ce que la neutralisation de 50 mL de l'éluat en présence de 0,1 mL de *solution de méthylorange R* ne nécessite pas plus de 0,05 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M.* Si la résine est sous sa forme sodique ou si elle nécessite une régénération, passez lentement environ 100 mL d'*acide chlorhydrique R1* dilué de moitié à travers la colonne et lavez celle-ci avec de l'*eau R* ainsi que décrit plus haut.

**Résine pour chromatographie ionique en phase inversée.** *1131100.*

Résine neutre, macroporeuse, à haute surface spécifique, de caractère non polaire, constituée d'une matrice polymérique de polystyrène réticulé de divinylbenzène.

**Résorcinol.** *1074800.* [108-46-3].

Voir *Résorcinol (0290).*

**Réactif au résorcinol.** *1074801.*

A 80 mL d'*acide chlorhydrique R1*, ajoutez 10 mL d'une solution de *résorcinol R* à 20 g/L et 0,25 mL d'une solution de *sulfate de cuivre R* à 25 g/L, puis complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Préparez la solution 4 h au moins avant l'emploi.

*Conservation* : à une température de 2 °C à 8 °C, pendant 1 semaine.

**Rhamnose.** $C_6H_{12}O_5,H_2O$. ($M_r$ 182,2). *1074900.* [6155-35-7].

L-(+)-Rhamnose. 6-Désoxy-L-mannose.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, facilement soluble dans l'eau.

$[\alpha]_D^{20}$ : + 7,8 à + 8,3 déterminé avec une solution à 50 g/L dans l'*eau R* contenant environ 0,05 pour cent de $NH_3$.

**Rhaponticoside.** $C_{21}H_{24}O_9$. ($M_r$ 420,4). *1075000.* [155-58-8]. β-D-glucopyranoside de 3-hydroxy-5-[2-(3-hydroxy-4-methoxyphényl)éthényl]phényl.

Poudre cristalline, gris-jaune, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans le méthanol.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Rhubarbe (0291)* ; le chromatogramme présente une seule tache principale.

**Rhodamine B.** $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$. ($M_r$ 479,0). *1075100.* [81-88-9].

Schultz No. 864.

Colour Index No. 45170.
Chlorure de [9-(2-carboxyphényl)-6-(diéthylamino)-3*H*-xanthén-3-ylidène]diéthylammonium.

Cristaux verts ou poudre rouge-violet, très solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Rhodamine 6 G.** $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$. ($M_r$ 479,0). *1153300.* [989-38-8].

Colour Index No. 45160.
Chlorure de 9-[2-(éthoxycarbonyl)phényl]-3,6-bis(éthylamino)-2,7-diméthylxanthénylium.

Poudre rouge-brun.

**Ribose.** $C_5H_{10}O_5$. ($M_r$ 150,1). *1109600.* [50-69-1]. D-Ribose.

Soluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : 88 °C à 92 °C.

**Ricinoléique (acide).** $C_{18}H_{34}O_3$. ($M_r$ 298,5). *1100100.* [141-22-0]. Acide 12-hydroxyoléique.

Liquide visqueux jaune ou brun-jaune, constitué d'un mélange d'acides gras obtenu par hydrolyse de l'huile de ricin, pratiquement insoluble dans l'eau, très soluble dans l'éthanol anhydre.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,942.

$n_D^{20}$ : environ 1,472.

F : environ 285 °C, avec décomposition.

**Rosmarinique (acide).** $C_{18}H_{16}O_8$. ($M_r$ 360,3). *1138300.* [20283-92-5].

F : 170 °C à 174 °C.

**Rouge Congo.** $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$. ($M_r$ 697). *1022000.* [573-58-0].

Schultz No. 360.

Colour Index No. 22120.
(Biphényl-4,4′-diyl-bis-2,2′-azo)di(1-aminonaphtalène-4-sulfonate) disodique.

Poudre rouge-brun, soluble dans l'eau.

**Papier au rouge Congo.** *1022002.*

Plongez des bandelettes de papier filtre dans la *solution de rouge Congo R*. Maintenez-les immergées pendant quelques minutes, puis laissez sécher.

**Solution de rouge Congo.** *1022001.*

Dissolvez 0,1 g de *rouge Congo R* dans un mélange de 20 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et d'*eau R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

*Essai de sensibilité.* A 0,2 mL de solution de rouge Congo, ajoutez 100 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R* et 0,3 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M*. La solution est bleue. Le virage au rose de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,3 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M*.

*Zone de virage* : pH 3,0 (bleu) à pH 5,0 (rose).

**Rouge de crésol.** $C_{21}H_{18}O_5S$. ($M_r$ 382,4). *1022800.* [1733-12-6]. Crésolsulfonephtaléine. 4,4′-(3*H*-2,1-Benzoxathiol-3-ylidène)di(2-méthylphénol) *S,S*-dioxyde.

Poudre cristalline brun-rouge, peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins.

**Solution de rouge de crésol.** *1022801.*

Dissolvez 0,1 g de *rouge de crésol R* dans un mélange de 2,65 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* et de 20 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

*Essai de sensibilité.* A 0,1 mL de solution de rouge de crésol, ajoutez 100 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R* et 0,15 mL d'*hydroxyde de sodium 0,02 M*. La solution est rouge pourpre. Le virage au jaune de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,15 mL d'*acide chlorhydrique 0,02 M*.

*Zone de virage* : pH 7,0 (jaune) à pH 8,6 (rouge).

**Rouge de méthyle.** $C_{15}H_{15}N_3O_2$. ($M_r$ 269,3). *1055100.* [493-52-7].

Schultz No. 250.

Colour Index No. 13020.
Acide 2-(4-diméthylaminophénylazo)benzoïque.

Poudre rouge foncé ou cristaux violets, pratiquement insolubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Indicateur mixte au rouge de méthyle.** *1055101.*

Dissolvez 0,1 g de *rouge de méthyle R* et 50 mg de *bleu de méthylène R* dans 100 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*.

*Zone de virage* : pH 5,2 (rouge-violet) à pH 5,6 (vert).

**Solution de rouge de méthyle.** *1055102.*

Dissolvez 50 mg de *rouge de méthyle R* dans un mélange de 1,86 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* et de 50 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

*Essai de sensibilité.* A 0,1 mL de solution de rouge de méthyle, ajoutez 100 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R* et 0,05 mL d'*acide chlorhydrique 0,02 M*. La solution est rouge. Le virage au jaune de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,1 mL d'*hydroxyde de sodium 0,02 M*.

*Zone de virage* : pH 4,4 (rouge) à pH 6,0 (jaune).

**Rouge de phénol.** *1063600.* [143-74-8].

Poudre cristalline, rouge vif à rouge foncé, très peu soluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution de rouge de phénol.** *1063601.*

Dissolvez 0,1 g de *rouge de phénol R* dans un mélange de 2,82 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* et de 20 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

*Essai de sensibilité.* A 0,1 mL de solution de rouge de phénol, ajoutez 100 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R*. La solution est jaune. Le virage au rouge-violet de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,1 mL d'*hydroxyde de sodium 0,02 M*.

*Zone de virage* : pH 6,8 (jaune) à pH 8,4 (rouge-violet).

**Solution de rouge de phénol R2.** *1063603.*

*Solution A.* Dissolvez 33 mg de *rouge de phénol R* dans 1,5 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

*Solution B.* Dissolvez 25 mg de *sulfate d'ammonium R* dans 235 mL d'*eau R* ; ajoutez 105 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* et 135 mL d'*acide acétique dilué R*.

Ajoutez 25 mL de solution A à la solution B. Si nécessaire, ajustez le pH du mélange à 4,7.

**Solution de rouge de phénol R3.** *1063604.*

*Solution A.* Dissolvez 33 mg de *rouge de phénol R* dans 1,5 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* et complétez à 50 mL avec de l'*eau R*.

*Solution B.* Dissolvez 50 mg de *sulfate d'ammonium R* dans 235 mL d'*eau R*, ajoutez 105 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* et 135 mL d'*acide acétique dilué R*.

Ajoutez 25 mL de solution A à la solution B. Si nécessaire, ajustez le pH du mélange à 4,7.

**Rouge de quinaldine.** $C_{21}H_{23}IN_2$. ($M_r$ 430,3). *1073800.* [117-92-0]. Iodure de 2-[2-[4-(diméthylamino)phényl]éthényl]-1-éthylquinolinium.

Poudre bleu-noir foncé, assez soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution de rouge de quinaldine.** *1073801.*

Dissolvez 0,1 g de *rouge de quinaldine R* dans du *méthanol R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

*Zone de virage* : pH 1,4 (incolore) à pH 3,2 (rouge).

**Rouge de ruthénium.** $[(NH_3)_5RuORu(NH_3)_4ORu(NH_3)_5]Cl_6$, $4H_2O$. ($M_r$ 858). *1075200.* [11103-72-3].

Poudre rouge-brun, soluble dans l'eau.

**Solution de rouge de ruthénium.** *1075201.*

Solution à 0,8 g/L dans la solution d'*acétate de plomb R*.

**Rouge solide B (sel de).** $C_{17}H_{13}N_3O_9S_2$. ($M_r$ 467,4). *1037500.* [56315-29-8].

Schultz No. 155.

Colour Index No. 37125.
Naphtalène-1,5-disulfonate acide de 2-méthoxy-4-nitrobenzènediazonium.

Poudre jaune-orange, soluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche, à l'abri de la lumière et à une température de 2 °C à 8 °C.

**Rouge Soudan G.** $C_{17}H_{14}N_2O_2$. ($M_r$ 278,3). *1085800.*

Schultz No. 149.

Colour Index No. 12150.
Rouge solvant 1. 1-[(2-Méthoxyphényl)azo]naphtalén-2-ol.

Poudre brun-rouge, pratiquement insoluble dans l'eau.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) en utilisant une plaque recouverte d'une couche de *gel de silice G R* : déposez 10 µL d'une solution de rouge Soudan G à 0,1 g/L dans du *chlorure de méthylène R* et développez sur un parcours de 10 cm avec le même solvant ; le chromatogramme présente une seule tache principale.

**Rutine.** $C_{27}H_{30}O_{16}$,$3H_2O$. ($M_r$ 665). *1075300.* [153-18-4]. Rutoside. 3-(*O*-6-Désoxy-α-L-mannopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyloxy)-2-(3,4-dihydroxyphényl)-5,7-dihydroxy-4*H*-chromén-4-one.

Poudre cristalline jaune, brunissant à la lumière, très peu soluble dans l'eau, soluble dans environ 400 parties d'eau bouillante, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, soluble dans des solutions d'hydroxydes alcalins et dans l'ammoniaque.

F : environ 210 °C, avec décomposition.

*Absorbance* (*2.2.25*). Une solution dans l'*éthanol à 96 pour cent R* présente 2 maximums d'absorption à 259 nm et à 362 nm.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Sabinène.** $C_{10}H_{16}$. ($M_r$ 136,2). *1109700.* [3387-41-5]. Thuy-4(10)-ène. 4-Méthylène-1-isopropylbicyclo[3.1.0]hexane.

Liquide huileux, incolore.

*Le sabinène utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de fleur d'oranger amer (1175).*

*Solution à examiner.* Le sabinène à examiner.

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Sable.** *1075800.*

Grains de silice blancs ou légèrement grisâtres dont la taille moyenne est de 150 µm à 300 µm.

**Saccharine sodique.** *1131400.* [128-44-9].

Voir *Saccharine sodique (0787).*

**Saccharose.** *1085700.* [57-50-1].

Voir *Saccharose (0204).*

**Safrole.** $C_{10}H_{10}O_2$. ($M_r$ 162,2). *1131200.* [94-59-7]. 5-(Prop-2-ényl)-1,3-benzodioxole. 4-Allyl-1,2-(méthylènedioxy)benzène.

Liquide huileux, incolore ou légèrement jaune, à odeur de sassafras, insoluble dans l'eau, très soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, miscible à l'hexane.

$d_{20}^{20}$ : 1,095 à 1,096.

$n_D^{20}$ : 1,537 à 1,538.

Eb : 232 °C à 234 °C.

*Point de solidification* : environ 11 °C.

*Le safrole utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de cannelle dite de Ceylan (1501).*

*Teneur* : au minimum 96,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Salicine.** $C_{13}H_{18}O_7$. ($M_r$ 286,3). *1131300.* [138-52-3].

2-(Hydroxyméthyl)phényl-β-D-glucopyranoside. Salicoside.

$[\alpha]_D^{20}$ : – 62,5 ± 2.

F : 199 °C à 201 °C.

*Dosage.* Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications données dans la monographie *Ecorce de saule (1583)* à la concentration de la solution témoin.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Salicylaldéhyde.** $C_7H_6O_2$. ($M_r$ 122,1). *1075400.* [90-02-8]. 2-Hydroxybenzaldéhyde.

Liquide huileux, limpide, incolore.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,167.

$n_D^{20}$ : environ 1,574.

Eb : environ 196 °C.

F : environ – 7 °C.

**Salicylaldéhyde-azine.** $C_{14}H_{12}N_2O_2$. ($M_r$ 240,3). *1075500.* [959-36-4]. 2,2′-Azinodiméthyldiphénol.

F : environ 213 °C.

Dissolvez 0,30 g de *sulfate d'hydrazine R* dans 5 mL d'*eau R*, ajoutez 1 mL d'*acide acétique glacial R* et 2 mL d'une solution récemment préparée de *salicylaldéhyde R* à 20 pour cent *V/V* dans le *2-propanol R*. Mélangez, puis laissez reposer jusqu'à ce qu'il se forme un précipité jaune. Agitez avec 2 fois 15 mL de *chlorure de méthylène R*. Réunissez les couches organiques et desséchez-les sur du *sulfate de sodium anhydre R*. Laissez décanter ou filtrez la solution et évaporez à siccité. Faites recristalliser à partir d'un mélange de 40 volumes de *méthanol R* et de 60 volumes de *toluène R*, en refroidissant. Desséchez les cristaux sous vide.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans l'essai de l'hydrazine de la monographie *Povidone (0685)* ; le chromatogramme présente une seule tache principale.

**Salicylique (acide).** *1075600.* [69-72-7].

Voir *Acide salicylique (0366).*

**Schisandrine.** $C_{24}H_{32}O_7$. ($M_r$ 432,5). *1173800.* [7432-28-2]. Schisandrol A. Wuweizichun A. (6*S*,7*S*,12a*R*$_a$)-5,6,7,8-Tétrahydro-1,2,3,10,11,12-hexaméthoxy-6,7-diméthyldibenzo[*a*,*c*]cyclooctan-6-ol.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche.

La schisandrine utilisée dans le dosage de la monographie *Fruit de schisandra de Chine (2428)* satisfait également aux conditions suivantes.

4. Réactifs

*Dosage*. Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications données dans la monographie *Fruit de schisandra de Chine (2428).*

*Teneur* : au minimum 95 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

*Conservation* : en récipient étanche, à une température inférieure ou égale à – 20 °C.

**γ-Schisandrine.** $C_{23}H_{28}O_6$. ($M_r$ 400,5). *1173900.* [61281-37-6]. Schisandrine B. Wuweizisu B. *rac*-(6*R*,7*S*,13a*R*$_a$)-1,2,3, 13-Tetraméthoxy-6,7-diméthyl-5,6,7,8-tétrahydrobenzo[3, 4]cycloocta[1,2-*f*][1,3]benzodioxole.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche.

*Conservation* : en récipient étanche, à une température inférieure ou égale à – 20 °C.

**Sclaréol.** $C_{20}H_{36}O_2$. ($M_r$ 308,5). *1139900.* [515-03-7]. (1*R*,2*R*,4a*S*,8a*S*)-1-[(3*R*)-3-Hydroxy-3-méthylpent-4-ényl]-2,5,5,8a-tétraméthyldécahydronaphtalén-2-ol.

Cristaux inodores.

$[\alpha]_D^{20}$ : 6,7, déterminé avec une solution dans l'éthanol anhydre.

$Eb_{19\ mm}$ : 218 °C à 220 °C.

F : 96 °C à 98 °C.

*Le sclaréol utilisé dans l'essai du profil chromatographique de la monographie Huile essentielle de sauge sclarée (1850) satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage*. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de sauge sclarée (1850).*

*Teneur* : au minimum 97 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Scopolamine (bromhydrate de).** *1044800.* [6533-68-2].

Voir *Bromhydrate de scopolamine (0106).*

**Scopolétine.** $C_{10}H_8O_4$. ($M_r$ 192,2). *1158700.* [92-61-5]. 7-Hydroxy-6-méthoxy-2*H*-1-benzopyran-2-one. 7-Hydroxy-6-méthoxycoumarine.

Cristaux fins, légèrement beiges.

F : 202 °C à 208 °C.

**SDS-PAGE (tampon concentré pour échantillons).** *1115000.*

Voir *Tampon concentré pour échantillons SDS-PAGE R.*

**SDS-PAGE (tampon concentré pour échantillons sous conditions réductrices).** *1122100.*

Voir *Tampon concentré pour échantillons SDS-PAGE sous conditions réductrices R.*

**SDS-PAGE (tampon d'électrophorèse).** *1114900.*

Voir *Tampon d'électrophorèse SDS-PAGE R.*

**Sélénieux (acide).** $H_2SeO_3$. ($M_r$ 129,0). *1100200.* [7783-00-8].

Cristaux déliquescents, facilement solubles dans l'eau.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Sélénium.** Se. ($A_r$ 79,0). *1075900.* [7782-49-2].

Poudre ou granulés de coloration brun-rouge ou noir, pratiquement insolubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent, solubles dans l'acide nitrique.

F : environ 220 °C.

**Sérine.** *1076000.* [56-45-1].

Voir *Sérine (0788).*

**Sialique (acide).** *1001100.* [131-48-6].

Voir *Acide N-acétylneuraminique R.*

**Silibinine.** $C_{25}H_{22}O_{10}$. ($M_r$ 482,4). *1151400.* [22888-70-6]. Silybine. (2*R*,3*R*)-3,5,7-Trihydroxy-2-[(2*R*,3*R*)-3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-2-(hydroxyméthyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl]-2,3-dihydro-4*H*-1-benzopyran-4-one.

Poudre jaune ou blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'acétone et dans le méthanol.

*La silibinine utilisée dans le dosage du Chardon marie (1860) satisfait également à l'essai suivant.*

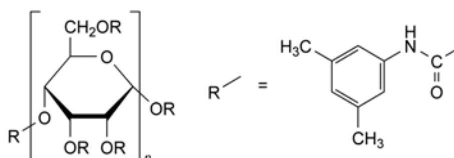
*Dosage*. Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications données dans la monographie *Chardon marie (1860).*

*Solution à examiner*. Dissolvez 5,0 mg de silibinine, préalablement desséchée sous vide dans du *méthanol R* et complétez à 50,0 mL avec le même solvant.

*Teneur en silibinine A et silibinine B* : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Silice (gel de) AD pour séparation des composés chiraux.** *1171700.*

Gel de silice pour chromatographie de granulométrie très fine (5 µm) recouvert du dérivé suivant :




**Silice (gel de) à éther-couronne pour chromatographie R.** *1178000.*

Gel de silice recouvert d'éther-couronne.

**Silice (gel de) AGP pour séparation des composés chiraux.** *1148700.*

Gel de silice pour chromatographie de granulométrie très fine, constitué de particules sphériques et recouvert d' α1-glycoprotéine acide. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**Silice (gel de) alkylé postgreffé pour chromatographie à utiliser avec des phases mobiles fortement aqueuses.** *1176900.*

Gel de silice de granulométrie très fine, sur lequel ont été greffés des groupes alkyle, dont l'emploi est indiqué avec les phases mobiles fortement aqueuses. Afin de réduire à un minimum toute interaction avec des composés basiques, il est soigneusement postgreffé en couvrant la plupart des groupes silanol restants. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**Silice (gel de) alkylé pour chromatographie à utiliser avec des phases mobiles fortement aqueuses.** *1160200.*

Gel de silice de granulométrie très fine, sur lequel ont été greffés des groupes alkyle, dont l'emploi est indiqué avec les phases mobiles fortement aqueuses.

**Silice (gel de) amidohexadécylsilylé pour chromatographie.** *1170400.*

Gel de silice de granulométrie très fine, chimiquement modifié par greffage en surface de groupes amidohexadécylsilylés. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**Silice (gel de) aminohexadécylsilylé pour chromatographie.** *1138400.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes aminohexadécylsilylés. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

4. Réactifs

**Silice (gel de) aminopropylméthylsilylé pour chromatographie.** *1102400.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes aminopropylméthylsilylés. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) aminopropylsilylé pour chromatographie.** *1077000.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes aminopropylsilylés. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) amylosé pour chromatographie.** *1109800.*

Gel de silice de granulométrie très fine (10 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes amylose. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) anhydre.** *1076100.* [112926-00-8].

Forme partiellement déshydratée d'acide silicique polymérisé amorphe, possédant à 20 °C une capacité d'absorption d'eau d'environ 30 pour cent de sa masse. Il est pratiquement insoluble dans l'eau, partiellement soluble dans les solutions d'hydroxyde de sodium. Il contient un indicateur coloré approprié pemettant de détecter l'état d'hydratation ; le changement de coloration qui correspond au passage de la forme hydratée à la forme anhydre est indiqué sur l'étiquette.

**Silice (gel de) BC pour séparation des composés chiraux.** *1161300.*

Gel de silice pour chromatographie de granulométrie très fine (5 µm) et recouvert de β-cyclodextrine. Une meilleure sélectivité peut être obtenue par dérivation de la cyclodextrine par l'oxyde de propylène.

**Silice (gel de) butylsilylé postgreffé pour chromatographie.** *1170500.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes butylsilylés. Afin de réduire à un minimum toute interaction avec des composés basiques, il est soigneusement postgreffé en couvrant la plupart des groupes silanol restants. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) butylsilylé pour chromatographie.** *1076200.*

Gel de silice, de granulométrie très fine (3-10 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes butylsilylés. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Silice sphéroïdale* : 30 nm.

*Volume de pore* : 0,6 $cm^3$/g.

*Surface spécifique* : 80 $m^2$/g.

**Silice (gel de) cyanosilylé pour chromatographie.** *1109900.*

Gel de silice, de granulométrie très fine, chimiquement modifié par greffage en surface de groupes cyanosilylés. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) diisobutyloctadécylsilylé pour chromatographie.** *1140000.*

Gel de silice de granulométrie très fine, chimiquement modifié par greffage en surface de groupes diisobutyloctadécylsilylés. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**Silice (gel de) diisopropylcyanopropylsilylé pour chromatographie.** *1168100.*

Gel de silice de granulométrie très fine, chimiquement modifiée par greffage en surface de groupes diisopropylcyanopropylsilylés. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**Silice (gel de) diméthyloctadécylsilylé pour chromatographie.** *1115100.*

Gel de silice, de granulométrie très fine (3-10 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes diméthyloctadécylsilyle. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent. Particules irrégulières.

*Surface spécifique* : 300 $m^2$/g.

**Silice (gel de) diol pour chromatographie.** *1110000.*

Particules sphériques de gel de silice sur lesquelles sont greffés des groupes dihydroxypropyle.

Diamètre des pores : 10 nm.

**Silice (gel de) échangeur d'anions forts pour chromatographie.** *1077800.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes ammonium quaternaire. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

Les limites du pH d'utilisation sont de 2 à 8.

**Silice (gel de) échangeur de cations forts pour chromatographie.** *1161400.*

Gel de silice de granulométrie très fine (5-10 µm) chimiquement modifié par greffage en surface de groupes acide sulfonique. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**Silice (gel de) G.** *1076300.* [112926-00-8].

Contient environ 13 pour cent de sulfate de calcium hémihydraté.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine et homogène. La taille moyenne des particules est d'environ 15 µm.

*Teneur en plâtre.* Dans un récipient à bouchon rodé, introduisez 0,25 g de gel de silice G, ajoutez 3 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et 100 mL d'*eau R*, puis agitez énergiquement pendant 30 min. Filtrez sur verre fritté (*2.1.2*) et lavez le résidu. Réunissez le filtrat et les eaux de lavage. Effectuez le dosage du calcium par complexométrie (*2.5.11*).

1 mL d'*édétate de sodium 0,1 M* correspond à 14,51 mg de $CaSO_4,{}^1/_2H_2O$.

4. Réactifs

*pH* (*2.2.3*). Agitez 1 g de gel de silice G avec 10 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R* pendant 5 min. Le pH de la suspension est environ de 7.

**Silice (gel de) $GF_{254}$.** *1076400.* [112926-00-8].

Contient environ 13 pour cent de sulfate de calcium hémihydraté et environ 1,5 pour cent d'un indicateur de fluorescence dont l'intensité est optimale en lumière ultraviolette à 254 nm.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine et homogène. La taille moyenne des particules est d'environ 15 µm.

*Teneur en plâtre.* Voir *Silice (gel de) G R.*

*pH.* Voir *Silice (gel de) G R.*

*Fluorescence.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) en utilisant une plaque recouverte de gel de silice $GF_{254}$ : déposez sur les points de départ des volumes croissants de 1 µL à 10 µL d'une solution d'*acide benzoïque R* à 1 g/L dans un mélange de 10 volumes d'*acide formique anhydre R* et de 90 volumes de *2-propanol R*. Développez sur un parcours de 10 cm avec le même mélange de solvants. Laissez évaporer les solvants. Examinez en lumière ultraviolette à 254 nm. Pour des dépôts égaux ou supérieurs à 2 µg, l'acide benzoïque forme dans le tiers supérieur du chromatogramme des taches sombres sur fond fluorescent.

4. Réactifs

**Silice (gel de) H.** *1076500.* [112926-00-8].

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine et homogène. La taille moyenne des particules est d'environ 15 µm.

*pH.* Voir *Silice (gel de) G R.*

**Silice (gel de) hexadécylamidylsilylé postgreffé pour chromatographie.** *1172400.*

Gel de silice de granulométrie très fine (5 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes hexadécylcarboxamidopropyldiméthylsilylés. Afin de réduire à un minimum toute interaction avec des composés basiques, il est soigneusement postgreffé en couvrant la plupart des groupes silanol restants.

**Silice (gel de) hexadécylamidylsilylé pour chromatographie.** *1162500.*

Gel de silice de granulométrie très fine (5 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes hexadécylcarboxamidopropyldiméthylsilylés.

**Silice (gel de) hexylsilylé postgreffé pour chromatographie.** *1174400.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm) chimiquement modifié par greffage en surface de groupes hexylsilylés. Afin de réduire à un minimum toute interaction avec des composés basiques, il est soigneusement postgreffé en couvrant la plupart des groupes silanol restants. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine et homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) hexylsilylé pour chromatographie.** *1077100.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm) chimiquement modifié par greffage en surface de groupes hexylsilylés. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine et homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) $HF_{254}$.** *1076700.*

Contient environ 1,5 pour cent d'un indicateur de fluorescence dont l'intensité est optimale en lumière ultraviolette à 254 nm.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine et homogène. La taille moyenne des particules est d'environ 15 µm.

*pH.* Voir *Silice (gel de) G R.*

*Fluorescence.* Voir *Silice (gel de) $GF_{254}$ R.*

**Silice (gel de) hydrophile pour chromatographie.** *1077200.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm) et dont la surface a été traitée afin de la rendre hydrophile. La taille des particules peut être indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**Silice (gel de) monolithique octadécylsilylé pour chromatographie.** *1154500.*

Tiges monolithiques de silice exempte de métaux, de porosité élevée (supérieure à 80 pour cent), possédant une structure bimodale des pores, modifiées en surface par greffage de groupes octadécylsilylés.

**Silice (gel de) nitrilé postgreffé pour chromatographie.** *1174500.*

Gel de silice, de granulométrie très fine, chimiquement modifié par greffage en surface de groupes cyanopropylsilyle. Afin de réduire à un minimum toute interaction avec des composés basiques, il est soigneusement postgreffé en couvrant la plupart des groupes silanol restants. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol anhydre.

**Silice (gel de) nitrilé pour chromatographie.** *1077300.*

Gel de silice, de granulométrie très fine, chimiquement modifié par greffage en surface de groupes cyanopropylsilyle. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) nitrilé pour chromatographie R1.** *1077400.*

Gel de silice, de granulométrie très fine, constitué de particules poreuses, sphériques, comportant des groupes nitrile chimiquement liés. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

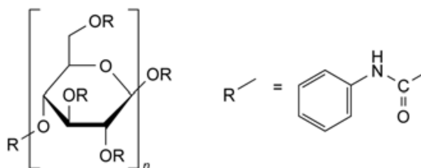
**Silice (gel de) nitrilé pour chromatographie R2.** *1119500.*

Gel de silice ultrapure, chimiquement modifié par greffage en surface de groupes cyanopropylsilylés. Il contient moins de 20 ppm de métaux. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) OC pour séparation des composés chiraux.** *1146800.*

Gel de silice pour chromatographie, de granulométrie très fine (5 µm), recouvert du dérivé suivant :




**Silice (gel de) octadécanoylaminopropylsilylé pour chromatographie.** *1115200.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes aminopropylsilylés qui sont acylés avec des groupes octadécanoylés. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie.** *1115400.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes octadécylsilylés. Afin de réduire à un minimum toute interaction avec des composés basiques, il est soigneusement postgreffé en couvrant la plupart des groupes silanol restants. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche,fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie R1.** *1115401.*

Gel de silice ultra pure de granulométrie très fine (diamètre de pores de 10 nm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes octadécylsilylés (taux de carbone de 19 pour cent). Afin de réduire à un minimum toute interaction avec des composés basiques, il est soigneusement postgreffé de façon à couvrir la plupart des groupes silanol restants. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé. Il contient moins de 20 ppm de métaux.

**Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie.** *1077500.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes octadécylsilylés La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie R1.** *1110100.*

Gel de silice ultra pure, de granulométrie très fine chimiquement modifié par greffage en surface de groupes octadécylsilylés. La taille des particules, le diamètre des pores et le taux de carbone sont indiqués après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé. Il contient moins de 20 ppm de métaux.

**Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie R2.** *1115300.*

Gel de silice ultra pure, de granulométrie très fine (diamètre de pores de 15 nm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes octadécylsilylés (20 pour cent de carbone) et optimisé pour l'analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie, à groupements polaires incorporés, postgreffé.** *1165100.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm). Les particules sont constituées de silice chimiquement modifiée avec un réactif permettant l'obtention de chaînes contenant des groupes polaires incorporés et des groupes octadécyles terminaux. De plus, le support est postgreffé. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine et homogène.

**Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie, à groupements polaires intercalés, postgreffé.** *1177900.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm). Les particules sont constituées d'un mélange de silice chimiquement modifié par greffage en surface de groupes octadécylsilylés et de silice chimiquement modifiée avec un réactif permettant l'obtention de chaînes contenant des groupes polaires intercalés. De plus, le support est postgreffé. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé par traitement basique.** *1077600.*

Voir *Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases R.*

**Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé par traitement basique, postgreffé.** *1108600.*

Voir *Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases, postgreffé R.*

**Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases.** *1077600.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm), traité avant le greffage de groupes octadécylsilylés par rinçage soigneux et par hydrolyse de la majorité des liaisons siloxane en surface, en vue de réduire à un minimum l'interaction avec les composés basiques. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases, postgreffé.** *1108600.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm) présentant un diamètre de pores de 10 nm et un taux de carbone de 16 pour cent, traité avant le greffage de groupes octadécylsilylés par rinçage et par hydrolyse de la majorité des liaisons siloxane en surface. Afin de réduire à un minimum toute interaction avec des composés basiques, il est soigneusement postgreffé en couvrant la plupart des groupes silanol restants. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre fine et blanche ou sensiblement blanche, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases, postgreffé R1.** *1162600.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm) traité avant le greffage de groupes octadécylsilylés par rinçage et par hydrolyse de la majorité des liaisons siloxane en surface. Afin de réduire à un minimum toute interaction avec des composés basiques, il est soigneusement postgreffé en couvrant la plupart des groupes silanol restants. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre fine et blanche ou sensiblement blanche, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) octylsilylé pour chromatographie.** *1077700.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes octylsilylés. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) octylsilylé pour chromatographie R1.** *1077701.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes octylsilylés et méthylés (phase doublement greffée). La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) octylsilylé pour chromatographie R2.** *1077702.*

Gel de silice ultra pure de granulométrie très fine (diamètre de pores de 10 nm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes octylsilylés (19 pour cent de carbone). Il contient moins de 20 ppm de métaux.

**Silice (gel de) octylsilylé pour chromatographie R3.** *1155200.*

Gel de silice ultra pure, de granulométrie très fine, chimiquement modifié par greffage en surface de groupes octylsilylés et protégé stériquement par des hydrocarbures ramifiés sur les groupements silane. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**Silice (gel de) octylsilylé pour chromatographie, à groupements polaires incorporés, postgreffé.** *1152600.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm). Les particules sont constituées de silice chimiquement modifiée avec un réactif permettant l'obtention de chaînes contenant des groupes polaires incorporés et des groupes octyles terminaux. De plus, le support est postgreffé. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine et homogène.

**Silice (gel de) octylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases.** *1131600.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm), traité avant le greffage de groupes octylsilylés par rinçage soigneux et par hydrolyse de la majorité des liaisons siloxane en surface, en vue de réduire à un minimum l'interaction avec les composés basiques. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) octylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases, postgreffé.** *1148800.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm), traité avant le greffage de groupes octylsilylés par rinçage et par hydrolyse de la majorité des liaisons siloxane en surface. Afin de réduire à un minimum toute interaction avec des composés basiques, il est soigneusement postgreffé en couvrant la plupart des groupes silanol restants. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre fine et blanche ou sensiblement blanche, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

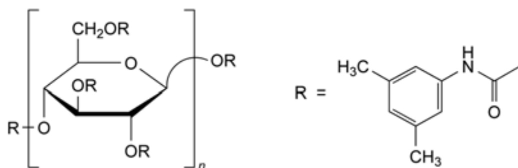
**Silice (gel de) octylsilylé postgreffé pour chromatographie.** *1119600.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes octylsilylés. Afin de réduire à un minimum toute interaction avec des composés basiques, il est soigneusement postgreffé pour couvrir la plupart des groupes silanol restants. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) OD pour séparation des composés chiraux.** *1110300.*

Gel de silice pour chromatographie de granulométrie très fine (5 µm) recouvert du dérivé suivant :




**Silice (gel de) palmitamidopropylsilylé postgreffé pour chromatographie.** *1161900.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes palmitamidopropylés et postgreffé avec des groupes acétamidopropylés. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) phénylhexylsilylé postgreffé pour chromatographie.** *1170600.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3 µm) chimiquement modifié par greffage en surface de groupes phénylhexylsilylés. Afin de réduire à un minimum toute interaction avec des composés basiques, il est soigneusement postgreffé en couvrant la plupart des groupes silanol restants. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**Silice (gel de) phénylhexylsilylé pour chromatographie.** *1153900.*

Gel de silice de granulométrie très fine, chimiquement modifié par greffage en surface de groupes phénylhexyle. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**Silice (gel de) phénylsilylé pour chromatographie.** *1110200.*

Gel de silice de granulométrie très fine (5-10 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes phényle.

**Silice (gel de) phénylsilylé pour chromatographie R1.** *1075700.*

Gel de silice, de granulométrie très fine (5 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes phénylés. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène pratiquement insoluble dans l'eau, dans l'éthanol à 96 pour cent et dans le chlorure de méthylène.

*Silice sphéroïdale* : 8 nm.

*Surface spécifique* : 180 $m^2$/g.

*Taux de carbone* : 5,5 pour cent.

**Silice (gel de) phénylsilylé postgreffé pour chromatographie.** *1154900.*

Gel de silice de granulométrie très fine (5-10 µm) chimiquement modifié par greffage en surface de groupes phényle. Afin de réduire au minimum toute interaction avec des composés basiques, il est soigneusement postgreffé pour couvrir la plupart des groupes silanol restants. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**Silice (gel de) pour chromatographie.** *1076900.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm). La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine, homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silice (gel de) pour chromatographie d'exclusion.** *1077900.*

Gel de silice de granulométrie très fine (10 µm) et de surface très hydrophile. Le diamètre moyen des pores est de 30 nm environ. Il est compatible avec les solutions aqueuses entre pH 2 et pH 8 et avec les solvants organiques. Il convient à la séparation des protéines d'une masse moléculaire relative de 1000 à 300 000.

**Silice (gel de) π-receveur/π-donneur pour séparation des composés chiraux.** *1160100.*

Gel de silice pour chromatographie de granulométrie très fine, constitué de particules sphériques sur lequel du 1-(3,5-dinitrobenzamido)-1,2,3,4-tétrahydrophénanthrène a été greffé par liaison covalente, ayant à la fois des caractéristiques de receveur d'électrons π et de donneur d'électrons π. La taille des particules et la configuration sont indiquées après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**Silice (gel de) propoxybenzène postgreffé pour chromatographie.** *1174600.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes propoxybenzène. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**Silice (gel de) propylsilylé pour chromatographie.** *1170700.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes propylsilylés. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

**Silice (gel de) recouvert d'albumine humaine pour chromatographie.** *1138500.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm) chimiquement modifié par greffage en surface d'albumine humaine. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine et homogène.

**Silice (gel de) silanisé H.** *1076600.*

*Préparation de la couche mince.* Voir *Silice (gel de) silanisé $HF_{254}$ R.*

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine et homogène qui, après agitation avec de l'eau, flotte à la surface en raison de son caractère hydrophobe.

*Pouvoir de séparation chromatographique.* Voir *Silice (gel de) silanisé $HF_{254}$ R.*

**Silice (gel de) silanisé $HF_{254}$.** *1076800.*

Contient environ 1,5 pour cent d'un indicateur de fluorescence dont l'intensité est optimale en lumière ultraviolette à 254 nm.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine et homogène qui, après agitation avec de l'eau, flotte à la surface en raison de son caractère hydrophobe.

*Préparation de la couche mince.* Agitez vigoureusement 30 g de gel de silice silanisé $HF_{254}$ avec 60 mL d'un mélange de 1 volume de *méthanol R* et de 2 volumes d'*eau R* pendant 2 min. Etalez sur des plaques soigneusement nettoyées, à l'aide d'un dispositif approprié, en couche de 0,25 mm. Laissez sécher à l'air, puis desséchez à l'étuve à 100-105 °C pendant 30 min.

*Pouvoir de séparation chromatographique.* Dans une fiole conique de 250 mL, introduisez 0,1 g respectivement de *laurate de méthyle R*, de *myristate de méthyle R*, de *palmitate de méthyle R* et de *stéarate de méthyle R*. Ajoutez 40 mL de *solution alcoolique d'hydroxyde de potassium R* et chauffez à reflux au bain-marie pendant 1 h. Laissez refroidir, transvasez dans une ampoule à décantation à l'aide de 100 mL d'*eau R*, acidifiez avec de l'*acide chlorhydrique dilué R* (pH de 2 à 3) et agitez avec 3 fois 10 mL de *chloroforme R*. Réunissez les phases chloroformiques, séchez-les sur du *sulfate de sodium anhydre R*, filtrez et évaporez à siccité au bain-marie. Dissolvez le résidu dans 50 mL de *chloroforme R*. Opérez par chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) en utilisant une plaque recouverte de gel de silice silanisé $HF_{254}$. Déposez respectivement sur 3 points de départ séparés, 10 µL de la solution chloroformique. Développez sur un parcours de 14 cm avec un mélange de 10 volumes d'*acide acétique glacial R*, de 25 volumes d'*eau R* et de 65 volumes de *dioxane R*. Desséchez la plaque à 120 °C pendant 30 min. Laissez refroidir, pulvérisez une solution d'*acide phosphomolybdique R* à 35 g/L dans le *2-propanol R* et chauffez à l'étuve à 150 °C jusqu'à apparition des taches. Traitez la plaque par des vapeurs d'ammoniac jusqu'à obtention d'un fond blanc. Les chromatogrammes obtenus présentent 4 taches nettement séparées et délimitées.

**Silice (gel de) triméthylsilylé pour chromatographie.** *1115500.*

Gel de silice de granulométrie très fine (3-10 µm), chimiquement modifié par greffage en surface de groupes triméthylsilyle. La taille des particules est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, fine et homogène, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Silicotungstique (acide).** $H_4SiW_{12}O_{40},xH_2O$. *1078000.* [11130-20-4].

Cristaux blancs ou légèrement jaunâtres, déliquescents, très solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Silicristine.** $C_{25}H_{22}O_{10}$. ($M_r$ 482,4). *1151500.* [33889-69-9]. (2*R*,3*R*)-3,5,7-Trihydroxy-2-[(2*R*,3*S*)-7-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-3-hydroxyméthyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-5-yl]chroman-4-one.

Poudre jaune ou blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'acétone et le méthanol.

**Silidianine.** $C_{25}H_{22}O_{10}$. ($M_r$ 482,4). *1151600.* [29782-68-1]. (3*R*,3a*R*,6*R*,7a*R*,8*R*)-7a-Hydroxy-8-(4-hydroxy-3-methoxyphényl)-4-[(2*R*,3*R*)-3,5,7-trihydroxy-4-oxochroman-2-yl]-2,3,3a,7a-tétrahydro-3,6-méthano-1-benzofuran-7(6a*H*)-one.

Poudre jaune ou blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'acétone et le méthanol.

**Sinensétine.** $C_{20}H_{20}O_7$ . ($M_r$ 372,4). *1110500.* [2306-27-6]. 3′,4′,5,6,7-Pentaméthoxyflavone.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 177 °C.

*Absorbance* (*2.2.25*). Une solution dans le *méthanol R* présente 3 maximums d'absorption respectivement à 243 nm, 268 nm, 330 nm.

*Dosage.* Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications données dans la monographie *Orthosiphon (1229).*

*Teneur* : au minimum 95 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Sitostanol.** $C_{29}H_{52}O$. ($M_r$ 416,7). *1140100.* [19466-47-8]. Dihydro-β-sitostérol.

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent.

**β-Sitostérol.** $C_{29}H_{50}O$. ($M_r$ 414,7). *1140200.* [83-46-5]. Stigmast-5-én-3β-ol. 22,23-Dihydrostigmastérol.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, assez soluble dans le tétrahydrofurane.

*Teneur* : au minimum 75,0 pour cent *m/m* (substance desséchée).

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*), selon les indications données dans la monographie *Phytostérol (1911).*

*Solution à examiner.* Dissolvez 0,100 g de β-sitostérol dans du *tétrahydrofurane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant. Dans une fiole de 3 mL, évaporez à siccité 100 µL de cette solution sous un courant d'*azote R*. Ajoutez au résidu sec 100 µL d'un mélange récemment préparé de 50 µL de *1-méthylimidazole R* et de 1,0 mL d'*heptafluoro-N-méthyl-N-(triméthylsilyl)butanamide R*. Fermez hermétiquement la fiole et chauffez à 100 °C pendant 15 min. Laissez refroidir.

*Injection* : 1 µL de solution à examiner.

**Sodium.** Na. ($A_r$ 22,99). *1078500.* [7440-23-5].

Métal dont la surface récemment coupée est d'un gris argenté brillant. Exposé à l'air, le sodium se ternit rapidement, s'oxyde complètement en hydroxyde de sodium, puis se transforme en carbonate de sodium. Le sodium réagit violemment avec l'eau avec dégagement d'hydrogène et formation d'une solution d'hydroxyde de sodium ; soluble dans le méthanol anhydre avec dégagement d'hydrogène et formation d'une solution de méthanolate de sodium ; pratiquement insoluble dans l'éther de pétrole.

*Conservation* : dans l'éther de pétrole ou la paraffine liquide.

**Sodium (acétate de).** *1078600.* [6131-90-4].

Voir *Acétate de sodium trihydraté (0411).*

**Sodium (acétate de) anhydre.** $C_2H_3NaO_2$. ($M_r$ 82,0). *1078700.* [127-09-3].

Cristaux ou granulés incolores, très solubles dans l'eau, assez solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Perte à la dessiccation* (*2.2.32*) : au maximum 2,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C.

**Sodium (arsénite de).** $NaAsO_2$. ($M_r$ 129,9). *1165900.* [7784-46-5]. Sodium (métaarsénite de).

**Solution d'arsénite de sodium.** *1165901.*

Dissolvez 5,0 g d'*arsénite de sodium R* dans 30 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M*. Refroidissez à 0 °C et ajoutez, en agitant, 65 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*.

**Sodium (ascorbate de), solution d'.** *1078800.* [134-03-2].

Dissolvez 3,5 g d'*acide ascorbique R* dans 20 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M*. Préparez extemporanément.

**Sodium (azide de).** $NaN_3$. ($M_r$ 65,0). *1078900.* [26628-22-8].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux, facilement solubles dans l'eau, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Sodium (bicarbonate de).** *1081300.* [144-55-8].

Voir *Bicarbonate de sodium (0195).*

**Solution de bicarbonate de sodium.** *1081301.*

Solution à 42 g/L.

**Sodium (bismuthate de).** $NaBiO_3$. ($M_r$ 280,0). *1079000.* [12232-99-4].

*Teneur* : au minimum 85,0 pour cent.

Poudre jaune ou brun-jaune, se décomposant lentement à l'humidité et à température élevée, pratiquement insoluble dans l'eau froide.

*Dosage*. Mettez en suspension 0,200 g de bismuthate de sodium dans 10 mL d'une solution d'*iodure de potassium R* à 200 g/L et ajoutez 20 mL d'*acide sulfurique dilué R*. Titrez par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* en présence de 1 mL de *solution d'amidon R* jusqu'à virage à l'orangé.

1 mL de *thiosulfate de sodium 0,1 M* correspond à 14,00 mg de $NaBiO_3$.

**Sodium (bisulfite de).** $NaHO_3S$. ($M_r$ 104,1). *1115700.* [7631-90-5].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, facilement soluble dans l'eau, assez soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

Au contact de l'air, il se produit une perte de dioxyde de soufre et la substance s'oxyde progressivement en sulfate.

**Sodium (borate de).** *1033600.* [1303-96-4].

Voir *Disodium (tétraborate de) R.*

**Sodium (bromure de).** *1154300.* [7647-15-6].

Voir *Bromure de sodium (0190).*

**Sodium (butanesulfonate de).** $C_4H_9NaO_3S$. ($M_r$ 160,2). *1115600.* [2386-54-1].

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, soluble dans l'eau.

F : supérieur à 300 °C.

**Sodium (carbonate de).** *1079200.* [6132-02-1].

Voir *Carbonate de sodium décahydraté (0191).*

**Sodium (carbonate de) anhydre.** $Na_2CO_3$. ($M_r$ 106,0). *1079300.* [497-19-8]. Carbonate de disodium.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique, facilement soluble dans l'eau.

Chauffez le carbonate de sodium anhydre vers 300 °C. Il ne perd pas plus de 1 pour cent de sa masse.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Solution de carbonate de sodium.** *1079301.*

Solution de *carbonate de sodium anhydre R* à 106 g/L.

**Solution de carbonate de sodium R1.** *1079302.*

Solution de *carbonate de sodium anhydre R* à 20 g/L dans de l'*hydroxyde de sodium 0,1 M*.

**Solution de carbonate de sodium R2.** *1079303.*

Solution de *carbonate de sodium anhydre R* à 40 g/L dans de l'*hydroxyde de sodium 0,2 M*.

**Sodium (carbonate de) monohydraté.** $Na_2CO_3,H_2O$. *1131700.* [5968-11-6].

Voir *Carbonate de sodium monohydraté (0192).*

**Sodium (chlorure de).** *1079500.* [7647-14-5].

Voir *Chlorure de sodium (0193).*

**Solution de chlorure de sodium.** *1079502.*

Solution à 20 pour cent *m/m*.

**Solution saturée de chlorure de sodium.** *1079503.*

Mélangez 1 partie de *chlorure de sodium R* avec 2 parties d'*eau R*, agitez de temps à autre et laissez reposer. Avant utilisation, décantez la solution de toute substance non dissoute et filtrez, si nécessaire.

**Sodium (citrate de).** *1079600.* [6132-04-3].

Voir *Citrate de sodium (0412).*

**Sodium (citrate acide de).** $C_6H_6Na_2O_7,1^1/_2H_2O$. ($M_r$ 263,1). *1033200.* [144-33-2]. Citrate disodique. 2-Hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate de disodium sesquihydraté.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, soluble dans moins de 2 parties d'eau, pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Sodium (cobaltinitrite de).** $Na_3[Co(NO_2)_6]$. ($M_r$ 403,9). *1079700.* [13600-98-1]. Hexanitrocobaltate(III) de trisodium.

Poudre jaune orangé, facilement soluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution de cobaltinitrite de sodium.** *1079701.*

Solution à 100 g/L. Préparez extemporanément.

**Sodium (décanesulfonate de).** $C_{10}H_{21}NaO_3S$. ($M_r$ 244,3). *1079800.* [13419-61-9].

Poudre cristalline ou paillettes, blanches ou sensiblement blanches, facilement solubles dans l'eau, solubles dans le méthanol.

**Sodium (décylsulfate de).** $C_{10}H_{21}NaO_4S$. ($M_r$ 260,3). *1138600.* [142-87-0].

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, facilement soluble dans l'eau.

**Sodium (désoxycholate de).** $C_{24}H_{39}NaO_4$. ($M_r$ 414,6). *1131800.* [302-95-4]. 3α,12α-dihydroxy-5β-cholan-24-oate de sodium.

**Sodium (désoxyribonucléate de).** (85 pour cent environ présente une masse moléculaire relative égale ou supérieure à $2 \times 10^7$). *1079900.* [73049-39-5].

La substance est obtenue à partir de thymus de veau et se présente sous la forme d'une préparation blanche ou sensiblement blanche et fibreuse.

*Essai de validité*. Dissolvez 10 mg de désoxyribonucléate de sodium dans la *solution tampon imidazole pH 6,5 R* et complétez à 10,0 mL avec le même solution tampon (solution (a)). Prélevez 2,0 mL de solution (a) et complétez à 50,0 mL avec la *solution tampon imidazole pH 6,5 R*. L'absorbance (*2.2.25*) mesurée à 260 nm est de 0,4 à 0,8.

A 0,5 mL de solution (a) ajoutez 0,5 mL de *solution tampon imidazole pH 6,5 R* et 3 mL d'acide perchlorique à 25 g/L en $HClO_4$. Il se forme un précipité ; centrifugez. L'absorbance du surnageant mesurée à 260 nm n'est pas supérieure à 0,3. Utilisez comme liquide de compensation un mélange de 1 mL de *solution tampon imidazole pH 6,5 R* et de 3 mL d'acide perchlorique à 25 g/L en $HClO_4$.

Utilisez 2 tubes à essai. Introduisez dans chacun d'eux 0,5 mL de solution (a) et 0,5 mL d'une solution contenant une quantité de préparation de référence de streptodornase correspondant à 10 UI/mL dans la *solution tampon imidazole pH 6,5 R*. Au contenu du premier tube, ajoutez immédiatement 3 mL d'acide perchlorique à 25 g/L en $HClO_4$. Il se forme un précipité. Centrifugez et recueillez le surnageant (a). Faites incuber le contenu du deuxième tube à 37 °C pendant 15 min et ajoutez 3 mL d'acide perchlorique à 25 g/L en $HClO_4$. Centrifugez et recueillez le liquide surnageant (b). Mesurée à 260 nm par rapport à l'absorbance du surnageant (a), l'absorbance du surnageant (b) n'est pas inférieure à 0,15.

**Sodium (diéthyldithiocarbamate de).** $C_5H_{10}NNaS_2,3H_2O$. ($M_r$ 225,3). *1080000.* [20624-25-3].

Cristaux blancs ou sensiblement blancs ou incolores, facilement solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent. La solution aqueuse est incolore.

**Sodium (dithionite de).** $Na_2S_2O_4$. ($M_r$ 174,1). *1080400.* [7775-14-6].

Poudre cristalline blanche ou blanc-gris, s'oxydant à l'air, très soluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Sodium (dodécylsulfate de).** *1080500.* [151-21-3].

Voir *Laurilsulfate de sodium (0098).*

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent.

**Sodium (édétate de).** *1080600.* [6381-92-6].

Voir *Edétate disodique (0232).*

**Sodium et de potassium (tartrate de).** $C_4H_4KNaO_6,4H_2O$. ($M_r$ 282,2). *1083500.* [6381-59-5].

Cristaux prismatiques incolores, très solubles dans l'eau.

**Sodium (fluorescéinate de).** $C_{20}H_{10}Na_2O_5$. ($M_r$ 376,3). *1080700.* [518-47-8].

Schultz No. 880.

Colour Index No. 45350.
Fluorescéine sodique. 2-(3-Oxo-6-oxydo-3*H*-xanthén-9-yl)benzoate de disodium.

Poudre rouge orangé, facilement soluble dans l'eau. Les solutions aqueuses présentent une fluorescence jaune-vert intense.

**Sodium (fluorure de).** *1080800.* [7681-49-4].

Voir *Fluorure de sodium (0514).*

**Sodium (formiate de).** $CHNaO_2$. ($M_r$ 68,0). *1122200.* [141-53-7]. Méthanoate de sodium.

Poudre cristalline ou granulés déliquescents, blancs ou sensiblement blancs, solubles dans l'eau et dans le glycérol, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 253 °C.

**Sodium (glucuronate de).** $C_6H_9NaO_7,H_2O$. ($M_r$ 234.1). *1080900.* D-Glucuronate de sodium monohydraté.

$[\alpha]_D^{20}$ : + 21,5 environ, déterminé avec une solution à 20 g/L.

**Sodium (glycocholate de).** $C_{26}H_{42}NNaO_6,2H_2O$. ($M_r$ 523,6). *1155500.* [207300-80-9]. [(3,7,12-Trihydroxy-5-cholan-24-oyl)amino]acétate de sodium dihydraté. *N*-[(3,5,7,12)-3,7,12-Trihydroxy-24-oxocholan-24-yl]glycine monosodique dihydratée.

*Teneur* : au minimum 97 pour cent de $C_{26}H_{42}NNaO_6,2H_2O$.

**Sodium (heptanesulfonate de).** $C_7H_{15}NaO_3S$. ($M_r$ 202,3). *1081000.* [22767-50-6].

Masse cristalline blanche ou sensiblement blanche, facilement soluble dans l'eau, soluble dans le méthanol.

**Sodium (heptanesulfonate de) monohydraté.** $C_7H_{15}NaO_3S,H_2O$. ($M_r$ 220,3). *1081100.*

*Teneur* : au minimum 96 pour cent (substance anhydre).

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, soluble dans l'eau, très peu soluble dans l'éthanol anhydre.

*Eau* (*2.5.12*) : au maximum 8 pour cent, déterminé sur 0,300 g.

*Dosage.* Dissolvez 0,150 g d'heptanesulfonate de sodium dans 50 mL d'*acide acétique anhydre R*. Titrez par l'*acide perchlorique 0,1 M*. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (*2.2.20*).

1 mL d'*acide perchlorique 0,1 M* correspond à 20,22 mg de $C_7H_{15}NaO_3S$.

**Sodium (hexanesulfonate de).** $C_6H_{13}NaO_3S$. ($M_r$ 188,2). *1081200.* [2832-45-3].

Poudre blanche ou sensiblement blanche, facilement soluble dans l'eau.

**Sodium (hexanesulfonate de) monohydraté.** $C_6H_{13}NaO_3S,H_2O$. ($M_r$ 206,2). *1161500.* [207300-91-2].

Poudre blanche ou sensiblement blanche, soluble dans l'eau.

**Sodium (2-hydroxybutyrate de).** $C_4H_7NaO_3$. ($M_r$ 126,1). *1158800.* [19054-57-0]. (2*RS*)-2-hydroxybutanoate de sodium.

**Sodium (hydrogénosulfate de).** $NaHSO_4$. ($M_r$ 120,1). *1131900.* [7681-38-1]. Bisulfate de sodium.

Facilement soluble dans l'eau, très soluble dans l'eau bouillante. L'hydrogénosulfate de sodium se décompose dans l'éthanol à 96 pour cent en sulfate de sodium et en acide sulfurique libre.

F : environ 315 °C.

**Sodium (hydroxyde de).** *1081400.* [1310-73-2].

Voir *Hydroxyde de sodium (0677).*

**Sodium (hydroxyde de) 2 M.** *3009800.*

Dissolvez 84 g d'*hydroxyde de sodium R* dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

**Solution concentrée d'hydroxyde de sodium.** *1081404.*

Dissolvez 42 g d'*hydroxyde de sodium R* dans de l'*eau R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

**Solution d'hydroxyde de sodium.** *1081401.*

Dissolvez 20,0 g d'*hydroxyde de sodium R* dans de l'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Vérifiez la concentration par titrage par l'*acide chlorhydrique 1 M* en présence de *solution de méthylorange R*. Ajustez, si nécessaire, la concentration à 200 g/L.

**Solution d'hydroxyde de sodium exempte de carbonate.** *1081406.*

Dissolvez de l'*hydroxyde de sodium R* à une concentration de 500 g/L dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R* et laissez reposer. Prélevez le liquide limpide surnageant en évitant l'introduction de dioxyde de carbone.

**Solution diluée d'hydroxyde de sodium.** *1081402.*

Dissolvez 8,5 g d'*hydroxyde de sodium R* dans de l'*eau R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

**Solution méthanolique d'hydroxyde de sodium.** *1081403.*

Dissolvez 40 mg d'*hydroxyde de sodium R* dans 50 mL d'*eau R*. Refroidissez et ajoutez 50 mL de *méthanol R*.

**Solution méthanolique d'hydroxyde de sodium R1.** *1081405.*

Dissolvez 200 mg d'*hydroxyde de sodium R* dans 50 mL d'*eau R*. Refroidissez et ajoutez 50 mL de *méthanol R*.

**Sodium (hypobromite de), solution d'.** *1081500.*

Dans un bain d'eau glacée, mélangez 20 mL de *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R* et 500 mL d'*eau R*. Ajoutez 5 mL de *solution de brome R* et mélangez doucement jusqu'à dissolution. Préparez extemporanément.

**Sodium (hypochlorite de), solution concentrée d'.** *1081600.*

*Teneur* : 25 g/L à 30 g/L de chlore actif.

Liquide jaunâtre à réaction alcaline.

*Dosage.* Dans une fiole conique, introduisez successivement 50 mL d'*eau R*, 1 g d'*iodure de potassium R* et 12,5 mL d'*acide acétique dilué R*. Prélevez 10,0 mL de solution concentrée d'hypochlorite de sodium et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Introduisez dans la fiole conique 10,0 mL de la dilution et titrez l'iode libéré par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* en présence de 1 mL de *solution d'amidon R*.

1 mL de *thiosulfate de sodium 0,1 M* correspond à 3,546 mg de chlore actif.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Sodium (hypophosphite de).** $NaH_2PO_2,H_2O$. ($M_r$ 106,0). *1081700.* [10039-56-2]. Phosphinate de sodium monohydraté.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, ou cristaux incolores, hygroscopiques, facilement solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Sodium (iodure de).** *1081800.* [7681-82-5].

Voir *Iodure de sodium (0196).*

**Sodium (laurilsulfate de).** *1081900.* [151-21-3].

Voir *Laurilsulfate de sodium (0098).*

**Sodium (laurylsulfate de).** *1081900.* [151-21-3].

Voir *Laurilsulfate de sodium R.*

**Sodium (laurylsulfonate de) pour chromatographie.** $C_{12}H_{25}NaO_3S$. ($M_r$ 272,4). *1132000.* [2386-53-0].

Poudre ou cristaux blancs ou sensiblement blancs, facilement solubles dans l'eau.

Absorbance $A_{1\,cm}^{5\%}$ (*2.2.25*), déterminée dans l'*eau R* : environ 0,05 à 210 nm, environ 0,03 à 220 nm, environ 0,02 à 230 nm, environ 0,02 à 500 nm.

**Sodium (métabisulfite de).** *1082000.* [7681-57-4].

Voir *Métabisulfite de sodium (0849).*

**Sodium (méthanesulfonate de).** $CH_3SO_3Na$. ($M_r$ 118,1). *1082100.* [2386-57-4].

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Sodium (molybdate de).** $Na_2MoO_4,2H_2O$. ($M_r$ 242,0). *1082200.* [10102-40-6]. Molybdate de disodium dihydraté.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores, facilement solubles dans l'eau.

**Sodium (naphtoquinonesulfonate de).** $C_{10}H_5NaO_5S$. ($M_r$ 260,2). *1082300.* [521-24-4]. 1,2-Naphtoquinone-4-sulfonate de sodium.

Poudre cristalline jaune ou jaune orangé, facilement soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Sodium (nitrate de).** $NaNO_3$. ($M_r$ 85,0). *1082400.* [7631-99-4].

Poudre ou granulés blancs ou sensiblement blancs ou cristaux incolores et transparents, déliquescents à l'air humide, facilement solubles dans l'eau et peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Sodium (nitrite de).** $NaNO_2$. ($M_r$ 69,0). *1082500.* [7632-00-0].

*Teneur* : au minimum 97,0 pour cent.

Poudre granulée blanche ou sensiblement blanche ou poudre cristalline légèrement jaune, facilement soluble dans l'eau.

*Dosage.* Dissolvez 0,100 g de nitrite de sodium dans 50 mL d'*eau R*. Ajoutez 50,0 mL de *permanganate de potassium 0,02 M* et 15 mL d'*acide sulfurique dilué R*. Ajoutez 3 g d'*iodure de potassium R*. Titrez par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* en présence de 1,0 mL de *solution d'amidon R* ajoutée en fin de titrage.

1 mL de *permanganate de potassium 0,02 M* correspond à 3,450 mg de $NaNO_2$.

**Solution de nitrite de sodium.** *1082501.*

Solution à 100 g/L. Préparez extemporanément.

**Sodium (nitroprussiate de).** $Na_2[Fe(CN)_5NO],2H_2O$. ($M_r$ 298,0). *1082600.* [13755-38-9]. Pentacyano-nitrosylferrate(III) de sodium dihydraté.

Poudre ou cristaux brun-rouge, facilement solubles dans l'eau, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Sodium (octanesulfonate de).** $C_8H_{17}NaO_3S$. ($M_r$ 216,3). *1082700.* [5324-84-5].

*Teneur* : au minimum 98 pour cent.

Poudre cristalline ou paillettes, blanches ou sensiblement blanches, facilement solubles dans l'eau, solubles dans le méthanol.

*Absorbance* (*2.2.25*) : au maximum 0,10 à 200 nm et au maximum 0,01 à 250 nm avec une solution à 54 g/L.

**Sodium (octanesulfonate de) monohydraté.** $C_8H_{17}NaO_3S,H_2O$. ($M_r$ 234,3). *1176700.* [207596-29-0].

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

**Sodium (octylsulfate de).** $C_8H_{17}NaO_4S$. ($M_r$ 232,3). *1082800.* [142-31-4].

Poudre cristalline ou paillettes, blanches ou sensiblement blanches, facilement solubles dans l'eau, solubles dans le méthanol.

**Sodium (oxalate de).** $C_2Na_2O_4$. ($M_r$ 134,0). *1082900.* [62-76-0].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Sodium (pentanesulfonate de).** $C_5H_{11}NaO_3S$. ($M_r$ 174,2). *1083000.* [22767-49-3].

Solide blanc ou sensiblement blanc, cristallin, soluble dans l'eau.

**Sodium (pentanesulfonate de) monohydraté.** $C_5H_{11}NaO_3S,H_2O$. ($M_r$ 192,2). *1132100.* [22767-49-3].

Solide blanc ou sensiblement blanc, cristallin, soluble dans l'eau.

**Sodium (pentanesulfonate de) monohydraté R1.** $C_5H_{11}NaO_3S,H_2O$. ($M_r$ 192,2). *1172500.* [22767-49-3].

*Teneur* : au minimum 99 pour cent de $C_5H_{11}NaO_3S,H_2O$.

**Sodium (perchlorate de).** $NaClO_4,H_2O$. ($M_r$ 140,5). *1083100.* [7791-07-3].

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent de $NaClO_4,H_2O$.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, déliquescents, très solubles dans l'eau.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Sodium (periodate de).** $NaIO_4$. ($M_r$ 213,9). *1083200.* [7790-28-5]. Métaperiodate de sodium.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent.

Poudre cristalline ou cristaux, blancs ou sensiblement blancs, solubles dans l'eau et dans les acides minéraux.

**Solution de periodate de sodium.** *1083201.*

Dissolvez 1,07 g de *periodate de sodium R* dans de l'*eau R*, ajoutez 5 mL d'*acide sulfurique dilué R* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Utilisez une solution récemment préparée.

**Sodium (phosphite de) pentahydraté.** $Na_2HPO_3,5H_2O$. ($M_r$ 216,0). *1132200.* [13517-23-2].

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique, facilement soluble dans l'eau.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Sodium (picrate de), solution alcaline de.** *1083300.*

A 10 mL de solution d'*hydroxyde de sodium R* à 50 g/L, ajoutez 20 mL de *solution d'acide picrique R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

*Conservation* : pendant 2 jours.

**Sodium (pyrophosphate de).** $Na_4P_2O_7,10H_2O$. ($M_r$ 446,1). *1083600.* [13472-36-1]. Diphosphate de tétrasodium décahydraté.

Cristaux incolores, légèrement efflorescents, facilement solubles dans l'eau.

**Sodium (rhodizonate de).** $C_6Na_2O_6$. ($M_r$ 214,0). *1122300.* [523-21-7]. [(3,4,5,6-tétraoxocyclohex-1-én-1,2-ylène)dioxy]disodique.

Cristaux violets, solubles dans l'eau, prenant une coloration jaune-orange. Les solutions sont instables et doivent être préparées le jour de leur emploi.

**Sodium (salicylate de).** *1083700.* [54-21-7].

Voir *Salicylate de sodium (0413).*

**Sodium (sulfate de) anhydre.** *1083800.* [7757-82-6].

Calcinez à 600-700 °C du sulfate de sodium anhydre conforme à la monographie *Sulfate de sodium anhydre (0099).*

*Perte à la dessiccation* (*2.2.32*) : au maximum 0,5 pour cent, déterminé par chauffage à l'étuve à 130 °C.

**Sodium (sulfate de) décahydraté.** $Na_2SO_4,10H_2O$. ($M_r$ 322,2). *1132300.* [7727-73-3].

Voir *Sulfate de sodium décahydraté (0100).*

**Sodium (sulfite de).** *1084000.* [10102-15-5].

Voir *Sulfite de sodium heptahydraté (0776).*

**Sodium (sulfite de) anhydre.** *1084100.* [7757-83-7].

Voir *Sulfite de sodium anhydre (0775).*

**Sodium (sulfure de).** $Na_2S,9H_2O$. ($M_r$ 240,2). *1083900.* [1313-84-4]. Sulfure de disodium nonahydraté.

Cristaux incolores, jaunissant rapidement, déliquescents, très solubles dans l'eau.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Solution de sulfure de sodium.** *1083901.*

Dissolvez en chauffant 12 g de *sulfure de sodium R* dans 45 mL d'un mélange de 10 volumes d'*eau R* et de 29 volumes de *glycérol à 85 pour cent R*. Laissez refroidir et complétez à 100 mL avec le même mélange de solvants. La solution doit être incolore.

**Solution de sulfure de sodium R1.** *1083902.*

Préparez par une des méthodes suivantes.

– Dissolvez 5 g de *sulfure de sodium R* dans un mélange de 10 mL d'*eau R* et de 30 mL de *glycérol R*.

– Dissolvez 5 g d'*hydroxyde de sodium R* dans un mélange de 30 mL d'*eau R* et de 90 mL de *glycérol R*. Divisez la solution en 2 parties égales. Faites saturer une de ces 2 parties avec du *sulfure d'hydrogène R*, en refroidissant. Mélangez les 2 parties.

*Conservation* : en récipient bien rempli, à l'abri de la lumière pendant 3 mois.

**Sodium (tartrate de).** $C_4H_4Na_2O_6,2H_2O$. ($M_r$ 230,1). *1084200.* [6106-24-7]. (2 *R*,3*R*)-2,3-Dihydroxybutanedioate de disodium dihydraté.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs ou granulés, très solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Sodium (taurodésoxycholate de).** $C_{26}H_{44}NNaO_6S,H_2O$. ($M_r$ 539,7). *1155600.* [110026-03-4]. 2-[(3,12-Dihydroxy-5-cholan-24-oyl)amino]éthane sulfonate de sodium monohydraté. Acide 2-[[(3,5,12)-3,12-dihydroxy-24-oxocholan-24-yl]amino]éthanesulfonique monosodique monohydraté.

*Teneur* : au minimum 94 pour cent de $C_{26}H_{44}NNaO_6S,H_2O$.

**Sodium (tétradeutériodiméthylsilapentanoate de).** $C_6H_9{}^2H_4NaO_2Si$. ($M_r$ 172,3). *1084300.* TSP. 2,2,3,3-Tétradeutério-4,4-diméthyl-4-silapentanoate de sodium.

*Degré de deutériation* : au minimum 99 pour cent.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, facilement soluble dans l'eau, dans l'éthanol anhydre et dans le méthanol.

F : environ 300 °C.

*Eau et oxyde de deutérium* : au maximum 0,5 pour cent.

**Sodium (tétrahydroborate de).** $NaBH_4$. ($M_r$ 37,8). *1146900.* [16940-66-2]. Borohydrure de sodium.

Cristaux incolores, hygroscopiques, facilement solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol anhydre, se décomposant à température élevée ou en présence d'acides ou de certains sels métalliques en formant du borax et de l'hydrogène.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Solution réductrice de tétrahydroborate de sodium.** *1146901.*

Introduisez environ 100 mL d'*eau R* dans une fiole jaugée de 500 mL contenant un agitateur. Ajoutez 5,0 g d'*hydroxyde de sodium R* sous forme de pastilles et 2,5 g de *tétrahydroborate de sodium R*. Agitez jusqu'à dissolution complète, complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R* et mélangez. Préparez immédiatement avant emploi.

**Sodium (tétraphénylborate de).** $NaB(C_6H_5)_4$. ($M_r$ 342,2). *1084400.* [143-66-8].

Poudre blanche ou faiblement jaunâtre, volumineuse, facilement soluble dans l'eau et dans l'acétone.

**Solution de tétraphénylborate de sodium.** *1084401.*

Si nécessaire, filtrez avant l'utilisation.

Solution à 10 g/L.

*Conservation* : pendant 1 semaine.

**Sodium (thioglycolate de).** $C_2H_3NaO_2S$. ($M_r$ 114,1). *1084500.* [367-51-1]. Mercaptoacétate de sodium.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, granuleuse ou cristaux, hygroscopiques, facilement solubles dans l'eau et dans le méthanol, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Sodium (thiosulfate de).** *1084600.* [10102-17-7].

Voir *Thiosulfate de sodium (0414).*

**Sodium (triméthylsilylpropionate de) deutérié.** $C_6H_9{}^2H_4NaO_2Si$. ($M_r$ 172,3). *1179100.* [24493-21-8].

3-(Triméthylsilyl)(2,2,3,3-$^2H_4$)propionate de sodium. TSP-$d_4$.

*Degré de deutériation* : au minimum 98 pour cent.

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

**Sodium (tunsgstate de).** $Na_2WO_4,2H_2O$. ($M_r$ 329,9). *1084700.* [10213-10-2]. Tungstate de disodium dihydraté.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores, facilement solubles dans l'eau en formant une solution limpide, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

4. Réactifs

**Solution étalon de strontium-85.** *1166900.*

Solution de strontium-85 sous forme d'ions $Sr^{2+}$ dans une solution d'*acide chlorhydrique R* à 51,5 g/L.

**Solution étalon pour microdosage de l'eau.** *1147300.*

Solution standard disponible dans le commerce pour la titration coulométrique, contenant une teneur d'eau certifiée dans un solvant approprié.

**Solution d'arrêt.** *1122400.*

Solution d'*acide acétique R* à 10 pour cent *V/V.*

**Solution de coloration au Coomassie.** *1012201.*

Préparez une solution de *bleu acide 83 R* à 1,25 g/L dans un mélange de 1 volume d'*acide acétique glacial R,* de 4 volumes de *méthanol R* et de 5 volumes d'*eau R.* Filtrez.

**Solution de coloration au Coomassie R1.** *1173000.*

Dissolvez 0,275 g de *bleu brillant R* dans 200 mL de *méthanol R.* Agitez jusqu'à dissolution complète des cristaux (pendant environ 2 h). Ajoutez 750 mL d'*eau R* et 50 mL d'*acide acétique glacial R.* Continuez à agitez pendant toute la nuit (pendant au moins 16 h). Filtrez.

**Solution de décoloration.** *1012202.*

Préparez un mélange de 1 volume d'*acide acétique glacial R,* de 4 volumes de *méthanol R* et de 5 volumes d'*eau R.*

**Solution de développement.** *1122500.*

Mélangez 2,5 mL d'une solution d'*acide citrique R* à 20 g/L et 0,27 mL de *formaldéhyde R* puis complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution de fixation.** *1122600.*

A 250 mL de *méthanol R,* ajoutez 0,27 mL de *formaldéhyde R* et complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution de fixation pour focalisation isoélectrique sur gel de polyacrylamide.** *1138700.*

Solution contenant 35 g d'*acide sulfosalicylique R* et 100 g d'*acide trichloracétique R* par litre d'*eau R.*

**Solution dopante d'américium-243.** *1167500.*

Solution contenant 50 Bq/L de $^{243}Pu$ et 134 g/L de *chlorure de lanthane heptahydraté R* dans une solution d'*acide chlorhydrique R* à 103 g/L.

**Solution dopante de plutonium-242.** *1167400.*

Solution contenant 50 Bq/L de $^{242}Pu$ et 134 g/L de *chlorure de lanthane heptahydraté R* dans une solution d'*acide nitrique R* à 284 g/L.

**Solution dopante de strontium-85.** *1166800.*

Diluez une *solution étalon de strontium-85 R* pour obtenir une concentration en radioactivité d'environ 10 kBq/mL avec une solution de *chlorure de strontium hexahydraté R* à 0,27 g/L dans une solution d'*acide chlorhydrique R* à 1,03 g/L.

**Solution dopante d'iode-123 et de ruthénium-106.** *1166700.*

*Préparez immédiatement avant l'emploi.* Mélangez 3,5 mL d'une solution de ruthénium-106 à 18,5 kBq/mL sous forme de trichlorure de ruthénium dans un mélange à volumes égaux d'*acide acétique glacial R* et d'*eau R* avec 200 µL d'une solution d'iode-123 à 75 kBq/mL sous forme d'iodure de sodium dans de l'*eau R.*

**Solution élémentaire de référence pour spectrométrie atomique à 1,000 g/L.** *5004000.*

Cette solution est préparée, en milieu généralement acide, à partir de l'élément ou d'un sel de l'élément dont le titre minimum est au moins égal à 99,0 pour cent. La quantité par litre de solution est supérieure à 0,995 g pendant toute la période de garantie, tant que le flacon n'a pas été ouvert. La matière première de départ (élément ou sel) et les caractéristiques du solvant final (nature et acidité, etc.) doivent être mentionnées sur l'étiquette.

**Solution pour essai de performance pour CCM.** *1116600.*

Préparez un mélange contenant 1,0 mL de chacune des solutions suivantes, puis complétez à 10,0 mL avec de l'*acétone R* : solution de *rouge Soudan G R* à 0,5 g/L dans le *toluène R,* solution préparée extemporanément de *méthylorange R* à 0,5 g/L dans l'*éthanol anhydre R, solution de vert de bromocrésol R* à 0,5 g/L dans l'*acétone R* et *solution de rouge de méthyle R* à 0,25 g/L dans l'*acétone R.*

**Solutions d'essai de performance de papier pour chromatographie.** *1150800.*

*Solution à examiner (a). Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu par fission (0124)* ou *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium non obtenu par fission (0283).*

*Solution à examiner (b).* Dans un flacon fermé, mélangez 100 µL d'une solution de *chlorure stanneux R* à 5 g/L dans de l'*acide chlorhydrique 0,05 M* et 100 MBq à 200 MBq de *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu par fission (0124)* ou de *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium non obtenu par fission (0283)* dans un volume ne dépassant pas 2 mL.

**Sorbitol.** *1084800.* [50-70-4].

Voir *Sorbitol (0435).*

**Soufre.** *1110800.* [7704-34-9].

Voir *Soufre pour usage externe (0953).*

**Soufre (dioxyde de).** $SO_2$. ($M_r$ 64,1). *1086700.* [7446-09-5]. Anhydride sulfureux.

Gaz incolore. Comprimé, il donne un liquide incolore.

**Soufre (dioxyde de) R1.** $SO_2$. ($M_r$ 64,1). *1110900.* [7446-09-5].

*Teneur* : au minimum 99,9 pour cent *V/V.*

**Squalane.** $C_{30}H_{62}$. ($M_r$ 422,8). *1084900.* [111-01-3]. 2,6,10, 15,19,23-Hexaméthyltétracosane.

Liquide huileux, incolore, facilement soluble dans les huiles grasses, peu soluble dans l'acétone, dans l'éthanol à 96 pour cent, dans l'acide acétique glacial et dans le méthanol.

$d_{20}^{20}$ : 0,811 à 0,813.

$n_D^{20}$ : 1,451 à 1,453.

**Stanneux (chlorure).** $SnCl_2,2H_2O$. ($M_r$ 225,6). *1085000.* [10025-69-1]. Dichlorure d'étain dihydraté.

*Teneur* : au minimum 97,0 pour cent de $SnCl_2,2H_2O$.

Cristaux incolores, très solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent, dans l'acide acétique glacial et dans l'acide chlorhydrique dilué ou concentré.

*Dosage.* Dans une fiole à bouchon rodé, dissolvez 0,500 g de chlorure stanneux dans 15 mL d'*acide chlorhydrique R.* Ajoutez 10 mL d'*eau R* et 5 mL de *chloroforme R.* Titrez rapidement par l'*iodate de potassium 0,05 M* jusqu'à ce que la phase chloroformique devienne incolore.

1 mL d'*iodate de potassium 0,05 M* correspond à 22,56 mg de $SnCl_2,2H_2O$.

**Solution de chlorure stanneux.** *1085001.*

Chauffez 20 g d'*étain R* avec 85 mL d'*acide chlorhydrique R* jusqu'à ce qu'il ne se dégage plus d'hydrogène. Laissez refroidir.

*Conservation* : sur un excès d'*étain R* et à l'abri de l'air.

**Solution de chlorure stanneux R1.** *1085002.*

Diluez extemporanément 1 volume de *solution de chlorure stanneux R* avec 10 volumes d'*acide chlorhydrique dilué R.*

**Solution de chlorure stanneux R2.** *1085003.*

A 8 g de *chlorure stanneux R*, ajoutez 100 mL d'*acide chlorhydrique R* à 20 pour cent *V/V*. Agitez jusqu'à dissolution complète en chauffant éventuellement à 50 °C au bain-marie. Faites barboter un courant d'*azote R* pendant 15 min. Préparez extemporanément.

**Stanolone.** $C_{19}H_{30}O_2$. ($M_r$ 290,4). *1154400.* [521-18-6]. 17β-Hydroxy-5α-androstan-3-one.

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

F : environ 180 °C.

**Stéarique (acide).** $C_{18}H_{36}O_2$. ($M_r$ 284,5). *1085200.* [57-11-4]. Acide octadécanoïque.

Poudre blanche ou sensiblement blanche ou paillettes, onctueuses au toucher, pratiquement insolubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent chaud.

F : environ 70 °C.

*L'acide stéarique utilisé dans le dosage des acides gras totaux du Fruit de sabal (1848) satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage*. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*), selon les indications données dans la monographie *Fruit de sabal (1848)*.

*Teneur* : au minimum 98 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Stéarique (alcool).** $C_{18}H_{38}O$. ($M_r$ 270,5). *1156400.* [112-92-5]. 1-Octadécanol.

F : environ 60 °C.

*Teneur* : au minimum 95 pour cent.

**Stigmastérol.** $C_{29}H_{48}O$. ($M_r$ 412.7). *1141400.* [83-48-7]. (22*E*)-Stigmasta-5,22-dién-3-β-ol. (22*E*)-24-Ethylcholesta-5,22-dién-3β-ol.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, insoluble dans l'eau.

F : environ 170 °C.

$[\alpha]_D^{22}$ : environ – 51, déterminé avec une solution à 20 g/L dans le *chloroforme R*.

**Streptomycine (sulfate de).** *1085300.* [3810-74-0].

Voir *Sulfate de streptomycine (0053)*.

**Strontium (carbonate de).** $SrCO_3$. ($M_r$ 147,6). *1122700.* [1633-05-2].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche.

*Teneur* : au minimum 99,5 pour cent.

**Strontium (chlorure de) hexahydraté.** $SrCl_2,6H_2O$. ($M_r$ 266,6). *1167000.* [10025-70-4].

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, très solubles dans l'eau.

F : environ 115 °C (perte d'eau) et 872 °C.

**Styrène.** $C_8H_8$. ($M_r$ 104,2). *1151700.* [100-42-5]. Ethénylbenzène.

Eb : environ 145 °C.

Liquide huileux incolore, très peu soluble dans l'eau.

**Styrène-divinylbenzène (copolymère).** *1085500.*

Consiste en un polymère réticulé, poreux et rigide, qui se présente sous forme de billes. Il est classé en plusieurs catégories définies par les dimensions des billes indiquées après le nom du réactif, dans les essais où il est utilisé.

**Substance S de Reichstein.** $C_{21}H_{30}O_4$. ($M_r$ 346,5). *1175400.* [152-58-9].

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent.

F : environ 208 °C.

**Substrat chromogénique R1.** *1020000.*

Dissolvez du dichlorhydrate de *N*-α-benzyloxycarbonyl-D-arginyl-L-glycyl-L-arginine-4-nitroanilide dans de l'*eau R* pour donner une solution 0,003 M. Diluez à 0,0005 M dans une *solution tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane-EDTA pH 8,4 R* avant de l'utiliser dans les titrages.

**Substrat chromogénique R2.** *1020100.*

Dissolvez du dichlorhydrate de D-phénylalanyl-L-pipécolyl-L-arginine-4-nitroanilide dans de l'*eau R* pour donner une solution 0,003 M. Diluez à 0,0005 M dans une *solution tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane-EDTA pH 8,4 R* avant de l'utiliser dans les titrages.

**Substrat chromogénique R3.** *1149100.*

Dissolvez du dichlorhydrate de D-valyl-leucyl-lysyl-4-nitroanilide dans de *l'eau R* pour donner une solution 0,003 M.

**Substrat chromogénique R4.** *1163100.*

Dissolvez du dichlorhydrate de D-phénylalanyl-L-pipécolyl-L-arginine-4-nitroanilide dans de l'*eau R* de façon à obtenir une solution 0,008 M. Avant emploi, diluez à 0,0025 M avec de la *solution tampon phosphate pH 8,5 R*.

**Substrat chromogénique R5.** *1163200.*

Dissolvez du chlorhydrate de *N*-benzoyl-L-isoleucyl-L-glutamyl-glycyl-L-arginine-4-nitroanilide dans de l'*eau R* de façon à obtenir une solution 0,003 M.

**Substrat de plasma.** *1066200.*

Voir *Plasma (substrat de) R*.

**Substrat de plasma R1.** *1066201.*

Voir *Plasma (substrat de) R1*.

**Substrat de plasma R2.** *1066202.*

Voir *Plasma (substrat de) R2*.

**Substrat de plasma déficient en facteur V.** *1066300.*

Voir *Plasma (substrat de) déficient en facteur V R*.

**Suc gastrique artificiel.** *1039900.*

Dissolvez 2,0 g de *chlorure de sodium R* et 3,2 g de *poudre de pepsine R* dans de l'*eau R*. Ajoutez 80 mL d'*acide chlorhydrique 1 M* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

**Succinique (acide).** $C_4H_6O_4$. ($M_r$ 118,1). *1085600.* [110-15-6]. Acide butanedioïque.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores, solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : 184 °C à 187 °C.

**Sulfamique (acide).** $H_3NO_3S$. ($M_r$ 97,1). *1085900.* [5329-14-6].

Poudre cristalline ou cristaux blancs ou sensiblement blancs, facilement solubles dans l'eau, assez solubles dans l'acétone, dans l'éthanol à 96 pour cent et dans le méthanol.

F : environ 205 °C, avec décomposition.

**Sulfanilamide.** $C_6H_8N_2O_2S$. ($M_r$ 172,2). *1086100.* [63-74-1]. 4-Aminobenzènesulfonamide.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'eau bouillante, dans l'acétone, dans les solutions diluées d'acides et les solutions diluées d'hydroxydes alcalins, assez soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, pratiquement insoluble dans l'éther de pétrole.

F : environ 165 °C.

**Sulfanilique (acide).** $C_6H_7NO_3S$. ($M_r$ 173,2). *1086200.* [121-57-3]. Acide 4-aminobenzènesulfonique.

Cristaux incolores, assez solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution d'acide sulfanilique.** *1086203.*

Dissolvez 0,33 g d'*acide sulfanilique R* dans 75 mL d'*eau R* en chauffant doucement si nécessaire et complétez à 100 mL avec de l'*acide acétique glacial R*.

**Solution d'acide sulfanilique R1.** *1086201.*

Dissolvez 0,5 g d'*acide sulfanilique R* dans un mélange de 75 mL d'*acide acétique dilué R* et de 75 mL d'*eau R*.

**Solution d'acide sulfanilique diazoté.** *1086202.*

Dissolvez en chauffant 0,9 g d'*acide sulfanilique R* dans 9 mL d'*acide chlorhydrique R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*. Refroidissez 10 mL de cette solution dans de l'eau glacée et ajoutez 10 mL d'une solution de *nitrite de sodium R* à 45 g/L refroidie au préalable dans de l'eau glacée. Laissez reposer à 0 °C pendant 15 min (cette solution demeure stable à cette température pendant 3 jours) ; immédiatement avant l'emploi, ajoutez 20 mL d'une solution de *carbonate de sodium R* à 100 g/L.

**Sulfate dipotassique.** $K_2SO_4$. ($M_r$ 174,3). *1033100.* [7778-80-5]. Sulfate de dipotassium.

Cristaux incolores, solubles dans l'eau.

**Sulfate monopotassique.** $KHSO_4$. ($M_r$ 136,2). *1070100.* [7646-93-7]. Hydrogénosulfate de potassium.

Cristaux incolores, transparents et hygroscopiques, facilement solubles dans l'eau en donnant une réaction fortement acide.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Sulfathiazol.** $C_9H_9N_3O_2S_2$. ($M_r$ 255,3). *1086300.* [72-14-0]. 4-Amino-*N*-(thiazol-2-yl)benzènesulfonamide.

Poudre ou cristaux blancs ou blanc-jaune, très peu solubles dans l'eau, solubles dans l'acétone, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent. Le sulfathiazol se dissout dans les acides minéraux dilués et dans les solutions d'hydroxydes et de carbonates alcalins.

F : environ 200 °C.

**Sulfochromique (mélange).** *1019700.*

Solution saturée de *trioxyde de chrome R* dans l'*acide sulfurique R*.

**Sulfomolybdique (réactif) R2.** *1086400.*

Dissolvez environ 50 mg de *molybdate d'ammonium R* dans 10 mL d'*acide sulfurique R*.

**Sulfomolybdique (réactif) R3.** *1086500.*

Dissolvez en chauffant 2,5 g de *molybdate d'ammonium R* dans 20 mL d'*eau R*. Diluez 28 mL d'*acide sulfurique R* dans 50 mL d'*eau R*, puis refroidissez. Mélangez les 2 solutions et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

*Conservation* : en récipient en polyéthylène.

**Sulfosalicylique (acide).** $C_7H_6O_6S,2H_2O$. ($M_r$ 254,2). *1086600.* [5965-83-3]. Acide 2-hydroxy-5-sulfobenzoïque.

Poudre cristalline ou cristaux blancs ou sensiblement blancs, très solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 109 °C.

**Sulfureux (anhydride).** *1086700.* [7446-09-5].

Voir *Soufre (dioxyde de) R*.

**Sulfurique (acide).** $H_2SO_4$. ($M_r$ 98,1). *1086800.* [7664-93-9].

*Teneur* : 95,0 pour cent *m/m* à 97,0 pour cent *m/m*.

Liquide caustique, incolore, de consistance huileuse, très hygroscopique, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent, avec un fort échauffement.

$d_{20}^{20}$ : 1,834 à 1,837.

La solution à 10 g/L, fortement acide, donne les réactions des sulfates (*2.3.1*).

*Aspect de la substance.* L'acide sulfurique est limpide (*2.2.1*) et incolore (*2.2.2, Procédé II*).

*Substances oxydables.* Versez prudemment et en refroidissant 20 g d'acide sulfurique dans 40 mL d'*eau R*. Ajoutez 0,5 mL de *permanganate de potassium 0,002 M*. La coloration violacée persiste pendant au moins 5 min.

*Chlorures* : au maximum 0,5 ppm.

Versez prudemment, en refroidissant, 10 g d'acide sulfurique dans 10 mL d'*eau R* et complétez à 20 mL avec le même solvant après refroidissement. Ajoutez 0,5 mL de *solution de nitrate d'argent R2*. Laissez reposer à l'abri d'une lumière vive pendant 2 min. Si la solution présente une opalescence, celle-ci n'est pas plus prononcée que celle d'une solution témoin, préparée simultanément avec un mélange de 1 mL de *solution à 5 ppm de chlorure (Cl) R*, de 19 mL d'*eau R* et de 0,5 mL de *solution de nitrate d'argent R2*.

*Nitrates* : au maximum 0,5 ppm.

Versez prudemment, en refroidissant, 50 g ou 27,2 mL d'acide sulfurique dans 15 mL d'*eau R*. Ajoutez 0,2 mL d'une solution récemment préparée de *brucine R* à 50 g/L dans l'*acide acétique glacial R*. Après 5 min, la solution n'est pas plus fortement colorée qu'une solution témoin préparée simultanément dans les mêmes conditions par mélange de 12,5 mL d'*eau R*, de 50 g d'*acide sulfurique exempt d'azote R*, de 2,5 mL de *solution de nitrate à 10 ppm ($NO_3$) R* et de 0,2 mL de la solution de *brucine R* à 50 g/L dans l'*acide acétique glacial R*.

*Ammonium* : au maximum 2 ppm.

Versez prudemment, en refroidissant, 2,5 g d'acide sulfurique dans de l'*eau R* et complétez à 20 mL avec le même solvant. Refroidissez et ajoutez, goutte à goutte, 10 mL de solution d'*hydroxyde de sodium R* à 200 g/L, puis 1 mL de *solution alcaline de tétraiodomercurate de potassium R*. La solution est moins fortement colorée qu'une solution témoin préparée simultanément dans les mêmes conditions par mélange de 5 mL de *solution à 1 ppm d'ammonium ($NH_4$) R*, de 15 mL d'*eau R*, de 10 mL de solution d'*hydroxyde de sodium R* à 200 g/L et de 1 mL de *solution alcaline de tétraiodomercurate de potassium R*.

*Arsenic* (*2.4.2, Procédé A*) : au maximum 0,02 ppm.

Evaporez prudemment un mélange de 50 g d'acide sulfurique et de 3 mL d'*acide nitrique R* jusqu'à environ 10 mL et refroidissez. Au résidu, ajoutez 20 mL d'*eau R* et concentrez à 5 mL. Préparez le témoin avec 1,0 mL de *solution à 1 ppm d'arsenic (As) R*.

*Fer* (*2.4.9*) : au maximum 1 ppm.

Dissolvez, en chauffant légèrement, le résidu de calcination dans 1 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R*. Prélevez 5 mL de solution et complétez à 10 mL avec de l'*eau R*.

*Métaux lourds* (*2.4.8*) : au maximum 2 ppm.

Prélevez 10 mL de la solution préparée pour l'essai du fer et complétez à 20 mL avec de l'*eau R*. 12 mL de solution satisfont à l'essai A. Préparez la solution témoin avec la *solution à 2 ppm de plomb (Pb) R*.

*Résidu à la calcination* : au maximum 0,001 pour cent, déterminé avec précaution sur 100 g d'acide sulfurique par évaporation dans un petit creuset, sur une flamme nue, et par calcination au rouge sombre.

*Dosage.* Pesez exactement une fiole à bouchon rodé contenant 30 mL d'*eau R*. Introduisez 0,8 mL d'acide sulfurique, refroidissez et pesez de nouveau. Titrez par l'*hydroxyde de sodium 1 M* en présence de 0,1 mL de *solution de rouge de méthyle R*.

1 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* correspond à 49,04 mg de $H_2SO_4$.

*Conservation* : en récipient de verre muni d'un bouchon rodé ou dans tout autre récipient en matière inattaquable.

**Acide sulfurique alcoolique 2,5 M.** *1086801.*

A 60 mL d'*éthanol anhydre R*, ajoutez prudemment et en refroidissant 14 mL d'*acide sulfurique R*. Laissez refroidir et complétez à 100 mL avec de l'*éthanol anhydre R*. Préparez extemporanément.

**Acide sulfurique alcoolique 0,25 M.** *1086802.*

Prélevez 10 mL d'*acide sulfurique alcoolique 2,5 M R* et complétez à 100 mL avec de l'*éthanol anhydre R*. Préparez extemporanément.

**Acide sulfurique dilué.** *1086804.*

*Teneur* : 98 g/L de $H_2SO_4$.

A 60 mL d'*eau R,* ajoutez 5,5 mL d'*acide sulfurique R.* Laissez refroidir et complétez à 100 mL avec le même solvant.

*Dosage.* Dans une fiole à bouchon rodé contenant 30 mL d'*eau R,* introduisez 10,0 mL d'acide sulfurique dilué. Titrez par l'*hydroxyde de sodium 1 M* en présence de 0,1 mL de *solution de rouge de méthyle R.*

1 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* correspond à 49,04 mg de $H_2SO_4$.

**Acide sulfurique exempt d'azote.** *1086806.*

Satisfait aux spécifications de l'*acide sulfurique R* et à la spécification supplémentaire suivante.

*Nitrates.* A 5 mL d'*eau R,* ajoutez avec précaution 45 mL d'acide sulfurique exempt d'azote, laissez refroidir à 40 °C et ajoutez 8 mg de *diphénylbenzidine R.* La solution est faiblement rose ou bleu très pâle.

**Acide sulfurique exempt d'azote R1.** *1086808.*

Satisfait aux spécifications de l'*acide sulfurique exempt d'azote R* et à la spécification supplémentaire suivante.

*Teneur* : 95,0 pour cent *m/m* à 95,5 pour cent *m/m.*

**Acide sulfurique exempt de métaux lourds.** *1086807.*

Satisfait aux spécifications de l'*acide sulfurique R* et aux teneurs maximales en métaux lourds suivantes.

As : 0,005 ppm.

Cd : 0,002 ppm.

Cu : 0,001 ppm.

Fe : 0,05 ppm.

Hg : 0,005 ppm.

Ni : 0,002 ppm.

Pb : 0,001 ppm.

Zn : 0,005 ppm.

**Réactif à l'acide sulfurique et au formaldéhyde.** *1086805.*

Mélangez 2 mL de *solution de formaldéhyde R* avec 100 mL d'*acide sulfurique R.*

**Solution alcoolique d'acide sulfurique.** *1086803.*

A 60 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* ajoutez prudemment et en refroidissant 20 mL d'*acide sulfurique R.* Laissez refroidir et complétez à 100 mL avec de l'*éthanol à 96 pour cent R.* Préparez extemporanément.

**Swertiamarine.** $C_{16}H_{22}O_{10}$. ($M_r$ 374,3). *1163600.* [17388-39-5]. Swertiamaroside. (4*R*,5*R*,6*S*)-5-Ethényl-6-(β-D-glucopyranosyloxy)-4a-hydroxy-4,4a,5,6-tétrahydro-1*H*,3*H*-pyrano[3,4-*c*]pyran-1-one.

**Tagatose.** $C_6H_{12}O_6$. ($M_r$ 180,16). *1111000.* [87-81-0]. D-*lyxo*-Hexulose.

Poudre blanche ou sensiblement blanche.

$[\alpha]_D^{20}$ : – 2,3 déterminé avec une solution à 21,9 g/L.

F : 134 °C à 135 °C.

**Talc.** *1087000.* [14807-96-6].

Voir *Talc (0438).*

**Tamis moléculaire.** *1056600.*

Tamis moléculaire composé d'aluminosilicate de sodium. Il se présente sous forme de particules sphériques d'une porosité de 0,4 nm et d'un diamètre de 2 mm.

**Tamis moléculaire pour chromatographie.** *1129700.*

Tamis moléculaire composé d'aluminosilicate de sodium. La taille des pores est indiquée après le nom du réactif dans les essais où il est utilisé. Si nécessaire, la taille des particules est aussi indiquée.

**Tampon concentré pour échantillons SDS-PAGE.** *1115000.*

Dissolvez 1,89 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R,* 5,0 g de *laurylsulfate de sodium R* et 50 mg de *bleu de bromophénol R* dans de l'*eau R.* Ajoutez 25,0 mL de *glycérol R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R.* Ajustez à pH 6,8 avec de l'*acide chlorhydrique R* et complétez à 125 mL avec de l'*eau R.*

**Tampon concentré pour échantillons SDS-PAGE sous conditions réductrices.** *1122100.*

Dissolvez 3,78 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R,* 10,0 g de *dodécylsulfate de sodium R* et 100 mg de *bleu de bromophénol R* dans de l'*eau R.* Ajoutez 50,0 mL de *glycérol R* et complétez à 200 mL avec de l'*eau R.* Ajoutez 25,0 mL de *2-mercaptoéthanol R.* Ajustez à pH 6,8 avec de l'*acide chlorhydrique R* et complétez à 250,0 mL avec de l'*eau R.*

Le dithiothréitol peut également être utilisé comme agent réducteur, à la place du 2-mercaptoéthanol. Dans ce cas, procédez comme suit : dissolvez 3,78 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R,* 10,0 g de *dodécylsulfate de sodium R* et 100 mg de *bleu de bromophénol R* dans de l'*eau R.* Ajoutez 50,0 mL de *glycérol R* et complétez à 200 mL avec de l'*eau R.* Ajustez à pH 6,8 avec de l'*acide chlorhydrique R* et complétez à 250,0 mL avec de l'*eau R.* Immédiatement avant emploi, ajoutez du *dithiothréitol R* de façon à obtenir une concentration finale de 100 mM.

**Tampon d'électrophorèse SDS-PAGE.** *1114900.*

Dissolvez 151,4 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R,* 721,0 g de *glycine R* et 50,0 g de *laurylsulfate de sodium R* dans de l'*eau R* et complétez à 5000 mL avec le même solvant. Immédiatement avant utilisation, diluez au 1/10 avec de l'*eau R.* Mesurez le pH (*2.2.3*) de la solution diluée. Le pH est de 8,1 à 8,8.

**Tannique (acide).** *1087100.* [1401-55-4].

Poudre amorphe ou lamelles brillantes, jaunâtres, ou brun clair, très solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent, solubles dans l'acétone.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Tartrique (acide).** *1087200.* [87-69-4].

Voir *Acide tartrique (0460).*

**Taxifoline.** $C_{15}H_{12}O_7$. ($M_r$ 304,3). *1151800.* [480-18-2]. (2*R*,3*R*)-2-(3,4-Dihydroxyphényl)-3,5,7-trihydroxy-2,3-dihydro-4*H*-1-benzopyran-4-one.

Poudre blanche à sensiblement blanche, peu soluble dans l'éthanol anhydre.

*Absorbance* (*2.2.25*). Une solution dans l'*éthanol anhydre R* présente un maximum d'absorption à 290 nm.

**Tecnazène.** $C_6HCl_4NO_2$. ($M_r$ 260,9). *1132400.* [117-18-0].

F : 99 °C à 100 °C.

Eb : environ 304 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/μL dans le cyclohexane) peut être utilisée.

**α-Terpinène.** $C_{10}H_{16}$. ($M_r$ 136,2). *1140300.* [99-86-5]. 1-Isopropyl-4-méthylcyclohexa-1,3-diène.

Liquide limpide, presque incolore.

$d_4^{20}$ : environ 0,837.

$n_D^{20}$ : environ 1,478.

Eb : environ 174 °C.

*L'α-terpinène utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de mélaleuca (1837).*

*Teneur* : au minimum 90 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**γ-Terpinène.** $C_{10}H_{16}$. ($M_r$ 136,2). *1115900*. [99-85-4]. 1-Isopropyl-4-méthylcyclohexa-1,4-diène.

Liquide huileux.

*Le γ-terpinène utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage*. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de menthe poivrée (0405)*.

*Solution à examiner.* Le γ-terpinène à examiner.

*Teneur* : au minimum 93,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Terpinén-4-ol.** $C_{10}H_{18}O$. ($M_r$ 154,2). *1116000*. [562-74-3]. 4-Méthyl-1-(1-méthyléthyl)cyclohex-3-én-1-ol. *p*-Menth-1-én-4-ol.

Liquide huileux, incolore.

*Le terpinén-4-ol utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage*. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de lavande (1338)*.

*Solution à examiner.* Le terpinén-4-ol à examiner.

*Teneur* : au minimum 90,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**α-Terpinéol.** $C_{10}H_{18}O$. ($M_r$ 154,2). *1087300*. [98-55-5]. (*RS*)-2-(4-Méthylcyclohex-3-ényl)-2-propanol.

Cristaux incolores, pratiquement insolubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,935.

$n_D^{20}$ : environ 1,483.

$[\alpha]_D^{20}$ : environ 92,5.

F : environ 35 °C.

*β-Terpinéol* : 1 à 3 pour cent.

*L'α-terpinéol utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage*. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle d'anis (0804)*.

*Solution à examiner.* Solution d'α-terpinéol à 100 g/L dans de l'*hexane R*.

*Teneur* : au minimum 97,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Terpinolène.** $C_{10}H_{16}$. ($M_r$ 136,2). *1140400*. [586-62-9]. *p*-Mentha-1,4(8)-diène. 4-Isopropylidène-1-méthylcyclohexène.

Liquide limpide, presque incolore.

$d_4^{20}$ : environ 0,863.

$n_D^{20}$ : environ 1,488.

Eb : environ 184 °C.

*Le terpinolène utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage*. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de mélaleuca (1837)*.

*Teneur* : au minimum 90 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Terre d'infusoires.** *1025900*. [91053-39-3].

Poudre blanche ou sensiblement blanche, finement granuleuse, constituée par des frustules siliceuses de diatomées fossiles ou des débris de celles-ci, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent. L'examen microscopique (500 ×) permet d'identifier cette substance.

**Terre d'infusoires pour chromatographie en phase gazeuse.** *1026000*.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, finement granuleuse, constituée par des frustules siliceuses de diatomées fossiles ou des débris de celles-ci, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent. L'examen microscopique (500 ×) permet d'identifier cette substance. Celle-ci est purifiée par traitement à l'*acide chlorhydrique R*, puis lavage à l'*eau R*.

*Dimension des particules.* La proportion de terre d'infusoires restant sur un tamis n° 180 est au maximum de 5 pour cent. La proportion de terre d'infusoires passant à travers un tamis n° 125 est au maximum de 10 pour cent.

**Terre d'infusoires pour chromatographie en phase gazeuse R1.** *1026100*.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, finement granuleuse, constituée par des frustules siliceuses de diatomées fossiles ou des débris de celles-ci, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent. L'examen microscopique (500 ×) permet d'identifier cette substance. Celle-ci est purifiée par traitement à l'*acide chlorhydrique R*, puis lavage à l'*eau R*.

*Dimension des particules.* La proportion de terre d'infusoires restant sur un tamis n° 250 est au maximum de 5 pour cent. La proportion de terre d'infusoires passant à travers un tamis n° 180 est au maximum de 10 pour cent.

**Terre d'infusoires pour chromatographie en phase gazeuse R2.** *1026200*.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, finement granuleuse, ayant une surface spécifique de 0,5 $m^2/g$ environ et constituée par des frustules siliceuses de diatomées fossiles ou des débris de celles-ci, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent. L'examen microscopique (500 ×) permet d'identifier la substance. Celle-ci est purifiée par traitement à l'*acide chlorhydrique R*, puis lavage à l'*eau R*.

*Dimension des particules.* La proportion de terre d'infusoires restant sur un tamis n° 180 est au maximum de 5 pour cent. La proportion de terre d'infusoires passant à travers un tamis n° 125 est au maximum de 10 pour cent.

**Terre d'infusoires silanisée pour chromatographie en phase gazeuse.** *1026300*.

*Terre d'infusoires pour chromatographie en phase gazeuse R* silanisée par le diméthyldichlorosilane ou par tout autre agent de silanisation.

**Terre d'infusoires silanisée pour chromatographie en phase gazeuse R1.** *1026400*.

Préparée à partir de brique réfractaire broyée, et silanisée par le diméthyldichlorosilane ou par tout autre agent de silanisation. Celle-ci est purifiée par traitement à l'*acide chlorhydrique R*, puis lavage à l'*eau R*.

**Testostérone.** *1116100*. [58-22-0].

Voir *Testostérone (1373)*.

**Testostérone (propionate de).** *1087400*. [57-85-2].

Voir *Propionate de testostérone (0297)*.

**1,2,3,4-Tétra-*O*-acétyl-β-D-glucopyranose.** $C_{14}H_{20}O_{10}$. ($M_r$ 348,3). *1172600*. [13100-46-4].

Poudre blanche ou sensiblement blanche, soluble dans l'eau en chauffant doucement.

$[\alpha]_D^{20}$ : + 11, déterminé avec une solution à 6 g/L dans le *chloroforme R*.

F : 126 °C à 128 °C.

**1,3,4,6-Tétra-*O*-acétyl-β-D-mannopyranose.** $C_{14}H_{20}O_{10}$. ($M_r$ 348,3). *1174100*. [18968-05-3].

Poudre ou cristaux incolores ou blancs.

F : 160 °C à 161 °C.

$[\alpha]_D^{20}$ : – 68, déterminé avec une solution à 7 g/L dans le *chlorure de méthylène R*.

**Tétrabutylammonium (bromure de).** $C_{16}H_{36}BrN$. ($M_r$ 322,4). *1087500*. [1643-19-2].

Cristaux blancs ou sensiblement blancs.

F : 102 °C à 104 °C.

**Tétrabutylammonium (dihydrogénophosphate de).** $C_{16}H_{38}NO_4P$. ($M_r$ 339,5). *1087600.* [5574-97-0].

Poudre blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique.

*pH* (*2.2.3*) : environ 7,5 pour une solution à 170 g/L.

*Absorbance* (*2.2.25*) : environ 0,1, déterminé à 210 nm avec une solution à 170 g/L.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Tétrabutylammonium (hydrogénosulfate de).** $C_{16}H_{37}NO_4S$. ($M_r$ 339,5). *1087700.* [32503-27-8].

Poudre cristalline ou cristaux incolores, facilement solubles dans l'eau et dans le méthanol.

F : 169 °C à 173 °C.

*Absorbance* (*2.2.25*) : au maximum 0,05, déterminé entre 240 nm et 300 nm avec une solution à 50 g/L.

**Tétrabutylammonium (hydrogénosulfate de) R1.** *1087701.*

Satisfait aux spécifications de l'*hydrogénosulfate de tétrabutylammonium R* et à la spécification supplémentaire suivante.

*Absorbance* (*2.2.25*) : au maximum 0,02, déterminé entre 215 nm et 300 nm avec une solution à 50 g/L.

**Tétrabutylammonium (hydroxyde de).** $C_{16}H_{37}NO,30H_2O$. ($M_r$ 800). *1087800.* [2052-49-5].

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent de $C_{16}H_{37}NO,30H_2O$.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs, solubles dans l'eau.

*Dosage.* Dissolvez 1,000 g d'hydroxyde de tétrabutylammonium dans 100 mL d'*eau R*. Titrez immédiatement par l'*acide chlorhydrique 0,1 M*. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (*2.2.20*). Effectuez un titrage à blanc.

1 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* correspond à 80,0 mg de $C_{16}H_{37}NO,30H_2O$.

**Solution d'hydroxyde de tétrabutylammonium (104 g/L).** *1087801.*

Une solution contenant 104 g/L de $C_{16}H_{37}NO$ ($M_r$ 259,5), préparée par dilution d'un réactif de qualité approprié.

**Solution d'hydroxyde de tétrabutylammonium (400 g/L).** *1087802.*

Une solution contenant 400 g/L de $C_{16}H_{37}NO$ ($M_r$ 259,5) de qualité approprié.

**Tétrabutylammonium (iodure de).** $C_{16}H_{36}IN$. ($M_r$ 369,4). *1087900.* [311-28-4].

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent.

Poudre cristalline ou cristaux blancs ou légèrement colorés, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Cendres sulfuriques* (*2.4.14*) : au maximum 0,02 pour cent.

*Dosage.* Dissolvez 1,200 g d'iodure de tétrabutylammonium dans 30 mL d'*eau R*. Ajoutez 50,0 mL de *nitrate d'argent 0,1 M* et 5 mL d'*acide nitrique dilué R*. Titrez l'excès de nitrate d'argent par le *thiocyanate d'ammonium 0,1 M* en présence de 2 mL de *solution de sulfate ferrique et d'ammonium R2*.

1 mL de *nitrate d'argent 0,1 M* correspond à 36,94 mg de $C_{16}H_{36}IN$.

**Tétrachloréthane.** $C_2H_2Cl_4$. ($M_r$ 167,9). *1088000.* [79-34-5]. 1,1,2,2-Tétrachloroéthane.

Liquide limpide et incolore, peu soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,59.

$n_D^{20}$ : environ 1,495.

*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : au minimum 95 pour cent distillent de 145 °C à 147 °C.

**Tétrachlorvinphos.** $C_{10}H_9Cl_4O_4P$. ($M_r$ 366,0). *1132500.* [22248-79-9].

F : environ 95 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans l'isooctane) peut être utilisée.

**Tétracos-15-énoïque (ester méthylique d'acide).** $C_{25}H_{48}O_2$. ($M_r$ 380,7). *1144800.* [2733-88-2]. Ester méthylique d'acide 15-tétracosaénoïque. Tétracos-15-énoate de méthyle. Ester méthylique de l'acide nervonique.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent, déterminé par chromatographie en phase gazeuse.

Liquide.

**Tétracycline (chlorhydrate de).** *1147000.*

Voir *Chlorhydrate de tétracycline (0210).*

**Tétradécane.** $C_{14}H_{30}$. ($M_r$ 198,4). *1088200.* [629-59-4]. *n*-Tétradécane.

*Teneur* : au minimum 99,5 pour cent *m/m*.

Liquide incolore.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,76.

$n_D^{20}$ : environ 1,429.

Eb : environ 252 °C.

F : environ – 5 °C.

**Tétradécylammonium (bromure de).** $C_{40}H_{84}BrN$. ($M_r$ 659). *1088300.* [14937-42-9]. Bromure de tétrakis(décyl)ammonium.

Poudre cristalline ou cristaux blancs ou faiblement colorés.

F : 88 °C à 89 °C.

**2,2,3,3-Tétradeutério-4,4-diméthyl-4-silapentanoate de sodium.** *1084300.*

Voir *Sodium (tétradeutériodiméthylsilapentanoate de) R.*

**Tétraéthylammonium (hydrogénosulfate de).** $C_8H_{21}NO_4S$. ($M_r$ 227,3). *1116200.* [16873-13-5].

Poudre hygroscopique.

F : environ 245 °C.

**Tétraéthylammonium (hydroxyde de), solution d'.** $C_8H_{21}NO$. ($M_r$ 147,3). *1100300.* [77-98-5].

Solution à 200 g/L.

Liquide incolore, fortement alcalin.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,01.

$n_D^{20}$ : environ 1,372.

Qualité appropriée à la CLHP.

**Tétraéthylène pentamine.** $C_8H_{23}N_5$. ($M_r$ 189,3). *1102000.* [112-57-2]. 3,6,9-Triazaundécane-1,11-diamine.

Liquide incolore, soluble dans l'acétone.

$n_D^{20}$ : environ 1,506.

*Conservation* : à l'abri de l'humidité et de la chaleur.

**Tétraheptylammonium (bromure de).** $C_{28}H_{60}BrN$. ($M_r$ 490,7). *1088400.* [4368-51-8].

Poudre cristalline ou cristaux, blancs ou faiblement colorés.

F : 89 °C à 91 °C.

**Tétrahexylammonium (bromure de).** $C_{24}H_{52}BrN$. ($M_r$ 434,6). *1152500.* [4328-13-6]. Bromure de *N,N,N*-trihexylhexan-1-aminium.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique.

F : environ 100 °C.

**Tétrahexylammonium (hydrogénosulfate de).** $C_{24}H_{53}NO_4S$. ($M_r$ 451,8). *1116300.* [32503-34-7]. Hydrogénosulfate de *N,N,N*-trihexylhexan-1-aminium.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs.

F : 100 °C à 102 °C.

**Tétrahydrofurane.** $C_4H_8O$. ($M_r$ 72,1). *1088500.* [109-99-9]. Oxyde de tétraméthylène.

Liquide limpide et incolore, inflammable, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,89.

*Ne jamais distiller si le tétrahydrofurane ne satisfait pas à l'essai des peroxydes.*

*Peroxydes.* Dans une éprouvette à bouchon rodé d'une capacité de 12 mL et d'un diamètre de 1,5 cm environ, introduisez 8 mL de *solution amidonnée d'iodure de potassium R*. Remplissez entièrement avec le tétrahydrofurane à examiner, agitez fortement et abandonnez à l'abri de la lumière pendant 30 min. Il ne se développe aucune coloration.

*Le tétrahydrofurane utilisé en spectrophotométrie satisfait également aux spécifications suivantes.*

*Transmittance minimale* (*2.2.25*) déterminée en utilisant l'*eau R* comme liquide de compensation : 20 pour cent à 255 nm, 80 pour cent à 270 nm, 98 pour cent à 310 nm.

**Tétrahydrofurane pour chromatographie R.** *1147100.*

Satisfait aux spécifications du *tétrahydrofurane R* et aux spécifications suivantes :

$d_4^{20}$ = 0,8892.

Eb : environ 66 °C.

*Teneur* : au minimum 99,8 pour cent.

**Tétrakis[3-[3,5-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-hydroxyphényl]propanoate] de 2,2′-bis(hydroxyméthyl)propane-1,3-diol.** *1062400.* [6638-19-8].

Voir *Pentaérythrityle [tétrakis[3-[3,5-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-hydroxyphényl]]propanoate de] R.*

**α-Tétralone.** $C_{10}H_{10}O$. ($M_r$ 146,2). *1171800.* [529-34-0]. 1-Oxotétraline. 3,4-Dihydronaphtalén-1(2*H*)-one.

Eb : environ 115 °C.

F : environ 5 °C.

**Tétraméthylammonium (bromure de).** $C_4H_{12}BrN$. ($M_r$ 154,1). *1156600.* [64-20-0]. Bromure de *N,N,N*-triméthylméthanaminium.

Cristaux blancs ou légèrement jaunes, facilement solubles dans l'eau.

F : environ 285 °C, avec décomposition.

**Tétraméthylammonium (chlorure de).** $C_4H_{12}ClN$. ($M_r$ 109,6). *1100400.* [75-57-0].

Cristaux incolores, solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 300 °C, avec décomposition.

**Tétraméthylammonium (hydrogénosulfate de).** $C_4H_{13}NO_4S$. ($M_r$ 171,2). *1116400.* [80526-82-5].

Poudre hygroscopique.

F : environ 295 °C.

**Tétraméthylammonium (hydroxyde de).** $C_4H_{13}NO,5H_2O$. ($M_r$ 181,2). *1122800.* [10420-65-4]. Hydroxyde de tétraméthylammonium pentahydraté.

Qualité appropriée à la CLHP.

**Tétraméthylammonium (hydroxyde de), solution d'.** *1088600.* [75-59-2].

*Teneur* : au minimum 10,0 pour cent *m/m* de $C_4H_{13}NO$ ($M_r$ 91,2).

Liquide limpide, incolore ou jaune très pâle, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent.

*Dosage.* A 1,000 g de solution d'hydroxyde de tétraméthylammonium, ajoutez 50 mL d'*eau R* et titrez par l'*acide sulfurique 0,05 M* en présence de *solution de rouge de méthyle R*.

1 mL d'*acide sulfurique 0,05 M* correspond à 9,12 mg de $C_4H_{13}NO$.

**Solution diluée d'hydroxyde de tétraméthylammonium.** *1088601.*

Prélevez 10 mL de *solution d'hydroxyde de tétraméthylammonium R* et complétez à 100 mL avec de l'*alcool exempt d'aldéhyde R*. Préparez extemporanément.

**Tétraméthylbenzidine.** $C_{16}H_{20}N_2$. ($M_r$ 240,3). *1132600.* [54827-17-7]. 3,3′,5,5′-Tétraméthylbiphényle-4,4′-diamine.

Poudre, pratiquement insoluble dans l'eau, très soluble dans le méthanol.

F : environ 169 °C.

**1,1,3,3-Tétraméthylbutylamine.** $C_8H_{19}N$. ($M_r$ 129,3). *1141500.* [107-45-9]. 2-Amino-2,4,4-triméthylpentane.

Liquide clair incolore.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,805.

$n_D^{20}$ : environ 1,424.

Eb : environ 140 °C.

**Tétraméthyldiaminodiphénylméthane.** $C_{17}H_{22}N_2$. ($M_r$ 254,4). *1088700.* [101-61-1]. 4,4′-Methylènebis-(*N,N*-diméthylaniline).

Cristaux ou feuillets blancs ou blanc-bleu, pratiquement insolubles dans l'eau, peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent, solubles dans les acides minéraux.

F : environ 90 °C.

**Réactif au tétraméthyldiaminodiphénylméthane.** *1088701.*

*Solution A.* Dissolvez 2,5 g de *tétraméthyldiaminodiphénylméthane R* dans 10 mL d'*acide acétique glacial R* et ajoutez 50 mL d'*eau R*.

*Solution B.* Dissolvez 5 g d'*iodure de potassium R* dans 100 mL d'*eau R*.

*Solution C.* Dissolvez 0,30 g de *ninhydrine R* dans 10 mL d'*acide acétique glacial R* et ajoutez 90 mL d'*eau R*.

Mélangez la solution A, la solution B et 1,5 mL de solution C.

**Tétraméthyléthylènediamine.** $C_6H_{16}N_2$. ($M_r$ 116,2). *1088800.* [110-18-9]. *N,N,N′,N′*-Tétraméthyléthylènediamine.

Liquide incolore, miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,78.

$n_D^{20}$ : environ 1,418.

Eb : environ 121 °C.

**Tétraméthylsilane.** $C_4H_{12}Si$. ($M_r$ 88,2). *1088900.* [75-76-3]. TMS.

Liquide limpide, incolore, très peu soluble dans l'eau, soluble dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,64.

$n_D^{20}$ : environ 1,358.

Eb : environ 26 °C.

*Le tétraméthylsilane destiné à la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire satisfait en plus à l'essai suivant.*

Dans le spectre de résonance magnétique nucléaire d'une solution à environ 10 pour cent *V/V* de tétraméthylsilane dans le *chloroforme deutérié R*, il ne se produit, mis à part les signaux qui sont dus aux bandes secondaires de rotation et au chloroforme, aucun signal étranger dont l'intensité est supérieure à celle des bandes satellites dues au carbone-13, qui se trouvent à une distance de 59,1 Hz de chaque côté du signal principal du tétraméthylsilane.

**Tétramminecuivre (solution ammoniacale de).** *1022600.*

Dissolvez 34,5 g de *sulfate de cuivre R* dans 100 mL d'*eau R*. Ajoutez, goutte à goutte et en agitant, de l'*ammoniaque concentrée R* jusqu'à ce que le précipité formé se dissolve entièrement. En maintenant une température inférieure à 20 °C, ajoutez, goutte à goutte et en agitant, 30 mL de *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R*. Filtrez le précipité sur un entonnoir en verre fritté (40) (*2.1.2*). Lavez à l'*eau R* jusqu'à

obtention d'un filtrat limpide. Reprenez le précipité par 200 mL d'*ammoniaque concentrée R*. Filtrez sur verre fritté (*2.1.2*) et répétez la filtration afin de dissoudre le résidu au maximum.

**Tétrandrine.** $C_{38}H_{42}N_2O_6$. ($M_r$ 623). *1178500.* [518-34-3].

**Tétrapropylammonium (chlorure de).** $C_{12}H_{28}ClN$. ($M_r$ 221,8). *1151900.* [5810-42-4].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, assez soluble dans l'eau.

F : environ 241 °C.

**Tétrazolium (bromure de).** $C_{18}H_{16}BrN_5S$. ($M_r$ 414,3). *1152700.* [298-93-1]. Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium. MTT.

**Tétrazolium (sel de).** $C_{20}H_{17}N_5O_6S_2$. ($M_r$ 487,5). *1174200.* [138169-43-4]. Sel interne du 5-(3-carboxyméthoxyphényl)-3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2-(4-sulfophényl)-2*H*-tétrazolium. MTS.

**Thalleux (sulfate).** $Tl_2SO_4$. ($M_r$ 504,8). *1089100.* [7446-18-6]. Sulfate de dithallium.

Prismes rhomboédriques blancs ou sensiblement blancs, peu solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Thébaïne.** $C_{19}H_{21}NO_3$. ($M_r$ 311,4). *1089200.* [115-37-7]. (5R,9R,13S)-4,5-Epoxy-3,6-diméthoxy-9a-méthylmorphina-6,8-diène.

Poudre cristalline, blanche ou jaune pâle, très peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol anhydre chaud et dans le toluène.

F : environ 193 °C.

*Chromatographie* (*2.2.27*). Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications de l'identification B dans la monographie *Opium brut (0777)* : déposez sur la plaque, en bande de 20 mm sur 3 mm, 20 µL d'une solution de thébaïne à 0,5 g/L ; le chromatogramme présente une seule bande rouge orangé ou rouge, d'un $R_F$ d'environ 0,5.

**Théobromine.** *1138800.* [83-67-0].

Voir *Théobromine (0298).*

**Théophylline.** *1089300.* [58-55-9].

Voir *Théophylline (0299).*

**Thiamazol.** $C_4H_6N_2S$. ($M_r$ 114,2). *1089400.* [60-56-0]. Méthimazol. 1-Méthyl-1*H*-imidazole-2-thiol.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, facilement soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans le chlorure de méthylène.

F : environ 145 °C.

**2-(2-Thiényl)acétique (acide).** $C_6H_6O_2S$. ($M_r$ 142,1). *1089500.* [1918-77-0].

Poudre brune.

F : environ 65 °C.

**Thioacétamide.** $C_2H_5NS$. ($M_r$ 75,1). *1089600.* [62-55-5].

Poudre cristalline ou cristaux incolores, facilement solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 113 °C.

**Réactif au thioacétamide.** *1089601.*

A 0,2 mL de *solution de thioacétamide R*, ajoutez 1 mL d'un mélange de 5 mL d'*eau R*, de 15 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* et de 20 mL de *glycérol à 85 pour cent R*. Chauffez dans un bain-marie pendant 20 s. Préparez extemporanément.

**Solution de thioacétamide.** *1089602.*

Solution à 40 g/L.

**Thiobarbiturique (acide).** $C_4H_4N_2O_2S$. ($M_r$ 144,2). *1111200.* [504-17-6]. 4,6-Dihydroxy-2-sulfanylpyrimidine.

**Thiodiéthylèneglycol.** $C_4H_{10}O_2S$. ($M_r$ 112,2). *1122900.* [111-48-8]. Sulfure de di(2-hydroxyéthyle).

Liquide visqueux, incolore ou jaunâtre.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,18.

**Thioglycolique (acide).** $C_2H_4O_2S$. ($M_r$ 92,1). *1089700.* [68-11-1]. Acide 2-mercaptoacétique.

Liquide incolore, miscible à l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Thiomalique (acide).** $C_4H_6O_4S$. ($M_r$ 150,2). *1161600.* [70-49-5]. Acide (2*RS*)-2-sulfanylbutanedioïque.

F : 150 °C à 152 °C.

**Thiomersal.** $C_9H_9HgNaO_2S$. ($M_r$ 404,8). *1089800.* [54-64-8]. Mercurothiolate de sodium. 2-[(Ethylmercurio)thio]benzoate de sodium.

Poudre cristalline, légère, blanc-jaune, très soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Thiourée.** $CH_4N_2S$. ($M_r$ 76,1). *1089900.* [62-56-6].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, ou cristaux, solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 178 °C.

**Thréonine.** *1090000.* [72-19-5].

Voir *Thréonine (1049).*

**Thrombine bovine.** *1090200.* [9002-04-4].

Une préparation d'une enzyme obtenue à partir de plasma bovin et qui transforme le fibrinogène en fibrine.

Poudre blanc-jaune.

*Conservation* : à une température inférieure à 0 °C.

**Thrombine humaine.** *1090100.* [9002-04-4].

Thrombine humaine desséchée. La thrombine humaine desséchée est une préparation d'une enzyme qui transforme le fibrinogène humain en fibrine. Elle est obtenue à partir de plasma humain liquide et peut être préparée par précipitation avec des sels appropriés et des solvants organiques dans des conditions contrôlées de pH, de concentration ionique et de température.

Poudre blanc-jaune, facilement soluble dans une solution de chlorure de sodium à 9 g/L en donnant une solution trouble, jaune pâle.

*Conservation* : en récipient stérile et scellé, sous azote, à l'abri de la lumière et à une température inférieure à 25 °C.

**Solution de thrombine humaine.** *1090101.*

Reconstituez la *thrombine humaine R* selon les indications du fabricant et diluez avec une *solution tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane-chlorure de sodium pH 7,4 R*, pour obtenir une solution à 5 UI/mL.

**Solution de thrombine humaine R1.** *1090102.*

Reconstituez la *thrombine humaine R* selon les indications du fabricant et diluez à 2,5 UI/mL avec de la *solution tampon phosphate pH 6,5 R*.

**Thromboplastine.** *1090300.*

Préparation contenant les composants glycoprotéique et phospholipidique membranaires du facteur tissulaire, obtenue par purification à partir de tissus cérébraux animaux (de lapin généralement) ou de placenta humain, ou produite par la méthode dite de l'ADN recombinant avec addition de phospholipides. La préparation est formulée pour une utilisation en routine dans la détermination du temps de Quick, et peut contenir du calcium.

**Thuyone.** $C_{10}H_{16}O$. ($M_r$ 152,2). *1116500.* [76231-76-0]. 4-Méthyl-1-(1-méthyléthyl)bicyclo[3.1.0]hexan-3-one..

Liquide incolore ou sensiblement incolore, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans de nombreux solvants organiques.

**Thymidine.** $C_{10}H_{14}N_2O_5$. ($M_r$ 242,2). *1158900.* 1-(2-Désoxy-β-D-*érythro*-pentofuranosyl)-5-méthylpyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione.

Aiguilles, solubles dans l'eau, dans l'éthanol à 96 pour cent chaud et dans l'acide acétique glacial.

**Thymine.** $C_5H_6N_2O_2$. ($M_r$ 126,1). *1090400.* [65-71-4]. 5-Méthylpyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione.

Aiguilles courtes ou plaquettes, peu solubles dans l'eau froide, solubles dans l'eau chaude. La thymine se dissout dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins.

**Thymol.** *1090500.* [89-83-8].

Voir *Thymol (0791).*

*Le thymol utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de menthe poivrée (0405).*

*Solution à examiner.* Dissolvez 0,1 g de thymol dans 10 mL environ d'*acétone R.*

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Thymolphtaléine.** $C_{28}H_{30}O_4$. ($M_r$ 430,5). *1090700.* [125-20-2]. 3,3-bis(4-Hydroxy-5-isopropyl-2-méthylphényl)-3*H*-isobenzofuran-1-one.

Poudre blanche ou blanc-jaune, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans les solutions alcalines diluées.

**Solution de thymolphtaléine.** *1090701.*

Solution à 1 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R.*

*Essai de sensibilité.* A 0,2 mL de solution de thymolphtaléine, ajoutez 100 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R.* La solution reste incolore. Le virage au bleu de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,05 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M.*

*Zone de virage* : pH 9,3 (incolore) à pH 10,5 (bleu).

**Titane.** Ti. ($A_r$ 47,88). *1091000.* [7440-32-6].

*Teneur* : au minimum 99 pour cent.

Métal en poudre, fil fin (diamètre inférieur ou égal à 0,5 mm), en éponge.

F : environ 1668 °C.

*Masse volumique* : environ 4,507 g/cm$^3$.

**Titane (dioxyde de).** *1117900.* [13463-67-7].

Voir *Dioxyde de titane (0150).*

**Titane (trichlorure de).** $TiCl_3$. ($M_r$ 154,3). *1091200.* [7705-07-9]. Titane(III) (chlorure de).

Cristaux violet-rouge, déliquescents, solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 440 °C.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Réactif au trichlorure de titane-acide sulfurique.** *1091202.*

Mélangez prudemment 20 mL de *solution de trichlorure de titane R* avec 13 mL d'*acide sulfurique R.* Ajoutez une quantité suffisante de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R* pour obtenir une coloration jaune. Chauffez la solution jusqu'à dégagement de vapeurs blanches. Laissez refroidir. Ajoutez de l'*eau R* et répétez le chauffage et l'ajout d'*eau R* jusqu'à obtention d'une solution incolore. Complétez à 100 mL avec de l'*eau R.*

**Solution de trichlorure de titane.** *1091201.*

Solution à 150 g/L dans l'acide chlorhydrique à 100 g/L en HCl.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,19.

**α-Tocophérol.** *1152300.* [10191-41-0].

Voir *tout-rac-α-Tocophérol (0692).*

**α-Tocophéryle (acétate d').** *1152400.* [7695-91-2].

Voir *tout-rac-α-Tocophéryle (acétate de) (0439).*

***o*-Tolidine.** $C_{14}H_{16}N_2$. ($M_r$ 212,3). *1123000.* [119-93-7]. 3,3′-Diméthylbenzidine.

*Teneur* : au minimum 97,0 pour cent.

Poudre cristalline, brun clair.

F : environ 130 °C.

**Solution d'*o*-tolidine.** *1123001.*

Dissolvez 0,16 g d'*o-tolidine R* dans 30,0 mL d'*acide acétique glacial R,* ajoutez 1,0 g d'*iodure de potassium R* et complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R.*

**Toluène.** $C_7H_8$. ($M_r$ 92,1). *1091300.* [108-88-3]. Méthylbenzène.

Liquide limpide et incolore, inflammable, très peu soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : 0,865 à 0,870.

Eb : environ 110 °C.

**Toluène exempt de soufre.** *1091301.*

Satisfait aux spécifications du *toluène R* et aux spécifications supplémentaires suivantes.

*Composés soufrés.* Chauffez à reflux pendant 15 min 10 mL de toluène exempt de soufre avec 1 mL d'*éthanol anhydre R* et 3 mL de *solution de plombite de potassium R.* Laissez reposer pendant 5 min. La phase aqueuse ne noircit pas.

*Substances apparentées au thiophène.* Agitez 2 mL de toluène exempt de soufre avec 5 mL de réactif à l'*isatine R* pendant 5 min. Laissez reposer pendant 15 min. Il ne se développe aucune coloration bleue dans la phase inférieure.

**Toluènesulfonamide.** $C_7H_9NO_2S$. ($M_r$ 171,2). *1091500.* [70-55-3]. 4-Méthylbenzènesulfonamide. *p*-Toluènesulfonamide.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans les solutions d'hydroxydes alcalins.

F : environ 136 °C.

*Chromatographie.* Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications données dans la monographie *Tolbutamide (0304)* ; le chromatogramme présente une seule tache principale.

***o*-Toluènesulfonamide.** $C_7H_9NO_2S$. ($M_r$ 171,2). *1091400.* [88-19-7]. 2-Méthylbenzènesulfonamide.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins.

F : environ 156 °C.

***p*-Toluènesulfonamide.** *1091500.* [70-55-3].

Voir *Toluènesulfonamide R.*

**Toluènesulfonique (acide).** $C_7H_8O_3S,H_2O$. ($M_r$ 190,2). *1091600.* [6192-52-5]. Acide 4-méthylbenzènesulfonique.

*Teneur* : au minimum 87,0 pour cent.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, ou cristaux, facilement solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Toluènesulfonylurée.** $C_8H_{10}N_2O_3S$. ($M_r$ 214,2). *1177000.* [1694-06-0]. 4-Méthylbenzènesulfonylurée. *p*-Toluènesulfonylurée. (4-Méthylphényl)sulfonylurée.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche.

F : 196 à 198 °C.

***o*-Toluidine.** $C_7H_9N$. ($M_r$ 107,2). *1091700.* [95-53-4]. 2-Méthylaniline.

Liquide jaune clair devenant brun-rouge par exposition à l'air et à la lumière, peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans les acides dilués.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,01.

$n_D^{20}$ : environ 1,569.

Eb : environ 200 °C.

*Conservation* : en récipient étanche, à l'abri de la lumière.

***o*-Toluidine (chlorhydrate d').** $C_7H_{10}ClN$. ($M_r$ 143,6). *1117300.* [636-21-5]. Chlorhydrate de 2-méthylaniline. Chlorhydrate de 2-méthylbenzènamine.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent.

F : 215 °C à 217 °C.

***p*-Toluidine.** $C_7H_9N$. ($M_r$ 107,2). *1091800.* [106-49-0]. 4-Méthylaniline.

Ecailles ou paillettes brillantes, peu solubles dans l'eau, facilement solubles dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 44 °C.

**Tosylarginine (chlorhydrate de l'ester méthylique de).** $C_{14}H_{23}ClN_4O_4S$. ($M_r$ 378,9). *1092000.* [1784-03-8]. Chlorhydrate de l'ester méthylique de *N*-tosyl-L-arginine. Chlorhydrate de (*S*)-5-guanidino-2-(4-méthylbenzènesulfonamido)valérate de méthyle.

$[\alpha]_D^{20}$ : – 12 à – 16, déterminé avec une solution à 40 g/L.

F : environ 145 °C.

**Solution de chlorhydrate de l'ester méthylique de tosylarginine.** *1092001.*

A 98,5 mg de *chlorhydrate de l'ester méthylique de tosylarginine R*, ajoutez 5 mL de *solution tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane pH 8,1 R* et agitez jusqu'à dissolution du substrat. Ajoutez 2,5 mL d'*indicateur mixte au rouge de méthyle R* et complétez à 25,0 mL avec de l'*eau R*.

**Tosyl-lysyl-chlorométhane (chlorhydrate de).** $C_{14}H_{22}Cl_2N_2O_3S$. ($M_r$ 369,3). *1092100.* [4238-41-9]. Chlorhydrate de *N*-tosyl-L-lysyl-chlorométhane. Chlorhydrate de (3*S*)-7-amino-1-chloro-3-(4-méthylbenzènesulfonamido)heptan-2-one.

$[\alpha]_D^{20}$ : – 7 à – 9, déterminé avec une solution à 20 g/L.

F : environ 155 °C, avec décomposition.

$A_{1\,cm}^{1\%}$ : 310 à 340, déterminé à 230 nm dans l'*eau R*.

**Tosyl-phénylalanyl-chlorométhane.** $C_{17}H_{18}ClNO_3S$. ($M_r$ 351,9). *1092200.* [402-71-1]. *N*-Tosyl-L-phénylalanyl-chlorométhane.

$[\alpha]_D^{20}$ : – 85 à – 89, déterminé avec une solution à 10 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*.

F : environ 105 °C.

$A_{1\,cm}^{1\%}$ : 290 à 320, déterminé à 228,5 nm dans l'*éthanol à 96 pour cent R*.

**Tournesol.** *1049300.* [1393-92-6].

Schultz No. 1386.

Fragments bleu indigo, préparés à partir de diverses espèces de *Rocella*, de *Lecanora* et d'autres lichens. Le pigment est soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Zone de virage* : pH 5 (rouge) à pH 8 (bleu).

**Papier tournesol bleu.** *1049301.*

Faites bouillir 10 parties de *tournesol R* grossièrement moulu dans 100 parties d'*éthanol à 96 pour cent R* pendant 1 h. Décantez l'alcool et traitez le résidu avec un mélange de 45 parties d'*éthanol à 96 pour cent R* et de 55 parties d'*eau R*. Laissez en contact pendant 2 jours et décantez le liquide limpide. Plongez des bandelettes de papier filtre dans la solution, puis laissez sécher.

*Essai de sensibilité.* Plongez une bandelette de 10 mm sur 60 mm dans un mélange de 10 mL d'*acide chlorhydrique 0,02 M* et de 90 mL d'*eau R*. Agitez. Le papier rougit en 45 s.

**Papier tournesol rouge.** *1049302.*

Traitez l'extrait de tournesol bleu par l'*acide chlorhydrique dilué R* versé goutte à goutte jusqu'à virage au rouge. Plongez des bandelettes de papier filtre dans cette solution puis laissez sécher.

*Essai de sensibilité.* Plongez une bandelette de 10 mm sur 60 mm dans un mélange de 10 mL d'*hydroxyde de sodium 0,02 M* et de 90 mL d'*eau R*. Agitez. Le papier bleuit en 45 s.

**Tournesol (huile de).** *1086900.*

Voir *Huile de tournesol raffinée (1371).*

**Toxaphène.** *1132800.* [8001-35-2].

Mélange de dérivés polychlorés.

F : 65 °C à 90 °C.

Une solution de référence certifiée de qualité appropriée (10 ng/µL dans l'isooctane) peut être utilisée.

**Triacétine.** $C_9H_{14}O_6$. ($M_r$ 218,2). *1092400.* [102-76-1]. Triacétate de propane-1,2,3-triyle. Triacétate de glycérol.

Liquide incolore à jaunâtre, presque limpide, soluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,16.

$n_D^{20}$ : environ 1,43.

Eb : environ 260 °C.

**Triamcinolone.** $C_{21}H_{27}FO_6$. ($M_r$ 394,4). *1111300.* [124-94-7]. 9-Fluoro-11β,16α,17,21-tétrahydroxyprégna-1,4-diène-3,20-dione.

Poudre cristalline.

F : 262 °C à 263 °C.

**Triamcinolone (acétonide de).** *1133100.*

Voir *Acétonide de triamcinolone (0533).*

**Tribromophénol.** $C_6H_3Br_3O$. ($M_r$ 330,8). *1165300.* [118-79-6]. 2,4,6-Tribromophénol.

**Tributyle (citrate de).** $C_{18}H_{32}O_7$. ($M_r$ 360,4). *1152800.* [77-94-1]. Hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate de tributyle.

$d_4^{20}$ : environ 1,043.

$n_D^{20}$ : environ 1,445.

**Trichloracétique (acide).** $C_2HCl_3O_2$. ($M_r$ 163,4). *1092500.* [76-03-9].

Masse cristalline ou cristaux incolores, très déliquescents, très solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Solution d'acide trichloracétique.** *1092501.*

Dissolvez 40,0 g d'*acide trichloracétique R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant. Titrez par l'*hydroxyde de sodium 0,1 M* et ajustez, si nécessaire, la concentration à 40 ± 1 g/L.

**Trichloréthylène.** $C_2HCl_3$. ($M_r$ 131,4). *1102100.* [79-01-6].

Liquide incolore, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,46.

$n_D^{20}$ : environ 1,477.

**1,1,1-Trichloroéthane.** $C_2H_3Cl_3$. ($M_r$ 133,4). *1092600.* [71-55-6]. Méthylchloroforme.

Liquide ininflammable, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'acétone et au méthanol.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,34.

$n_D^{20}$ : environ 1,438.
Eb : environ 74 °C.

**Trichloroéthylène.** *1102100.*
Voir *Trichloréthylène R.*

**Trichlorotrifluoréthane.** $C_2Cl_3F_3$. ($M_r$ 187,4). *1092700.* [76-13-1]. 1,1,2-Trichloro-1,2,2-trifluoroéthane.
Liquide incolore et volatil, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'acétone.
$d_{20}^{20}$ : environ 1,58.
*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : au minimum 98 pour cent distillent de 47 °C à 48 °C.

**Tricine.** $C_6H_{13}NO_5$. ($M_r$ 179,2). *1138900.* [5704−04−1]. *N*-[2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxyméthyl)éthyl]glycine.
Qualité appropriée pour l'électrophorèse.
F : environ 183 °C.

**Tricosane.** $C_{23}H_{48}$. ($M_r$ 324,6). *1092800.* [638-67-5].
Cristaux blancs ou sensiblement blancs, pratiquement insolubles dans l'eau, solubles dans l'hexane.
F : environ 48 °C.

**Tridocosahexaénoïne.** $C_{69}H_{98}O_6$. ($M_r$ 1023,5). *1144900.* [124596-98-1]. Triglycéride de l'acide docosahexaénoïque (C22:6). Tridocosahexaénoate de glycérol. Tri-(*tout-Z*)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaénoate de propane-1,2,3-triyle.
Le réactif de Nu-Chek Prep, Inc. convient.

**Triéthanolamine.** *1092900.* [102-71-6].
Voir *Trolamine (1577).*

**Triéthylamine.** $C_6H_{15}N$. ($M_r$ 101,2). *1093000.* [121-44-8]. *N,N*-Diéthyléthanamine.
Liquide incolore, peu soluble dans l'eau à une température inférieure à 18,7 °C, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.
$d_{20}^{20}$ : environ 0,727.
$n_D^{20}$ : environ 1,401.
Eb : environ 90 °C.

**Triéthylamine R1.** $C_6H_{15}N$. ($M_r$ 101,2). *1093001.* [121-44-8]. *N,N*-Diéthyléthanamine.
Satisfait aux spécifications du *triéthylamine R* et aux spécifications supplémentaires suivantes.
*Teneur* : au minimum 99,5 pour cent, déterminé par chromatographie en phase gazeuse.
*Eau* : au maximum 0,1 pour cent.
Utilisez la triéthylamine récemment distillée ou d'un récipient récemment ouvert.

**Triéthylamine R2.** $C_6H_{15}N$. ($M_r$ 101,2). *1093002.* [121-44-8]. *N,N*-Diéthyléthanamine.
Satisfait aux spécifications de la *triéthylamine R* et aux spécifications supplémentaires suivantes.
*Teneur* : au minimum 99,5 pour cent, déterminé par chromatographie en phase gazeuse.
*Eau* : au maximum 0,2 pour cent.
La *triéthylamine R2* est appropriée pour la chromatographie liquide à gradient d'élution.
*Utilisez la triéthylamine récemment distillée ou d'un récipient récemment ouvert.*

**Triéthylènediamine.** $C_6H_{12}N_2$. ($M_r$ 112,2). *1093100.* 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane.
Cristaux très hygroscopiques, facilement sublimables à température ambiante, facilement solubles dans l'eau, dans l'acétone et dans l'éthanol anhydre.
Eb : environ 174 °C.
F : environ 158 °C.
*Conservation* : en récipient étanche.

**Trifluoracétique (acide).** $C_2HF_3O_2$. ($M_r$ 114,0). *1093200.* [76-05-1].
*Teneur* : au minimum 99 pour cent.
Liquide miscible à l'acétone et à l'éthanol à 96 pour cent.
$d_{20}^{20}$ : environ 1,53.
Eb : environ 72 °C.
Utilisez une qualité appropriée pour le séquençage des protéines.
*Conservation* : en récipient étanche.

**Trifluoroacétique (anhydride).** $C_4F_6O_3$. ($M_r$ 210,0). *1093300.* [407-25-0].
Liquide incolore.
$d_{20}^{20}$ : environ 1,5.

**3-Trifluorométhylaniline.** $C_7H_6F_3N$. ($M_r$ 161,1 ). *1171900.* [98-16-8]. 3-(Trifluorométhyl)aniline. α,α,α-Trifluoro-*m*-toluidine. 3-(Trifluorométhyl)benzénamine.
Liquide incolore.
*Masse volumique* : 1,30 g/cm³ (20 °C).

**4-Trifluorométhylphénol.** $C_7H_5F_3O$. ($M_r$ 162,1). *1161700.* [402-45-9].
Poudre ou solide cristallins, blancs ou jaune clair.
F : environ 46 °C.

**Trigonelline (chlorhydrate de).** $C_7H_8ClNO_2$. ($M_r$ 173,6). *1117400.* [6138-41-6]. Chlorure de 3-carboxy-1-méthylpyridinium. Chlorhydrate de l'acide *N*-méthylbétaïne nicotinique.
Poudre cristalline, très soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.
F : environ 258 °C.

**Trimère acétaldéhyde-ammoniaque trihydraté.** $C_6H_{15}N_3,3H_2O$. ($M_r$ 183,3). *1133500.* [58052-80-5]. 2,4,6-Triméthylhexahydro-1,3,5-triazine trihydraté.
F : 95 °C à 97 °C.

**4,4′,4″-(2,4,6-triméthylbenzène-1,3,5-triyltrisméthylène)tris[2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)phénol].** *1042100.*
Voir *2,2′,2″,6,6′,6″-Hexa(1,1-diméthyléthyl)-4,4′,4″-[(2,4,6-triméthyl-1,3,5-benzènetriyle)trisméthylène]triphénol R.*

**Triméthylétain (chlorure de).** $C_3H_9ClSn$. ($M_r$ 199,3). *1170900.* [1066-45-1]. Chlorotriméthylstannane.

**Triméthylpentane.** $C_8H_{18}$. ($M_r$ 114,2). *1093400.* [540-84-1]. Isooctane. 2,2,4-Triméthylpentane.
Liquide incolore et inflammable, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol anhydre.
$d_{20}^{20}$ : 0,691 à 0,696.
$n_D^{20}$ : 1,391 à 1,393.
*Intervalle de distillation* (*2.2.11*) : au minimum 95 pour cent distillent de 98 °C à 100 °C.
*Le triméthylpentane utilisé en spectrophotométrie satisfait également à l'essai suivant.*
*Transmittance minimale* (*2.2.25*) déterminée en utilisant l'*eau R* comme liquide de compensation : 98 pour cent de 250 nm à 420 nm.

**Triméthylpentane R1.** *1093401.*
Satisfait aux spécifications du *triméthylpentane R* et à la spécification supplémentaire suivante.
*Absorption* (*2.2.25*) déterminée en utilisant l'*eau R* comme liquide de compensation : au maximum 0,07 de 220 nm à 360 nm.

**Triméthylpentane pour chromatographie.** *1093402.*
Satisfait aux spécifications du *triméthylpentane R* et à la spécification supplémentaire suivante.
*Résidu à l'évaporation* : au maximum 2 mg/L.

***N,O*-bis(Triméthylsilyl)acétamide.** $C_8H_{21}NOSi_2$. ($M_r$ 203,4). *1093600.* [10416-59-8].

Liquide incolore.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,83.

***N*-Triméthylsilylimidazole.** $C_6H_{12}N_2Si$. ($M_r$ 140,3). *1100500.* [18156-74-6]. 1-Triméthylsilylimidazole.

Liquide incolore, hygroscopique.

$d_{20}^{20}$ : voisine 0,96.

$n_D^{20}$ : environ 1,48.

*Conservation* : en récipient étanche.

**3-Triméthylsilyl-1-propanesulfonique (sel sodique d'acide).** $C_6H_{15}NaO_3SSi$. ($M_r$ 218,3). *1178700.* [2039-96-5]. 3-(Triméthylsilyl)-1-propanesulfonate de sodium.

Poudre beige.

*Teneur* : au minimum 97,0 pour cent.

F : environ 165 °C.

***N,O*-bis-(Triméthylsilyl)trifluoroacétamide.** $C_8H_{18}F_3NOSi_2$. ($M_r$ 257,4). *1133200.* [25561-30-2]. BSTFA.

Liquide incolore.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,97.

$n_D^{20}$ : environ 1,38.

$Eb_{12\ mm}$ : environ 40 °C.

**Triméthylsulfonium (hydroxyde de).** $C_3H_{10}OS$. ($M_r$ 94,2). *1145000.* [17287-03-5].

$d_4^{20}$ : environ 0,81.

**2,4,6-Trinitrobenzènesulfonique (acide).** $C_6H_3N_3O_9S,3H_2O$. ($M_r$ 347,2). *1117500.* [2508-19-2].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, soluble dans l'eau.

F : 190 °C à 195 °C.

**Trioléine.** $C_{57}H_{104}O_6$. ($M_r$ 885,4). *1168200.* [122-32-7]. Tris[(9*Z*)-octadéc-9-énoate] de propane-1,2,3-triyle. Trioléate de *sn*-glycéryle. Trioléate de glycérol. Triglycéride oléylique.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent.

**Triphénylméthanol.** $C_{19}H_{16}O$. ($M_r$ 260,3). *1093700.* [76-84-6]. Triphénylcarbinol.

Cristaux incolores, pratiquement insolubles dans l'eau, facilement solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Triphényltétrazolium (chlorure de).** $C_{19}H_{15}ClN_4$. ($M_r$ 334,8). *1093800.* [298-96-4]. Chlorure de 2,3,5-triphényl-2*H*-tétrazolium.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent.

Poudre jaune pâle ou terne, soluble dans l'eau, dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 pour cent.

F : environ 240 °C, avec décomposition.

*Dosage.* Dissolvez 1,000 g de chlorure de triphényltétrazolium dans un mélange de 5 mL d'*acide nitrique dilué R* et de 45 mL d'*eau R*. Ajoutez 50,0 mL de *nitrate d'argent 0,1 M* et chauffez à ébullition. Laissez refroidir, ajoutez 3 mL de *phtalate de dibutyle R*, agitez énergiquement et titrez par le *thiocyanate d'ammonium 0,1 M* en présence de 2 mL de *solution de sulfate ferrique et d'ammonium R2*.

1 mL de *nitrate d'argent 0,1 M* correspond à 33,48 mg de $C_{19}H_{15}ClN_4$.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Solution de chlorure de triphényltétrazolium.** *1093801.*

Solution à 5 g/L dans l'*alcool exempt d'aldéhyde R*.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**1,3,5-Tris[3,5-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-hydroxybenzyl]-1,3,5-triazine-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-trione.** $C_{48}H_{69}O_6N_3$. ($M_r$ 784,1). *1094000.* [27676-62-6].

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche.

F : 218 °C à 222 °C.

**Triscyanoéthoxypropane.** $C_{12}H_{17}N_3O_3$. ($M_r$ 251,3). *1093900.* 1,2,3-Tris(2-cyanoéthoxy)propane.

Liquide visqueux, jaune-brun, soluble dans le méthanol. Utilisé comme phase stationnaire en chromatographie en phase gazeuse.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,11.

*Viscosité* (*2.2.9*) : environ 172 mPa·s.

**Tris(hydroxyméthyl)aminométhane.** *1094200.* [77-86-1].

Voir *Trométamol (1053)*.

**Solution de tris(hydroxyméthyl)aminométhane.** *1094201.*

Solution contenant dans 1000,0 mL l'équivalent de 24,22 g de $C_4H_{11}NO_3$.

**Solution de tris(hydroxyméthyl)aminométhane R1.** *1094202.*

Dissolvez 60,6 mg de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* et 0,234 g de *chlorure de sodium R* dans de l'*eau R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

*Conservation* : à une température de 2 °C à 8 °C pendant 3 jours.

**Tropique (acide).** $C_9H_{10}O_3$. ($M_r$ 166,17). *1172000.* [529-64-6]. Acide (2*RS*)-3-hydroxy-2-phénylpropanoïque.

**Troxérutine.** $C_{33}H_{42}O_{19}$. ($M_r$ 743). *1160300.* [7085-55-4]. Trihydroxyéthylrutine. 3′,4′,7-Tris[*O*-(2-hydroxyéthyl)]rutine. 2-[3,4-Bis(2-hydroxyéthoxy)phényl]-3-[[6-*O*-(6-désoxy-α-L-mannopyranosyl)-β-D-glycopyranosyl]oxy]-5-hydroxy-7-(2-hydroxyéthoxy)-4*H*-1-benzopyran-4-one.

F : 168 °C à 176 °C.

**Trypsine.** *1094500.* [9002-07-7].

Enzyme protéolytique obtenue par l'activation du trypsinogène extrait du pancréas de boeuf (*Bos taurus* L.).

Poudre amorphe ou cristalline, blanche ou sensiblement blanche, assez soluble dans l'eau.

**Trypsine pour cartographie peptidique.** *1094600.* [9002-07-7].

Trypsine hautement purifiée ayant subi un traitement destiné à éliminer l'activité chymotrypsine.

**Tryptophane.** $C_{11}H_{12}N_2O_2$. ($M_r$ 204,2). *1094700.* [73-22-3].

Poudre cristalline, blanche ou blanc-jaune ou cristaux incolores, peu solubles dans l'eau, très peu solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

$[\alpha]_D^{20}$ : environ − 30, déterminé avec une solution à 10 g/L.

**Tyramine.** $C_8H_{11}NO$. ($M_r$ 137,2). *1117600.* [51-67-2]. 4-(2-Aminoéthyl)phénol.

Cristaux assez solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol anhydre bouillant.

F : 164 à 165 °C.

**Tyrosine.** $C_9H_{11}NO_3$. ($M_r$ 181,2). *1094800.* [60-18-4]. Acide 2-amino-3-(4-hydroxyphényl)propionique.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, ou cristaux blancs ou sensiblement blancs ou incolores, peu solubles dans l'eau, pratiquement insolubles dans l'acétone et dans l'éthanol anhydre, solubles dans l'acide chlorhydrique dilué et dans les solutions d'hydroxydes alcalins.

**Uracile.** $C_4H_4N_2O_2$. ($M_r$ 112,1). *1161800.* [66-22-8].

*Teneur* : au minimum 95,0 pour cent.

**Urée.** *1095000.* [57-13-6].

Voir *Urée (0743)*.

**Uridine.** $C_9H_{12}N_2O_6$. ($M_r$ 244,2). *1095100.* [58-96-8].
1-β-D-Ribofuranosyluracile.

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, soluble dans l'eau.

F : environ 165 °C.

**Ursolique (acide).** $C_{30}H_{48}O_3$. ($M_r$ 456,7). *1141600.* [77-52-1].
Acide (3β)-3-hydroxyurs-12-én-28-oïque.

Poudre blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, assez soluble dans le méthanol, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$[\alpha]_D^{21}$ : environ 67,50, déterminé avec une solution à 10 g/L dans une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 56,1 g/L dans de l'*éthanol à 96 pour cent R.*

F : 285 °C à 288 °C.

**Valencène.** $C_{15}H_{24}$. ($M_r$ 204,4). *1152100.* [4630-07-3].
4β*H*,5α-Erémophila-1(10),11-diène. (1*R*,7*R*,8a*S*)-1,8a-Diméthyl-7-(1-méthyléthényl)-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydronaphtalène.

Liquide huileux incolore ou jaune pâle, d'odeur caractéristique, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_4^{20}$ : environ 0,918.

$n_D^{20}$ : environ 1,508.

Eb : environ 123 °C.

*Le valencène utilisé en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle d'orange douce (1811).*

*Teneur* : au minimum 80 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Valérénique (acide).** $C_{15}H_{22}O_2$. ($M_r$ 234,3). *1165700.* [3569-10-6]. Acide (2*E*)-3-[(4*S*,7*R*,7a*R*)-3,7-diméthyl-2,4,5,6,7,7a-hexahydro-1*H*-indén-4-yl]-2-méthylprop-2-énoïque.

F : 134 °C à 138 °C.

**Valérique (acide).** $C_5H_{10}O_2$. ($M_r$ 102,1). *1095200.* [109-52-4].
Acide pentanoïque.

Liquide incolore, soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,94.

$n_D^{20}$ : environ 1,409.

Eb : environ 186 °C.

**Vanilline.** *1095300.* [121-33-5].

Voir *Vanilline (0747).*

**Réactif à la vanilline.** *1095301.*

En observant les précautions d'usage, ajoutez goutte à goutte 2 mL d'*acide sulfurique R* à 100 mL d'une solution de *vanilline R* à 10 g/L dans de l'*éthanol à 96 pour cent R.*

*Conservation* : pendant 48 h.

**Solution de vanilline phosphorique.** *1095302.*

Dissolvez 1,0 g de *vanilline R* dans 25 mL d'*éthanol à 96 pour cent R.* Ajoutez 25 mL d'*eau R* et 35 mL d'*acide phosphorique R.*

**Vaseline (huile de).** *1062000.* [8042-47-5].

Voir *Paraffine liquide R.*

**Vaseline blanche.** *1062100.*

Mélange semi-solide d'hydrocarbures obtenus à partir du pétrole et décolorés, pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent, soluble dans l'*éther de pétrole R1.* Les solutions sont parfois légèrement opalescentes.

**Vératrole.** $C_8H_{10}O_2$. ($M_r$ 138,2). *1165400.* [91-16-7].
1,2-Diméthoxybenzène.

$d_4^{20}$ : 1,085.

$n_D^{20}$ : 1,534.

Eb : environ 206 °C.

F : environ 22 °C.

**Verbénone.** $C_{10}H_{14}O$. ($M_r$ 150,2). *1140500.* [1196-01-6].
(1*S*,5*S*)-4,6,6-Triméthylbicyclo[3.1.1]hept-3-én-2-one.

Huile à odeur caractéristique, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible aux solvants organiques.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,978.

$n_D^{18}$ : environ 1,49.

$[\alpha]_D^{18}$ : environ + 249,6.

Eb : 227 °C à 228 °C.

F : environ 6,5 °C.

*La verbénone utilisée en chromatographie en phase gazeuse satisfait également à l'essai suivant.*

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications données dans la monographie *Huile essentielle de romarin (1846).*

*Teneur* : au minimum 99 pour cent, calculé par le procédé de normalisation.

**Vert de bromocrésol.** $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$. ($M_r$ 698). *1012600.* [76-60-8]. 3′,3″,5′,5″-Tétrabromo-*m*-crésol-sulfonephtaléine. 4,4′-(3*H*-2,1-Benzoxathiol-3-ylidène)bis(2,6-dibromo-3-méthylphénol) *S,S*-dioxyde.

Poudre blanc-brun, peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins.

**Solution de vert de bromocrésol.** *1012601.*

Dissolvez 50 mg de *vert de bromocrésol R* dans 0,72 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* et 20 mL d'*éthanol à 96 pour cent R.* Complétez à 100 mL avec de l'*eau R.*

*Essai de sensibilité.* A 0,2 mL de solution de vert de bromocrésol, ajoutez 100 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R.* La solution est bleue. Le virage au jaune de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,2 mL d'*acide chlorhydrique 0,02 M.*

*Zone de virage* : pH 3,6 (jaune) à pH 5,2 (bleu).

**Solution de vert de bromocrésol-rouge de méthyle.** *1012602.*

Dissolvez 0,15 g de *vert de bromocrésol R* et 0,1 g de *rouge de méthyle R* dans 180 mL d'*éthanol anhydre R* et complétez à 200 mL avec de l'*eau R.*

**Vert malachite.** $C_{23}H_{25}ClN_2$. ($M_r$ 364,9). *1050500.* [123333-61-9].

Schultz No. 754.

Colour Index No. 42000.
Chlorure de [4-[[4-(diméthylamino)phényl]phénylméthylène]-cyclohexa-2,5-diène-1-ylidène]diméthylammonium.

Cristaux verts à reflets métalliques, très solubles dans l'eau en donnant une solution vert-bleu, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent et dans le méthanol.

*Absorbance* (*2.2.25*). Une solution à 0,01 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R* présente un maximum d'absorption à 617 nm.

**Solution de vert malachite.** *1050501.*

Solution à 5 g/L dans l'*acide acétique anhydre R.*

**Vert de méthyle.** $C_{26}H_{33}Cl_2N_3$. ($M_r$ 458,5). *1054200.* [7114-03-6].

Schultz No. 788.

Colour Index No. 42585.
Dichlorure de 4-[[4-(diméthylamino)phényl][4-(diméthylimino)cyclohexa-2,5-diénylidène]méthylphényl]triméthylammonium.

Poudre verte, soluble dans l'eau, soluble dans l'acide sulfurique, en donnant une solution jaune qui vire au vert après dilution dans de l'eau.

**Papier à l'iodomercurate de vert de méthyle.** *1054201.*

Plongez des bandelettes d'un papier filtre approprié dans une solution de *vert de méthyle R* à 40 g/L, puis laissez sécher à l'air. Plongez ensuite dans une solution contenant 140 g/L d'*iodure de potassium R* et 200 g/L d'*iodure mercurique R* et maintenez en contact pendant 1 h. Lavez à l'*eau distillée R* jusqu'à ce que les eaux de lavage soient pratiquement incolores. Laissez sécher à l'air.

*Conservation* : à l'abri de la lumière pendant 48 h.

**Vinyle (acétate de).** $C_4H_6O_2$. ($M_r$ 86,10). *1111800.* [108-05-4]. Ethényle (acétate de).

$d_{20}^{20}$ : environ 0,930.

Eb : environ 72 °C.

**Vinyle (chlorure de).** $C_2H_3Cl$. ($M_r$ 62,5). *1095400.* [75-01-4].

Gaz incolore, peu soluble dans les solvants organiques.

**2-Vinylpyridine.** $C_7H_7N$. ($M_r$ 105,1). *1102200.* [100-69-6].

Liquide jaune, miscible à l'eau.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,97.

$n_D^{20}$ : environ 1,549.

**1-Vinylpyrrolidin-2-one.** $C_6H_9NO$. ($M_r$ 111,1). *1111900.* [88-12-0]. 1-Ethénylpyrrolidin-2-one.

*Teneur* : au minimum 99,0 pour cent.

Liquide limpide et incolore.

*Eau* (*2.5.12*) : au maximum 0,1 pour cent, déterminé sur 2,5 g. Utilisez comme solvant un mélange de 50 mL de *méthanol anhydre R* et de 10 mL de *butyrolactone R*.

*Dosage.* Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : $l$ = 30 m, Ø = 0,5 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (1,0 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 1 | 80 |
| | 1 - 12 | 80 → 190 |
| | 12 - 27 | 190 |
| Chambre à injection | | 190 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 0,3 µL de la substance à examiner.

Ajustez le débit du gaz vecteur de façon que le temps de rétention du pic correspondant à la 1-vinylpyrrolidin-2-one soit d'environ 17 min.

**Violet cristallisé.** $C_{25}H_{30}ClN_3$. ($M_r$ 408,0). *1022900.* [548-62-9].

Schultz No. 78.

Colour Index No. 42555.
Chlorure d'hexaméthylpararosanilinium.

Poudre vert foncé ou cristaux, solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

**Solution de violet cristallisé.** *1022901.*

Dissolvez 0,5 g de *violet cristallisé R* dans de l'*acide acétique anhydre R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

*Essai de sensibilité.* A 50 mL d'*acide acétique anhydre R*, ajoutez 0,1 mL de solution de violet cristallisé. La solution est bleu pourpre. Ajoutez 0,1 mL d'*acide perchlorique 0,1 M* ; la solution vire au bleu-vert.

**Vitexine.** $C_{21}H_{20}O_{10}$. ($M_r$ 448,4). *1133300.* [3681-93-4]. Apigénine-8-glucoside.

Poudre jaune.

*Conservation* : en récipient étanche et à l'abri de la lumière.

**Xanthydrol.** $C_{13}H_{10}O_2$. ($M_r$ 198,2). *1096100.* [90-46-0]. 9-Xanthénol.

*Teneur* : au minimum 90,0 pour cent.

Poudre blanche ou jaune pâle, très peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent et dans l'acide acétique glacial. Le xanthydrol peut se présenter sous la forme d'une solution méthanolique contenant 90 g/L à 110 g/L de xanthydrol.

F : environ 123 °C.

*Dosage.* Dans un ballon de 250 mL, dissolvez 0,300 g de xanthydrol dans 3 mL de *méthanol R* ou utilisez 3,0 mL de solution. Ajoutez 50 mL d'*acide acétique glacial R* et, goutte à goutte, en agitant, 25 mL d'une solution d'*urée R* à 20 g/L. Laissez reposer pendant 12 h, recueillez le précipité sur un filtre en verre fritté (16) (*2.1.2*), lavez avec 20 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*, desséchez à 100-105 °C et pesez.

1 g de précipité correspond à 0,9429 g de xanthydrol.

*Conservation* : à l'abri de la lumière. Si une solution méthanolique est utilisée, conservez-la dans de petites ampoules scellées et filtrez-la avant l'emploi si nécessaire.

**Solution de xanthydrol.** *1096102.*

A 0,1 mL d'une solution de *xanthydrol R* à 100 g/L dans du *méthanol R*, ajoutez 100 mL d'*acide acétique anhydre R* et 1 mL d'*acide chlorhydrique R*. Laissez reposer pendant 24 h avant l'utilisation.

**Xanthydrol R1.** *1096101.*

Satisfait aux spécifications du *xanthydrol R* et à la spécification supplémentaire suivante.

*Teneur* : au minimum 98,0 pour cent.

**Xylène.** $C_8H_{10}$. ($M_r$ 106,2). *1096200.* [1330-20-7].

Mélange des isomères. Liquide limpide et incolore, inflammable, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,867.

$n_D^{20}$ : environ 1,497.

Eb : environ 138 °C.

***m*-Xylène.** $C_8H_{10}$. ($M_r$ 106,2). *1117700.* [108-38-3]. 1,3-Diméthylbenzène.

Liquide incolore et limpide, inflammable, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,884.

$n_D^{20}$ : environ 1,497.

Eb : environ 139 °C.

F : environ – 47 °C.

***o*-Xylène.** $C_8H_{10}$. ($M_r$ 106,2). *1100600.* [95-47-6]. 1,2-Diméthylbenzène.

Liquide limpide et incolore, inflammable, pratiquement insoluble dans l'eau, miscible à l'éthanol à 96 pour cent.

$d_{20}^{20}$ : environ 0,881.

$n_D^{20}$ : environ 1,505.

Eb : environ 144 °C.

F : environ – 25 °C.

**Xylénolorange.** $C_{31}H_{28}N_2Na_4O_{13}S$. ($M_r$ 761). *1096300.* [3618-43-7]. 3,3′-(3 *H*-2,1-Benzoxathiol-3-ylidène)bis[(6-hydroxy-5-méthyl-3,1-phénylène)méthylèneiminobisacétate] de tétrasodium *S,S*-dioxyde.

Poudre cristalline rouge-brun, soluble dans l'eau.

**Mélange composé au xylénolorange.** *1096301.*

Mélangez une partie de *xylénolorange R* avec 99 parties de *nitrate de potassium R.*

*Essai de sensibilité.* A 50 mL d'*eau R,* ajoutez 1 mL d'*acide acétique dilué R,* 50 mg de mélange composé au xylénolorange et 0,05 mL de *solution de nitrate de plomb R.* Ajoutez de l'*hexaméthylènetétramine R* jusqu'à virage du jaune au rouge-violet. Après addition de 0,1 mL d'*édétate de sodium 0,1 M,* la coloration vire au jaune.

**Xylose.** *1096400.* [58-86-6].

Voir *Xylose (1278).*

**Zinc.** Zn. ($A_r$ 65,4). *1096500.* [7440-66-6].

*Teneur* : au minimum 99,5 pour cent.

Cylindres, grenailles, pastilles ou limaille blanc argent à reflet bleuté.

*Arsenic* (*2.4.2, Procédé A*) : au maximum 0,2 ppm.

Dissolvez 5,0 g de zinc dans un mélange constitué par les 15 mL d'*acide chlorhydrique R* et les 25 mL d'*eau R* prescrits.

**Zinc activé.** *1096501.*

Dans une fiole conique, introduisez la prise d'essai de zinc à activer sous forme de cylindres ou de pastilles, ajoutez une quantité d'une solution d'*acide chloroplatinique R* à 50 ppm suffisante pour recouvrir le zinc. Laissez en contact pendant 10 min, rincez, essorez et séchez immédiatement.

*Arsenic* (*2.4.2, Procédé A*). A 5 g de zinc activé, ajoutez 15 mL d'*acide chlorhydrique R,* 25 mL d'*eau R,* 0,1 mL de *solution de chlorure stanneux R* et 5 mL de *solution d'iodure de potassium R.* Il ne se produit pas de tache sur le *papier au bromure mercurique R.*

*Activité.* Effectuez l'essai de l'arsenic en utilisant les mêmes réactifs et ajoutez une solution contenant 1 µg d'arsenic. Il se produit une tache appréciable sur le *papier au bromure mercurique R.*

**Zinc (acétate de).** $(C_2H_3O_2)_2Zn,2H_2O$. ($M_r$ 219,5). *1102300.* [5970-45-6]. Acétate de zinc dihydraté.

Cristaux blancs ou sensiblement blancs et brillants, légèrement efflorescents, facilement solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

L'acétate de zinc perd son eau de cristallisation à 100 °C.

$d_{20}^{20}$ : environ 1,735.

F : environ 237 °C.

**Solution d'acétate de zinc.** *1102301.*

Mélangez 600 mL d'*eau R* à 150 mL d'*acide acétique glacial R* et 54,9 g d'*acétate de zinc R* puis agitez jusqu'à dissolution. Continuez l'agitation tout en ajoutant 150 mL d'*ammoniaque concentrée R.* Refroidissez à température ambiante et ajustez à pH 6,4 avec de l'*ammoniaque R.* Complétez le mélange à 1 L avec de l'*eau R.*

**Zinc (chlorure de).** *1096600.* [7646-85-7].

Voir *Chlorure de zinc (0110).*

**Solution de chlorure de zinc-acide formique.** *1096601.*

Dissolvez 20 g de *chlorure de zinc R* dans 80 g d'*acide formique anhydre R* à 850 g/L.

**Solution de chlorure de zinc iodée.** *1096602.*

Dissolvez 6,5 g d'*iodure de potassium R* et 20 g de *chlorure de zinc R* dans 10,5 mL d'*eau R,* ajoutez 0,5 g d'*iode R* et agitez pendant 15 min. Filtrez si nécessaire.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Zinc (iodure de), solution amidonnée d'.** *1096502.*

Dissolvez 2 g de *chlorure de zinc R* dans 10 mL d'*eau R,* ajoutez 0,4 g d'*amidon soluble R* et chauffez jusqu'à dissolution de l'amidon. Refroidissez à température ambiante et ajoutez 1,0 mL d'une solution incolore contenant 0,10 g de *zinc R* sous forme de limaille et 0,2 g d'*iode R* dans de l'*eau R.* Complétez à 100 mL avec de l'*eau R* et filtrez.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

*Essai de sensibilité.* Prélevez 0,05 mL de *solution de nitrite de sodium R* et complétez à 50 mL avec de l'*eau R.* A 5 mL de solution, ajoutez 0,1 mL d'*acide sulfurique dilué R* et 0,05 mL de la solution amidonnée et d'iodure de zinc et mélangez. La solution est bleue.

**Zinc (oxyde de).** *1096700.* [1314-13-2].

Voir *Oxyde de zinc (0252).*

**Zinc (poudre de).** Zn. ($A_r$ 65,4). *1096800.* [7440-66-6].

*Teneur* : au minimum 90,0 pour cent.

Poudre grise très fine, soluble dans l'*acide chlorhydrique dilué R.*

**Zinc (sulfate de).** *1097000.* [7446-20-0].

Voir *Sulfate de zinc (0111).*

**Zirconyle (chlorure de).** Le chlorure de zirconyle est un sel basique correspondant approximativement à la formule $ZrCl_2O,8H_2O$. *1097100.* [15461-27-5].

*Teneur* : au minimum 96,0 pour cent de $ZrCl_2O,8H_2O$.

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux, facilement solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

*Dosage.* Dissolvez 0,600 g de chlorure de zirconyle dans un mélange de 5 mL d'*acide nitrique R* et de 50 mL d'*eau R.* Ajoutez 50,0 mL de *nitrate d'argent 0,1 M* et 3 mL de *phtalate de dibutyle R,* puis agitez. Titrez par le *thiocyanate d'ammonium 0,1 M* en présence de 2 mL de *solution de sulfate ferrique et d'ammonium R2* jusqu'à coloration jaune-rouge.

1 mL de *nitrate d'argent 0,1 M* correspond à 16,11 mg de $ZrCl_2O,8H_2O$.

**Zirconyle (nitrate de).** Le nitrate de zirconyle est un sel basique correspondant approximativement à la formule $ZrO(NO_3)_2,2H_2O$. *1097200.* [14985-18-3].

Poudre blanche ou sensiblement blanche ou cristaux hygroscopiques, solubles dans l'eau. La solution aqueuse est limpide ou tout au plus faiblement opalescente.

*Conservation* : en récipient étanche.

**Solution de nitrate de zirconyle.** *1097201.*

Solution de *nitrate de zirconyle R* à 1 g/L dans un mélange de 40 mL d'*eau R* et de 60 mL d'*acide chlorhydrique R.*

**04/2010:40102**

# 4.1.2. SOLUTIONS ÉTALONS POUR ESSAIS LIMITES

**Solution à 100 ppm d'acétaldéhyde ($C_2H_4O$).** *5000100.*

Dissolvez 1,0 g d'*acétaldéhyde R* dans du *2-propanol R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Prélevez 5,0 mL de solution et complétez à 500,0 mL avec du *2-propanol R.* Préparez extemporanément.

**Solution à 100 ppm d'acétaldéhyde ($C_2H_4O$) R1.** *5000101.*

Dissolvez 1,0 g d'*acétaldéhyde R* dans de l'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Prélevez 5,0 mL de solution et complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R.* Préparez extemporanément.

**Solution à 200 ppm d'aluminium (Al).** *5000200.*

Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *sulfate d'aluminium et de potassium R* correspondant à 0,352 g de $AlK(SO_4)_2,12H_2O$. Ajoutez 10 mL d'*acide sulfurique dilué R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R.*

**Solution à 100 ppm d'aluminium (Al).** *5000203.*

Dissolvez 8,947 g de *chlorure d'aluminium R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 10 ppm d'aluminium (Al).** *5000201.*

Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *nitrate d'aluminium R* correspondant à 1,39 g de $Al(NO_3)_3,9H_2O$ et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R* ; diluez au 1/100 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 2 ppm d'aluminium (Al).** *5000202.*

Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *sulfate d'aluminium et de potassium R* correspondant à 0,352 g de $AlK(SO_4)_2,12H_2O$. Ajoutez 10 mL d'*acide sulfurique dilué R* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R* ; diluez au 1/100 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 100 ppm d'ammonium ($NH_4$).** *5000300.*

Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *chlorure d'ammonium R* correspondant à 0,741 g de $NH_4Cl$ et complétez à 1000 mL avec le même solvant. Immédiatement avant l'emploi, prélevez 10 mL de solution et complétez à 25 mL avec de l'*eau R*.

**Solution à 3 ppm d'ammonium ($NH_4$).** *5006100.*

Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *chlorure d'ammonium R* correspondant à 0,889 g de $NH_4Cl$ et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/100 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 2,5 ppm d'ammonium ($NH_4$).** *5000301.*

Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *chlorure d'ammonium R* correspondant à 0,741 g de $NH_4Cl$ et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/100 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 1 ppm d'ammonium ($NH_4$).** *5000302.*

Prélevez 2 volumes de *solution à 2,5 ppm d'ammonium ($NH_4$) R* et complétez à 5 volumes avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 100 ppm d'antimoine (Sb).** *5000401.*

Dissolvez dans 500 mL d'*acide chlorhydrique 1M* une quantité de *tartrate de potassium et d'antimoine R* correspondant à 0,274 g de $C_4H_4KO_7$ $Sb,{}^1/_2H_2O$ et complétez la solution limpide à 1000 mL avec de l'*eau R*.

**Solution à 1 ppm d'antimoine (Sb).** *5000400.*

Dissolvez dans 20 mL d'*acide chlorhydrique R1* une quantité de *tartrate de potassium et d'antimoine R* correspondant à 0,274 g de $C_4H_4KO_7Sb,{}^1/_2H_2O$ et complétez la solution limpide à 100,0 mL avec de l'*eau R*. A 10,0 mL de cette solution, ajoutez 200 mL d'*acide chlorhydrique R1* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*. A 100,0 mL de cette solution, ajoutez 300 mL d'*acide chlorhydrique R1* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*. Préparez les solutions diluées extemporanément.

**Solution à 5 ppm d'argent (Ag).** *5002600.*

Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *nitrate d'argent R* correspondant à 0,790 g de $AgNO_3$ et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/100 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 10 ppm d'arsenic (As).** *5000500.*

Dissolvez dans 5 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* une quantité d'*anhydride arsénieux R* correspondant à 0,330 g de $As_2O_3$ et complétez à 250,0 mL avec de l'*eau R* ; diluez au 1/100 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 1 ppm d'arsenic (As).** *5000501.*

Diluez la *solution à 10 ppm d'arsenic (As) R* au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 0,1 ppm d'arsenic (As).** *5000502.*

Diluez la *solution à 1 ppm d'arsenic (As) R* au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 0,1 pour cent de baryum (Ba).** *5000601.*

Dissolvez dans de l'*eau distillée R* une quantité de *chlorure de baryum R* correspondant à 0,178 g de $BaCl_2,2H_2O$ et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

**Solution à 50 ppm de baryum (Ba).** *5000600.*

Dissolvez dans de l'*eau distillée R* une quantité de *chlorure de baryum R* correspondant à 0,178 g de $BaCl_2,2H_2O$ et complétez à 100,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/20 avec de l'*eau distillée R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 2 ppm de baryum (Ba).** *5005600.*

Diluez la *solution à 50 ppm de baryum (Ba) R* au 1/25 avec de l'*eau distillée R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 100 ppm de bismuth (Bi).** *5005300.*

Dissolvez dans 50 mL d'*acide nitrique R* une quantité de *bismuth R* correspondant à 0,500 g de Bi et complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R* ; diluez au 1/10 avec de l'*acide nitrique dilué R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 0,1 pour cent de cadmium (Cd).** *5000700.*

Dissolvez dans la quantité minimale d'un mélange à volumes égaux d'*acide chlorhydrique R* et d'*eau R* une quantité de *cadmium R* correspondant à 0,100 g de Cd, puis complétez à 100,0 mL avec de l'*acide chlorhydrique R* à 1 pour cent *V/V*.

**Solution à 10 ppm de cadmium (Cd).** *5000701.*

Diluez la *solution à 0,1 pour cent de cadmium (Cd) R* au 1/100 avec une solution d'*acide chlorhydrique R* à 1 pour cent *V/V* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 400 ppm de calcium (Ca).** *5000800.*

Dissolvez dans 23 mL d'*acide chlorhydrique 1 M* une quantité de *carbonate de calcium R*, correspondant à 1,000 g de $CaCO_3$ et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau distillée R* ; diluez au 1/10 avec de l'*eau distillée R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 100 ppm de calcium (Ca).** *5000801.*

Dissolvez dans 3 mL d'*acide acétique R* une quantité de *carbonate de calcium R* correspondant à 0,624 g de $CaCO_3$ et complétez à 250,0 mL avec de l'*eau distillée R* ; diluez au 1/10 avec de l'*eau distillée R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 100 ppm de calcium (Ca) R1.** *5000804.*

Dissolvez dans de l'*acide chlorhydrique dilué R* une quantité de *chlorure de calcium anhydre R* correspondant à 2,769 g de $CaCl_2$ et complétez à 1000,0 mL avec le même acide ; diluez au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution alcoolique à 100 ppm de calcium (Ca).** *5000802.*

Dissolvez dans 12 mL d'*acide acétique R* une quantité de *carbonate de calcium R* correspondant à 2,50 g de $CaCO_3$ et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau distillée R* ; diluez au 1/10 avec de l'*éthanol à 96 pour cent R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 10 ppm de calcium (Ca).** *5000803.*

Dissolvez dans 3 mL d'*acide acétique R* une quantité de *carbonate de calcium R* correspondant à 0,624 g de $CaCO_3$ et complétez à 250,0 mL avec de l'*eau distillée R* ; diluez au 1/100 avec de l'*eau distillée R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 50 ppm de chlorure (Cl).** *5004100.*

Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *chlorure de sodium R* correspondant à 0,824 g de NaCl et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 8 ppm de chlorure (Cl).** *5000900.*
Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *chlorure de sodium R* correspondant à 1,32 g de NaCl et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/100 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 5 ppm de chlorure (Cl).** *5000901.*
Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *chlorure de sodium R* correspondant à 0,824 g de NaCl et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/100 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 0,1 pour cent de chrome (Cr).** *5001002.*
Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *dichromate de potassium R* correspondant à 2,83 g de $K_2Cr_2O_7$ et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

**Solution liposoluble à 1000 ppm de chrome (Cr).** *5004600.*
Composé organométallique de chrome dans une huile.

**Solution à 100 ppm de chrome (Cr).** *5001000.*
Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *dichromate de potassium R* correspondant à 0,283 g de $K_2Cr_2O_7$ et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

**Solution à 0,1 ppm de chrome (Cr).** *5001001.*
Diluez la *solution à 100 ppm de chrome (Cr) R* au 1/1000 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 100 ppm de Cobalt (Co).** *5004300.*
Dissolvez dans 500 mL d'*acide nitrique 1M* une quantité de *nitrate de cobalt R* correspondant à 0,494 g de $Co(NO_3)_2,6H_2O$ et complétez la solution limpide à 1000 mL avec de l'*eau R*.

**Solution à 0,1 pour cent de cuivre (Cu).** *5001100.*
Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *sulfate de cuivre R* correspondant à 0,393 g de $CuSO_4,5H_2O$ et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

**Solution liposoluble à 1000 ppm de cuivre (Cu).** *5004700.*
Composé organométallique de cuivre dans une huile.

**Solution à 10 ppm de cuivre (Cu).** *5001101.*
Diluez la *solution à 0,1 pour cent de cuivre (Cu) R* au 1/100 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 0,1 ppm de cuivre (Cu).** *5001102.*
Diluez la *solution à 10 ppm de cuivre (Cu) R* au 1/100 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution liposoluble à 1000 ppm d'étain (Sn).** *5005000.*
Composé organométallique d'étain dans une huile.

**Solution à 5 ppm d'étain (Sn).** *5003100.*
Dissolvez dans un mélange de 5 mL d'*eau R* et de 25 mL d'*acide chlorhydrique R* une quantité d'*étain R* correspondant à 0,500 g de Sn et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R* ; diluez au 1/100 avec de l'*acide chlorhydrique R* à 2,5 pour cent *V/V* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 0,1 ppm d'étain (Sn).** *5003101.*
Diluez la *solution à 5 ppm d'étain (Sn) R* au 1/50 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 0,1 pour cent de fer (Fe).** *5001605.*
Dissolvez 0,100 g de Fe dans la quantité minimale d'un mélange à volumes égaux d'*acide chlorhydrique R* et d'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution à 250 ppm de fer (Fe).** *5001606.*
Dissolvez 4,840 g de *chlorure ferrique R* dans une solution d'*acide chlorhydrique R* à 150 g/L et complétez à 100,0 mL avec la même solution acide ; diluez au 1/40 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 20 ppm de fer (Fe).** *5001600.*
Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *sulfate ferrique et d'ammonium R* correspondant à 0,863 g de $FeNH_4(SO_4)_2,12H_2O$, ajoutez 25 mL d'*acide sulfurique dilué R* et complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R* ; diluez au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 10 ppm de fer (Fe).** *5001601.*
Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *sulfate ferreux et d'ammonium R* correspondant à 7,022 g de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2,6H_2O$, ajoutez 25 mL d'*acide sulfurique dilué R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R* ; diluez au 1/100 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 8 ppm de fer (Fe).** *5001602.*
Dissolvez 80 mg de *fer R* dans 50 mL d'*acide chlorhydrique R* à 220 g/L en HCl et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R* ; diluez au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 2 ppm de fer (Fe).** *5001603.*
Diluez la *solution à 20 ppm de fer (Fe) R* au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 1 ppm de fer (Fe).** *5001604.*
Diluez la *solution à 20 ppm de fer (Fe) R* au 1/20 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 100 ppm de ferrocyanure [$Fe(CN)_6$].** *5001200.*
Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *ferrocyanure de potassium R* correspondant à 0,20 g de $K_4Fe(CN)_6,3H_2O$ et complétez à 100,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 50 ppm de ferricyanure [$Fe(CN)_6$].** *5001300.*
Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *ferricyanure de potassium R* correspondant à 0,78 g de $K_3Fe(CN)_6$ et complétez à 100,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/100 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 10 ppm de fluorure (F).** *5001400.*
Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *fluorure de sodium R*, desséché au préalable à 300 °C pendant 12 h, correspondant à 0,442 g de NaF, puis complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R* (1 mL = 0,2 mg de F). Conservez la solution dans des flacons de polyéthylène. Diluez au 1/20 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 1 ppm de fluorure (F).** *5001401.*
Diluez la *solution à 10 ppm de fluorure (F) R* au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 5 ppm de formaldéhyde ($CH_2O$).** *5001500.*
Diluez au 1/200 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi une solution contenant 1,0 g de $CH_2O$ par litre, préparée à partir de *solution de formaldéhyde R*.

**Solution à 100 ppm de germanium (Ge).** *5004400.*
Dissolvez dans une solution d'*acide fluorhydrique R* à 0,01 pour cent *V/V* une quantité d'*hexafluorogermanate(IV) d'ammonium R* correspondant à 0,307 g de $(NH_4)_2GeF_6$ et complétez la solution limpide à 1000 mL avec de l'*eau R*.

**Solution à 20 ppm de glyoxal ($C_2H_2O_2$).** *5003700.*
Dans une fiole jaugée de 100 mL, pesez une quantité de *solution de glyoxal R* correspondant à 0,200 g de $C_2H_2O_2$ et complétez au volume avec de l'*éthanol anhydre R*. Diluez au 1/100 avec de l'*éthanol anhydre R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 2 ppm de glyoxal ($C_2H_2O_2$).** *5003701.*
Diluez la *solution à 20 ppm de glyoxal ($C_2H_2O_2$) R* au 1/10 avec de l'*éthanol anhydre R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 10 ppm d'iodure (I).** *5003800.*
Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité d'*iodure de potassium R* correspondant à 0,131 g de KI et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Diluez au 1/100 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 0,1 pour cent de magnésium (Mg).** *5001803.*
Dissolvez dans de l'*eau distillée R* une quantité de *sulfate de magnésium R* correspondant à 1,010 g de $MgSO_4,7H_2O$ et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

**Solution à 1000 ppm de magnésium (Mg).** *5006200.*
Dissolvez 5,275 g de *nitrate de magnésium R* dans 16 mL d'*acide nitrique dilué R* et complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R*.
*Détermination du titre* : effectuez le dosage du magnésium par complexométrie (*2.5.11*).

**Solution à 100 ppm de magnésium (Mg).** *5001800.*
Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *sulfate de magnésium R* correspondant à 1,010 g de $MgSO_4,7H_2O$ et complétez à 100,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 10 ppm de magnésium (Mg).** *5001801.*
Diluez la *solution à 100 ppm de magnésium (Mg) R* au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 10 ppm de magnésium (Mg) R1.** *5001802.*
Dissolvez 8,365 g de *chlorure de magnésium R* dans de l'*acide chlorhydrique dilué R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/100 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 1000 ppm de manganèse (Mn).** *5005800.*
Dissolvez dans 500 mL d'*acide nitrique 1 M* une quantité de *sulfate de manganèse R* correspondant à 3,08 g de $MnSO_4,H_2O$ et complétez la solution à 1000 mL avec de l'*eau R*.

**Solution à 100 ppm de manganèse (Mn).** *5004500.*
Dissolvez dans 500 mL d'*acide nitrique 1M* une quantité de *sulfate de manganèse R* correspondant à 0,308 g de $MnSO_4,H_2O$ et complétez la solution limpide à 1000 mL avec de l'*eau R*.

**Solution à 1000 ppm de mercure (Hg).** *5001900.*
Dissolvez dans 50 mL d'*acide nitrique dilué R* une quantité de *chlorure mercurique R* correspondant à 1,354 g de $HgCl_2$ et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

**Solution à 10 ppm de mercure (Hg).** *5001901.*
Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *chlorure mercurique R* correspondant à 0,338 g de $HgCl_2$ et complétez à 250,0 mL avec le même solvant ; diluez à 1/100 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution liposoluble à 1000 ppm de nickel (Ni).** *5004900.*
Composé organométallique de nickel dans une huile.

**Solution à 10 ppm de nickel (Ni).** *5002000.*
Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *sulfate de nickel R* correspondant à 4,78 g de $NiSO_4,7H_2O$ et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/100 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 5 ppm de nickel (Ni).** *5005900.*
Diluez la *solution à 10 ppm de nickel (Ni) R* au 1/2 avec de l'*eau pour chromatographie R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 0,2 ppm de nickel (Ni).** *5002002.*
Diluez la *solution à 10 ppm de nickel (Ni) R* au 1/50 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 0,1 ppm de nickel (Ni).** *5002001.*
Diluez la *solution à 10 ppm de nickel (Ni) R* au 1/100 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 100 ppm de nitrate ($NO_3$).** *5002100.*
Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *nitrate de potassium R* correspondant à 0,815 g de $KNO_3$ et complétez à 500,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 10 ppm de nitrate ($NO_3$).** *5002101.*
Diluez la *solution à 100 ppm de nitrate ($NO_3$) R* au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 2 ppm de nitrate ($NO_3$).** *5002102.*
Diluez la *solution à 10 ppm de nitrate ($NO_3$) R* au 1/5 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 500 ppm de palladium (Pd).** *5003600.*
Dissolvez 50,0 mg de *palladium R* dans 9 mL d'*acide chlorhydrique R* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution à 20 ppm de palladium (Pd).** *5003602.*
Dissolvez 0,333 g de *chlorure de palladium R* dans 2 mL d'*acide chlorhydrique R* chaud et complétez la solution à 1000,0 mL avec un mélange à volumes égaux d'*acide chlorhydrique dilué R* et d'*eau R*. Immédiatement avant emploi, diluez au 1/10 le volume avec de l'*eau R*.

**Solution à 0,5 ppm de palladium (Pd).** *5003601.*
Diluez 1 mL de *solution à 500 ppm de palladium (Pd) R* avec un mélange de 0,3 volume d'*acide nitrique R* et de 99,7 volumes d'*eau R*, puis complétez à 1000 mL avec le même mélange de solvants.

**Solution à 10 ppm de peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$).** *5005200.*
Prélevez 10,0 mL de *solution diluée de peroxyde d'hydrogène R* et complétez à 300,0 mL avec de l'*eau R*. Prélevez 10,0 mL de cette solution et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*. Préparez extemporanément.

**Solution à 200 ppm de phosphate ($PO_4$).** *5004200.*
Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *phosphate monopotassique R* correspondant à 0,286 g de $KH_2PO_4$ et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

**Solution à 5 ppm de phosphate ($PO_4$).** *5002200.*
Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *phosphate monopotassique R* correspondant à 0,716 g de $KH_2PO_4$ et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/100 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 30 ppm de platine (Pt).** *5002300.*
Dissolvez dans de l'*acide chlorhydrique 1 M* 80 mg d'*acide chloroplatinique R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/10 avec de l'*acide chlorhydrique 1 M* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 0,1 pour cent de plomb (Pb).** *5001700.*
Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *nitrate de plomb R* correspondant à 0,400 g de $Pb(NO_3)_2$ et complétez à 250,0 mL avec le même solvant.

**Solution à 0,1 pour cent de plomb (Pb) R1.** *5005400.*
Dissolvez dans de l'*acide nitrique exempt de plomb, dilué R* une quantité de *nitrate de plomb R* correspondant à 0,400 g de $Pb(NO_3)_2$ et complétez à 250,0 mL avec le même solvant.

**Solution liposoluble à 1000 ppm de plomb (Pb).** *5004800.*
Composé organométallique de plomb dans une huile.

**Solution à 100 ppm de plomb (Pb).** *5001701.*
Diluez la *solution à 0,1 pour cent de plomb (Pb) R* au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 10 ppm de plomb (Pb).** *5001702.*
Diluez la *solution à 100 ppm de plomb (Pb) R* au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

4. Réactifs

**Solution à 10 ppm de plomb (Pb) R1.** *5001706.*

Dissolvez 0,160 g de *nitrate de plomb R* dans 100 mL d'*eau R*, ajoutez 1 mL d'*acide nitrique exempt de plomb R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R* ; diluez au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 10 ppm de plomb (Pb) R2.** *5005401.*

Diluez la *solution à 0,1 pour cent de plomb (Pb) R1* au 1/100 avec de l'*acide nitrique exempt de plomb, dilué R*. Utilisez dans la semaine qui suit.

**Solution à 2 ppm de plomb (Pb).** *5001703.*

Diluez la *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R* au 1/5 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 1 ppm de plomb (Pb).** *5001704.*

Diluez la *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R* au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 0,5 ppm de plomb (Pb).** *5005402.*

Diluez la *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R2* au 1/20 avec de l'*acide nitrique exempt de plomb, dilué R*. Utilisez dans la journée.

**Solution à 0,25 ppm de plomb (Pb).** *5006000.*

Diluez la *solution à 1 ppm de plomb (Pb) R* au 1/4 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 0,1 ppm de plomb (Pb).** *5001705.*

Diluez la *solution à 1 ppm de plomb (Pb) R* au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 0,2 pour cent de potassium (K).** *5002402.*

Dissolvez dans de l'*eau distillée R* une quantité de *sulfate dipotassique R* correspondant à 0,446 g de $K_2SO_4$ et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

**Solution à 600 ppm de potassium (K).** *5005100.*

Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *sulfate dipotassique R* correspondant à 2,676 g de $K_2SO_4$ et complétez à 100,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/20 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 100 ppm de potassium (K).** *5002400.*

Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *sulfate dipotassique R* correspondant à 0,446 g de $K_2SO_4$ et complétez à 100,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/20 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 20 ppm de potassium (K).** *5002401.*

Diluez la *solution à 100 ppm de potassium (K) R* au 1/5 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 100 ppm de sélénium (Se).** *5002500.*

Dissolvez 0,100 g de *sélénium R* dans 2 mL d'*acide nitrique R*. Evaporez à siccité. Reprenez le résidu 3 fois avec 2 mL d'*eau R* en évaporant à siccité après chaque reprise. Dissolvez le résidu dans 50 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et complétez à 1000,0 mL avec le même acide.

**Solution à 1 ppm de sélénium (Se).** *5002501.*

Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité d'*acide sélénieux R* correspondant à 6,54 mg de $H_2SeO_3$ et complétez à 100,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/40 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 1000 ppm de sodium (Na).** *5005700.*

Dissolvez, dans un mélange de 25 mL d'*eau R* et de 25 mL d'*acide nitrique R*, une quantité de *carbonate de sodium anhydre R* correspondant à 2,305 g de $Na_2CO_3$ et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution à 200 ppm de sodium (Na).** *5002700.*

Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *chlorure de sodium R* correspondant à 0,509 g de NaCl et complétez à 100,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 50 ppm de sodium (Na).** *5002701.*

Diluez la *solution à 200 ppm de sodium (Na) R* au 1/4 avec de l'*eau R*.

**Solution à 1,0 pour cent de strontium (Sr).** *5003900.*

Recouvrez avec de l'*eau R* une quantité de *carbonate de strontium R* correspondant à 1,6849 g de $SrCO_3$. Ajoutez avec précaution de l'*acide chlorhydrique R* jusqu'à la dissolution du solide et jusqu'à disparition des signes d'effervescence. Complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution à 100 ppm de sulfate ($SO_4$).** *5002802.*

Dissolvez dans de l'*eau distillée R* une quantité de *sulfate dipotassique R* correspondant à 0,181 g de $K_2SO_4$ et complétez à 100,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/10 avec de l'*eau distillée R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 10 ppm de sulfate ($SO_4$).** *5002800.*

Dissolvez dans de l'*eau distillée R* une quantité de *sulfate dipotassique R* correspondant à 0,181 g de $K_2SO_4$ et complétez à 100,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/100 avec de l'*eau distillée R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 10 ppm de sulfate ($SO_4$) R1.** *5002801.*

Dissolvez dans de l'*éthanol à 30 pour cent V/V R* une quantité de *sulfate dipotassique R* correspondant à 0,181 g de $K_2SO_4$ et complétez à 100,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/100 avec l'*éthanol à 30 pour cent V/V R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 80 ppm de sulfite ($SO_2$).** *5005500.*

Dissolvez 3,150 g de *sulfite de sodium anhydre R* dans de l'*eau distillée R* récemment préparée et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Prélevez 0,5 mL et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau distillée R* récemment préparée.

**Solution à 1,5 ppm de sulfite ($SO_2$).** *5002900.*

Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *métabisulfite de sodium R* correspondant à 0,152 g de $Na_2S_2O_5$ et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Diluez au 1/20 avec de l'*eau R*. A 3,0 mL de cette solution, ajoutez 4,0 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution à 10 ppm de thallium (Tl).** *5003000.*

Dissolvez dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L une quantité de *sulfate thalleux R* correspondant à 0,1235 g de $Tl_2SO_4$ et complétez à 1000,0 mL avec la même solution de chlorure de sodium. Prélevez 10,0 mL de solution et complétez à 100,0 mL avec une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L.

**Solution à 100 ppm de titane (Ti).** *5003200.*

Dissolvez 100,0 mg de *titane R* dans 100 mL d'*acide chlorhydrique R* dilué à 150 mL avec de l'*eau R*, en chauffant si nécessaire. Laissez refroidir et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

**Solution à 1 g/L de vanadium (V).** *5003300.*

Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *vanadate d'ammonium R* correspondant à 0,230 g de $NH_4VO_3$ et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

**Solution à 5 mg de zinc (Zn) par millilitre.** *5003400.*

Dissolvez 3,15 g d'*oxyde de zinc R* dans 15 mL d'*acide chlorhydrique R*. Après dissolution, complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution à 100 ppm de zinc (Zn).** *5003401.*

Dissolvez dans de l'*eau R* une quantité de *sulfate de zinc R* correspondant à 0,440 g de $ZnSO_4,7H_2O$, ajoutez 1 mL d'*acide acétique R* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R* ; diluez au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 10 ppm de zinc (Zn).** *5003402.*

Diluez la *solution à 100 ppm de zinc (Zn) R* au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 5 ppm de zinc (Zn).** *5003403.*

Diluez la *solution à 100 ppm de zinc (Zn) R* au 1/20 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution à 1 g/L de zirconium (Zr).** *5003500.*

Dissolvez dans un mélange de 2 volumes d'*acide chlorhydrique R* et de 8 volumes d'*eau R* une quantité de *nitrate de zirconyle R* correspondant à 0,293 g de $ZrO(NO_3)_2,2H_2O$ et complétez à 100,0 mL avec le même mélange de solvants.

**01/2011:40103**

## 4.1.3. SOLUTIONS TAMPONS

**Solution acétone tamponnée.** *4000100.*

Dissolvez 8,15 g d'*acétate de sodium R* et 42 g de *chlorure de sodium R* dans de l'*eau R,* ajoutez 68 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* et 150 mL d'*acétone R,* complétez à 500 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon acétate pH 4,7 R1.** *4013600.*

Dissolvez 136,1 g d'*acétate de sodium R* dans 500 mL d'*eau R.* Prélevez 250 mL de solution et mélangez avec 250 mL d'*acide acétique dilué R.*

**Solution tampon pH 2,0.** *4000200.*

Dissolvez 6,57 g de *chlorure de potassium R* dans de l'*eau R,* ajoutez 119,0 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon phosphate pH 2,0.** *4007900.*

Dissolvez 8,95 g de *phosphate disodique R* et 3,40 g de *phosphate monopotassique R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant. Si nécessaire, ajustez le pH avec de l'*acide phosphorique R.*

**Solution tampon sulfate pH 2,0.** *4008900.*

Dissolvez 132,1 g de *sulfate d'ammonium R* dans de l'*eau R* et complétez à 500,0 mL avec le même solvant (solution A). A environ 400 mL d'*eau R,* ajoutez avec précaution, sans cesser d'agiter et de refroidir, 14 mL d'*acide sulfurique R,* puis laissez refroidir et complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R* (solution B). Préparez un mélange à volumes égaux de solution A et de solution B. Ajustez le pH si nécessaire.

**Solution tampon pH 2,2.** *4010500.*

Mélangez 6,7 mL d'*acide phosphorique R* et 55,0 mL d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 40 g/L et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon pH 2,5.** *4000300.*

Dissolvez 100 g de *phosphate monopotassique R* dans 800 mL d'*eau R* ; ajustez à pH 2,5 avec de l'*acide chlorhydrique R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon pH 2,5 R1.** *4000400.*

A 4,9 g d'*acide phosphorique dilué R* ajoutez 250 mL d'*eau R.* Ajustez le pH avec de la *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* et complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon phosphate pH 2,8.** *4010600.*

Dissolvez 7,8 g de *phosphate monosodique R* dans 900 mL d'*eau R,* ajustez à pH 2,8 avec de l'*acide phosphorique R* et diluez à 1000 mL avec le même solvant.

**Solution tampon pH 3,0.** *4008000.*

Dissolvez 21,0 g d'*acide citrique R* dans 200 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R.* Prélevez 40,3 mL de solution et complétez à 100,0 mL avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M.*

**Solution tampon citrate pH 3,0 (0,25 M).** *4012600.*

Dissolvez 4,8 g d'*acide citrique R* dans 80 mL d'*eau R.* Ajustez le pH avec de l'*hydroxyde de sodium 1 M* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon phosphate pH 3,0.** *4000500.*

Diluez 0,7 mL d'*acide phosphorique R* dans 100 mL d'*eau R.* Complétez à 900 mL avec le même solvant et ajustez à pH 3,0 avec de la *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R* puis complétez à 1000 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon phosphate pH 3,0 (0,1 M).** *4011500.*

Dissolvez 12,0 g de *phosphate monosodique anhydre R* dans de l'*eau R,* ajustez le pH avec de l'*acide phosphorique dilué R1* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon phosphate pH 3,0 R1.** *4010000.*

Dissolvez 3,40 g de *phosphate monopotassique R* dans 900 mL d'*eau R.* Ajustez à pH 3,0 avec de l'*acide phosphorique R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon phosphate pH 3,2.** *4008100.*

A 900 mL d'une solution de *phosphate monosodique R* à 4 g/L, ajoutez 100 mL d'une solution d'*acide phosphorique R* à 2,5 g/L. Ajustez le pH si nécessaire.

**Solution tampon phosphate pH 3,2 R1.** *4008500.*

Ajustez à pH 3,2 avec de l'*acide phosphorique dilué R,* une solution de *phosphate disodique R* à 35,8 g/L. Prélevez 100,0 mL de cette solution et complétez à 2000,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon pH 3,5.** *4000600.*

Dissolvez 25,0 g d'*acétate d'ammonium R* dans 25 mL d'*eau R* et ajoutez 38,0 mL d'*acide chlorhydrique R1.* Ajustez le pH, si nécessaire, avec de l'*acide chlorhydrique dilué R* ou de l'*ammoniaque diluée R1* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon phosphate pH 3,5.** *4000700.*

Dissolvez 68,0 g de *phosphate monopotassique R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant. Ajustez le pH avec de l'*acide phosphorique R.*

**Solution tampon pH 3,6.** *4000800.*

A 250,0 mL de *solution de phtalate acide de potassium 0,2 M R* ajoutez 11,94 mL d'*acide chlorhydrique 0,2 M* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon pH 3,7.** *4000900.*

A 15,0 mL d'*acide acétique R* ajoutez 60 mL d'*éthanol à 96 pour cent R,* 20 mL d'*eau R* et de l'*ammoniaque R* jusqu'à pH 3,7 (*2.2.3*) et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon acétate de sodium pH 4,0 (0,1 M).** *4013800.*

Dissolvez 822 mg d'*acétate de sodium R* dans 100 mL d'*eau R* (solution A). Diluez 1,44 mL d'*acide acétique glacial R* dans 250 mL d'*eau R* (solution B). Titrez 100 mL de solution B en utilisant environ 20 mL de solution A.

**Solution tampon sulfate de cuivre pH 4,0.** *4001000.*

Dissolvez 0,25 g de *sulfate de cuivre R* et 4,5 g d'*acétate d'ammonium R* dans de l'*acide acétique dilué R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

**Solution tampon acétate pH 4,4.** *4001100.*

Dissolvez 136 g d'*acétate de sodium R* et 77 g d'*acétate d'ammonium R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant. Ajoutez 250,0 mL d'*acide acétique glacial R* et mélangez.

**Solution tampon phtalate pH 4,4.** *4001200.*

Dissolvez 2,042 g de *phtalate acide de potassium R* dans 50 mL d'*eau R*, ajoutez 7,5 mL d'*hydroxyde de sodium 0,2 M* et complétez à 200,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon acétate pH 4,5.** *4012500.*

Dissolvez 77,1 g d'*acétate d'ammonium R* dans de l'*eau R*, ajoutez 70 mL d'*acide acétique glacial R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon acétate de sodium pH 4,5.** *4010100.*

Dissolvez 63 g d'*acétate de sodium anhydre R* dans de l'*eau R* et ajoutez 90 mL d'*acide acétique R*. Ajustez à pH 4,5, puis complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon phosphate pH 4,5 (0,05 M).** *4009000.*

Dissolvez 6,80 g de *phosphate monopotassique R* dans 1000,0 mL d'*eau R*. Le pH (*2.2.3*) de la solution est de 4,5.

**Solution tampon acétate pH 4,6.** *4001400.*

Dissolvez 5,4 g d'*acétate de sodium R* dans 50 mL d'*eau R*, ajoutez 2,4 g d'*acide acétique glacial R* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Ajustez le pH si nécessaire.

**Solution tampon succinate pH 4,6.** *4001500.*

Dissolvez 11,8 g d'*acide succinique R* dans un mélange de 600 mL d'*eau R* et de 82 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M*. Complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon acétate pH 4,7.** *4001600.*

Dissolvez 136,1 g d'*acétate de sodium R* dans 500 mL d'*eau R*. Prélevez 250 mL de solution et mélangez avec 250 mL d'*acide acétique dilué R*. Agitez à 2 reprises avec une solution, récemment préparée puis filtrée, de *dithizone R* à 0,1 g/L dans le *chloroforme R*. Agitez avec du *tétrachlorure de carbone R* jusqu'à obtention d'une phase organique incolore. Filtrez la phase aqueuse pour éliminer les traces de tétrachlorure de carbone.

**Solution tampon acétate pH 5,0.** *4009100.*

A 120 mL d'une solution d'*acide acétique glacial R* à 6 g/L, ajoutez 100 mL d'*hydroxyde de potassium 0,1 M* et environ 250 mL d'*eau R*. Mélangez. Ajustez à pH 5,0 avec une solution d'*acide acétique R* à 6 g/L ou avec de l'*hydroxyde de potassium 0,1 M* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon citrate pH 5,0.** *4010700.*

Préparez une solution contenant 20,1 g/L d'*acide citrique R* et 8,0 g/L d'*hydroxyde de sodium R*. Ajustez le pH avec de l'*acide chlorhydrique dilué R*.

**Solution tampon phosphate pH 5,0.** *4011300.*

Dissolvez 2,72 g de *phosphate monopotassique R* dans 800 mL d'*eau R*. Ajustez le pH avec de l'*hydroxyde de potassium 1 M* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon pH 5,2.** *4001700.*

Dissolvez 1,02 g de *phtalate acide de potassium R* dans 30,0 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon phosphate pH 5,4 (0,067 M).** *4012000.*

Mélangez des volumes appropriés d'une solution de *phosphate disodique R* à 23,99 g/L et d'une solution de *phosphate monosodique monohydraté R* à 9,12 g/L pour obtenir un pH de 5,4 (*2.2.3*).

**Solution tampon pH 5,5.** *4001800.*

Dissolvez 54,4 g d'*acétate de sodium R* dans 50 mL d'*eau R* en chauffant si nécessaire à 35 °C. Après refroidissement, ajoutez lentement 10 mL d'*acide acétique anhydre R*, agitez et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon acétate-édétate pH 5,5.** *4001900.*

Dissolvez 250 g d'*acétate d'ammonium R* et 15 g d'*édétate de sodium R* dans 400 mL d'*eau R* et ajoutez 125 mL d'*acide acétique glacial R*.

**Solution tampon phosphate pH 5,5.** *4002000.*

Dissolvez 13,61 g de *phosphate monopotassique R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant (solution A). Dissolvez 35,81 g de *phosphate disodique R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant (solution B). A 96,4 mL de solution A, ajoutez 3,6 mL de solution B.

**Solution tampon phosphate-citrate pH 5,5.** *4008700.*

Mélangez 56,85 mL d'une solution de *phosphate disodique anhydre R* à 28,4 g/L et 43,15 mL d'une solution d'*acide citrique R* à 21 g/L.

**Solution tampon phosphate pH 5,6.** *4011200.*

Dissolvez 0,908 g de *phosphate monopotassique R* dans de l'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant (solution A). Dissolvez 1,161 g de *phosphate dipotassique R* dans de l'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant (solution B). A 94,4 mL de solution A, ajoutez 5,6 mL de solution B. Si nécessaire, ajustez à pH 5,6 avec la solution A ou la solution B.

**Solution tampon phosphate pH 5,8.** *4002100.*

Dissolvez 1,19 g de *phosphate disodique dihydraté R* et 8,25 g de *phosphate monopotassique R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

**Solution tampon acétate pH 6,0.** *4002200.*

Dissolvez 100 g d'*acétate d'ammonium R* dans 300 mL d'*eau R* et ajoutez 4,1 mL d'*acide acétique glacial R* ; ajustez le pH si nécessaire avec de l'*ammoniaque R* ou de l'*acide acétique R* et complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon phosphate de diéthylammonium pH 6,0.** *4002300.*

Prélevez 68 mL d'*acide phosphorique R* et complétez à 500 mL avec de l'*eau R*. A 25 mL de solution, ajoutez 450 mL d'*eau R* et 6 mL de *diéthylamine R*. Ajustez à pH 6 ± 0,05 si nécessaire, avec de la *diéthylamine R* ou de l'*acide phosphorique R* et complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon phosphate pH 6,0.** *4002400.*

Mélangez 63,2 mL d'une solution de *phosphate disodique R* à 71,5 g/L avec 36,8 mL d'une solution d'*acide citrique R* à 21 g/L.

**Solution tampon phosphate pH 6,0 R1.** *4002500.*

Dissolvez 6,8 g de *phosphate monosodique R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant. Ajustez le pH avec la *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R*.

**Solution tampon phosphate pH 6,0 R2.** *4002600.*

A 250 mL de *solution de phosphate monopotassique 0,2 M R* ajoutez 28,5 mL d'*hydroxyde de sodium 0,2 M* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon phosphate pH 6,4.** *4002800.*

Dissolvez 2,5 g de *phosphate disodique R*, 2,5 g de *phosphate monosodique R* et 8,2 g de *chlorure de sodium R* dans 950 mL d'*eau R*. Ajustez à pH 6,4 avec de l'*hydroxyde de sodium 1 M* ou de l'*acide chlorhydrique 1 M* si nécessaire. Complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon phtalate pH 6,4 (0,5 M).** *4009200.*

Dissolvez 100 g de *phtalate acide de potassium R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant. Ajustez le pH, si nécessaire, avec de la *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R*.

**Solution tampon pH 6,5.** *4002900.*

Dissolvez 60,5 g de *phosphate disodique R* et 46 g de *phosphate monopotassique R* dans de l'*eau R*. Ajoutez 100 mL d'*édétate de sodium 0,02 M* et 20 mg de *chlorure mercurique R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

**Solution tampon imidazole pH 6,5.** *4003000.*

Dissolvez 6,81 g d'*imidazole R*, 1,23 g de *sulfate de magnésium R* et 0,73 g de *sulfate de calcium R* dans 752 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M*. Ajustez le pH si nécessaire et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon phosphate pH 6,5.** *4012800.*

Dissolvez 2,75 g de *phosphate monosodique R* et 4,5 g de *chlorure de sodium R* dans 500 mL d'*eau R*. Ajustez le pH avec de la *solution tampon phosphate pH 8,5 R*.

**Solution tampon phosphate pH 6,5 (0,1 M).** *4010800.*

Dissolvez 13,80 g de *phosphate monosodique monohydraté R* dans 900 mL d'*eau distillée R*. Ajustez le pH avec une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 400 g/L, puis complétez à 1000 mL avec de l'*eau distillée R*.

**Solution tampon pH 6,6.** *4003100.*

A 250,0 mL de *solution de phosphate monopotassique 0,2 M R*, ajoutez 89,0 mL d'*hydroxyde de sodium 0,2 M* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution saline tamponnée phosphate pH 6,8.** *4003200.*

Dissolvez 1,0 g de *phosphate monopotassique R*, 2,0 g de *phosphate dipotassique R* et 8,5 g de *chlorure de sodium R* dans 900 mL d'*eau R*, ajustez le pH si nécessaire et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

**Solution tampon phosphate pH 6,8.** *4003300.*

Mélangez 77,3 mL d'une solution de *phosphate disodique R* à 71,5 g/L avec 22,7 mL d'une solution d'*acide citrique R* à 21 g/L.

**Solution tampon phosphate pH 6,8 R1.** *4003400.*

A 51,0 mL d'une solution de *phosphate monopotassique R* à 27,2 g/L, ajoutez 49,0 mL d'une solution de *phosphate disodique R* à 71,6 g/L. Ajustez le pH si nécessaire.

*Conservation* : de 2 °C à 8 °C.

**Solution tampon tris-chlorhydrate pH 6,8 (1 M).** *4009300.*

Dissolvez 60,6 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* dans 400 mL d'*eau R*. Ajustez le pH avec de l'*acide chlorhydrique R* et complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon pH 7,0.** *4003500.*

A 1000 mL d'une solution à 18 g/L de *phosphate disodique R* et à 23 g/L de *chlorure de sodium R*, ajoutez la quantité nécessaire (environ 280 mL) d'une solution à 7,8 g/L de *phosphate monosodique R* et à 23 g/L de *chlorure de sodium R* pour ajuster le pH. Dissolvez dans la solution une quantité suffisante d'*azide de sodium R* pour obtenir une solution à 0,2 g/L.

**Solution tampon maléate pH 7,0.** *4003600.*

Dissolvez 10,0 g de *chlorure de sodium R*, 6,06 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* et 4,90 g d'*anhydride maléique R* dans 900 mL d'*eau R*. Ajustez le pH avec une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 170 g/L. Complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

*Conservation* : de 2 °C à 8 °C, limitée à 3 jours.

**Solution tampon phosphate pH 7,0.** *4003700.*

Mélangez 82,4 mL d'une solution de *phosphate disodique R* à 71,5 g/L avec 17,6 mL d'une solution d'*acide citrique R* à 21 g/L.

**Solution tampon phosphate pH 7,0 (0,025 M).** *4009400.*

Mélangez 1 volume de *solution tampon phosphate pH 7,0 (0,063 M) R* et 1,5 volume d'*eau R*.

**Solution tampon phosphate pH 7,0 (0,03 M).** *4010300.*

Dissolvez 5,2 g de *phosphate dipotassique R* dans 900 mL d'*eau pour chromatographie R*. Ajustez la solution à pH 7,0 ± 0,1 avec de l'*acide phosphorique R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau pour chromatographie R*.

**Solution tampon phosphate pH 7,0 (0,05 M).** *4012400.*

Mélangez 34 mL d'*eau R* et 100 mL de *solution tampon phosphate pH 7,0 (0,067 M) R*.

**Solution tampon phosphate pH 7,0 (0,063 M).** *4009500.*

Dissolvez 5,18 g de *phosphate disodique anhydre R* et 3,65 g de *phosphate monosodique monohydraté R* dans 950 mL d'*eau R*. Ajustez le pH avec de l'*acide phosphorique R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon phosphate pH 7,0 (0,067 M).** *4003800.*

Dissolvez 0,908 g de *phosphate monopotassique R* dans de l'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant (solution A). Dissolvez 2,38 g de *phosphate disodique R* dans de l'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant (solution B). Mélangez 38,9 mL de solution A avec 61,1 mL de solution B et ajustez le pH si nécessaire.

**Solution tampon phosphate pH 7,0 (0,1 M).** *4008200.*

Dissolvez 1,361 g de *phosphate monopotassique R* dans de l'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Ajustez le pH avec une solution de *phosphate disodique R* à 35 g/L.

**Solution tampon phosphate pH 7,0 R1.** *4003900.*

Mélangez 250,0 mL de *solution de phosphate monopotassique 0,2 M R* avec 148,2 mL d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 8 g/L. Ajustez le pH si nécessaire et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon phosphate pH 7,0 R2.** *4004000.*

Mélangez 50,0 mL d'une solution de *phosphate monopotassique R* à 136 g/L avec 29,5 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Ajustez à pH 7,0 ± 0,1.

**Solution tampon phosphate pH 7,0 R3.** *4008600.*

Dissolvez 5 g de *phosphate monopotassique R* et 11 g de *phosphate dipotassique R* dans 900 mL d'*eau R*. Ajustez à pH 7,0 avec de l'*acide phosphorique dilué R* ou de la *solution d'hydroxyde de sodium diluée R*. Complétez à 1000 mL avec de l'*eau R* et mélangez.

**Solution tampon phosphate pH 7,0 R4.** *4010200.*

Dissolvez 28,4 g de *phosphate disodique anhydre R* et 18,2 g de *phosphate monopotassique R* dans de l'*eau R* et complétez à 500 mL avec le même solvant.

**Solution tampon phosphate pH 7,0 R5.** *4011400.*

Dissolvez 28,4 g de *phosphate disodique anhydre R* dans 800 mL d'*eau R*. Ajustez le pH avec une solution d'*acide phosphorique R* à 30 pour cent *m/m* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon tétrabutylammonium pH 7,0.** *4010900.*

Dissolvez 6,16 g d'*acétate d'ammonium R* dans un mélange de 15 mL de *solution d'hydroxyde de tétrabutylammonium (400 g/L) R* et de 185 mL d'*eau R*. Ajustez le pH avec de l'*acide nitrique R*.

**Solution physiologique tamponnée à pH 7,2.** *4004300.*

Dissolvez dans de l'*eau R* 8,0 g de *chlorure de sodium R,* 0,2 g de *chlorure de potassium R,* 0,1 g de *chlorure de calcium anhydre R,* 0,1 g de *chlorure de magnésium R,* 3,18 g de *phosphate disodique R* et 0,2 g de *phosphate monopotassique R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution saline tamponnée phosphate-albumine pH 7,2.** *4004400.*

Dissolvez 10,75 g de *phosphate disodique R,* 7,6 g de *chlorure de sodium R* et 10 g d'*albumine bovine R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant. Immédiatement avant l'emploi, ajustez le pH avec de la *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* ou de l'*acide phosphorique dilué R.*

**Solution saline tamponnée phosphate-albumine pH 7,2 R1.** *4009600.*

Dissolvez 10,75 g de *phosphate disodique R,* 7,6 g de *chlorure de sodium R* et 1 g d'*albumine bovine R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant. Immédiatement avant emploi, ajustez le pH avec de la *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* ou de l'*acide phosphorique dilué R.*

**Solution tampon pH 7,2.** *4004100.*

A 250,0 mL de *solution de phosphate monopotassique 0,2 M R* ajoutez 175,0 mL d'*hydroxyde de sodium 0,2 M* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.* Ajustez le pH si nécessaire.

**Solution tampon phosphate pH 7,2.** *4004200.*

Mélangez 87,0 mL d'une solution de *phosphate disodique R* à 71,5 g/L avec 13,0 mL d'une solution d'*acide citrique R* à 21 g/L.

**Solution tampon imidazole pH 7,3.** *4004500.*

Dissolvez 3,4 g d'*imidazole R* et 5,8 g de *chlorure de sodium R* dans de l'*eau R* ; ajoutez 18,6 mL d'*acide chlorhydrique 1 M* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.* Ajustez le pH si nécessaire.

**Solution saline tamponnée phosphate pH 7,4.** *4005000.*

Dissolvez 2,38 g de *phosphate disodique R,* 0,19 g de *phosphate monopotassique R* et 8,0 g de *chlorure de sodium R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant. Ajustez le pH si nécessaire.

**Solution tampon pH 7,4.** *4004600.*

Dissolvez 0,6 g de *phosphate monopotassique R,* 6,4 g de *phosphate disodique R* et 5,85 g de *chlorure de sodium R* dans de l'*eau R.* Complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.* Ajustez le pH si nécessaire.

**Solution tampon barbital pH 7,4.** *4004700.*

Mélangez 50 mL d'une solution contenant 19,44 g/L d'*acétate de sodium R* et 29,46 g/L de *barbital sodique R* dans de l'*eau R* avec 50,5 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M,* ajoutez 20 mL d'une solution de *chlorure de sodium R* à 85 g/L et complétez à 250 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon phosphate pH 7,4.** *4004800.*

A 393,4 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M,* ajoutez 250,0 mL de *phosphate monopotassique 0,2 M R.*

**Solution tampon tris-acétate de sodium pH 7,4.** *4012900.*

Dissolvez 6,3 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* et 4,9 g d'*acétate de sodium anhydre R* dans 900 mL d'*eau R.* Ajustez à pH 7,4 avec de l'*acide sulfurique R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon tris-acétate de sodium-chlorure de sodium pH 7,4.** *4013000.*

Dissolvez 30,0 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R,* 14,5 g d'*acétate de sodium anhydre R* et 14,6 g de *chlorure de sodium R* dans 900 mL d'*eau R.* Ajoutez 0,50 g d'*albumine bovine R.* Ajustez à pH 7,4 avec de l'*acide sulfurique R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane pH 7,4.** *4012100.*

Dissolvez 30,3 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* dans environ 200 mL d'*eau R.* Ajoutez 183 mL d'*acide chlorhydrique 1 M.* Complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R.* *NOTE : le pH est de 7,7-7,8 à température ambiante et de 7,4 à 37 °C. Conservée à 4 °C, la solution reste stable pendant plusieurs mois.*

**Solution tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane-chlorure de sodium pH 7,4.** *4004900.*

Dissolvez 6,08 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* et 8,77 g de *chlorure de sodium R* dans 500 mL d'*eau distillée R.* Ajoutez 10,0 g d'*albumine bovine R.* Ajustez à pH 7,4 avec de l'*acide chlorhydrique R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau distillée R.*

**Solution tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane-chlorure de sodium pH 7,4 R1.** *4012200.*

Dissolvez 0,1 g d'*albumine bovine R* dans un mélange de 2 mL de *solution tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane pH 7,4 R* et de 50 mL d'une solution de *chlorure de sodium R* à 5,84 g/L. Complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon borate pH 7,5.** *4005200.*

Dissolvez 2,5 g de *chlorure de sodium R,* 2,85 g de *tétraborate de disodium R* et 10,5 g d'*acide borique R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant. Ajustez le pH si nécessaire.

*Conservation* : à une température de 2 °C à 8 °C.

**Solution tampon HEPES pH 7,5.** *4009700.*

Dissolvez 2,38 g d'*acide 2-[4-(2-hydroxyéthyl)pipérazin-1-yl]éthanesulfonique R* dans environ 90 mL d'*eau R.* Ajustez à pH 7,5 avec de la *solution d'hydroxyde de sodium R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon phosphate pH 7,5 (0,2 M).** *4005400.*

Dissolvez 27,22 g de *phosphate monopotassique R* dans 930 mL d'*eau R* ; ajustez à pH 7,5 avec une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 300 g/L et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon phosphate pH 7,5 (0,33 M).** *4005300.*

Dissolvez 119,31 g de *phosphate disodique R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant (solution A). Dissolvez 45,36 g de *phosphate monopotassique R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant (solution B). Mélangez 85 mL de solution A avec 15 mL de solution B et ajustez le pH si nécessaire.

**Solution tampon tris-chlorhydrate pH 7,5 (0,05 M).** *4005600.*

Dissolvez 6,057 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* dans de l'*eau R.* Ajustez le pH avec de l'*acide chlorhydrique R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane pH 7,5.** *4005500.*

Dissolvez 7,27 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* et 5,27 g de *chlorure de sodium R* dans de l'*eau R,* ajustez le pH si nécessaire, et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon citrate pH 7,8 (citrate de sodium 0,034 M, chlorure de sodium 0,101 M).** *4009800.*

Dissolvez 10,0 g de *citrate de sodium R* et 5,90 g de *chlorure de sodium R* dans 900 mL d'*eau R.* Ajustez le pH avec de l'*acide chlorhydrique R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon pH 8,0.** *4005900.*

A 50,0 mL de *solution de phosphate monopotassique 0,2 M R* ajoutez 46,8 mL d'*hydroxyde de sodium 0,2 M* et complétez à 200,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon pH 8,0 R1.** *4010400.*
Dissolvez 20 g de *phosphate dipotassique R* dans 900 mL d'*eau R*. Ajustez le pH avec de l'*acide phosphorique R*. Complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon borate pH 8,0 (0,0015 M).** *4006000.*
Dissolvez 0,572 g de *tétraborate de disodium R* et 2,94 g de *chlorure de calcium R* dans 800 mL d'*eau R*. Ajustez le pH avec de l'*acide chlorhydrique 1 M* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon phosphate pH 8,0 (0,02 M).** *4006100.*
A 50,0 mL de *solution de phosphate monopotassique 0,2 M R*, ajoutez 46,8 mL d'*hydroxyde de sodium 0,2 M* et complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon phosphate de sodium pH 8,0 (0,02 M).** *4013700.*
Dissolvez 0,31 g de *phosphate monosodique R* dans 70 mL d'*eau R* et ajustez à pH 8,0 avec de l'*hydroxyde de sodium 1 M*, puis complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon phosphate pH 8,0 (0,1 M).** *4008400.*
Dissolvez 0,523 g de *phosphate monopotassique R* et 16,73 g de *phosphate dipotassique R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

**Solution tampon phosphate pH 8,0 (1 M).** *4007800.*
Dissolvez 136,1 g de *phosphate monopotassique R* dans de l'*eau R*, ajustez le pH avec de l'*hydroxyde de sodium 1 M* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon tris-acétate de sodium pH 8,0.** *4013100.*
Dissolvez 6,3 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* et 4,9 g d'*acétate de sodium anhydre R* dans 900 mL d'*eau R*. Ajustez à pH 8,0 avec de l'*acide sulfurique R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon tris-acétate de sodium-chlorure de sodium pH 8,0.** *4013200.*
Dissolvez 30,0 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R*, 14,5 g d'*acétate de sodium anhydre R* et 14,6 g de *chlorure de sodium R* dans 900 mL d'*eau R*. Ajoutez 0,50 g d'*albumine bovine R*. Ajustez à pH 8,0 avec de l'*acide sulfurique R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon tris-chlorhydrate pH 8,0.** *4012300.*
Dissolvez 1,21 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* et 29,4 mg de *chlorure de calcium R* dans de l'*eau R*. Ajustez le pH avec de l'*acide chlorhydrique 1 M* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon tris-chlorhydrate pH 8,0 (1 M).** *4012700.*
Dissolvez 121,1 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* et 1,47 g de *chlorure de calcium R* dans 900 mL d'*eau R*. Ajustez le pH avec de l'*acide chlorhydrique R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane pH 8,1.** *4006200.*
Dissolvez 0,294 g de *chlorure de calcium R* dans 40 mL de *solution de tris(hydroxyméthyl)aminométhane R*, ajustez le pH avec de l'*acide chlorhydrique 1 M* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon tris-chlorhydrate pH 8,3.** *4011800.*
Dissolvez 9,0 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* dans 2,9 L d'*eau R*. Ajustez le pH avec de l'*acide chlorhydrique 1 M* et complétez à 3 L avec de l'*eau R*.

**Solution tampon tris-glycine pH 8,3.** *4006300.*
Dissolvez 6,0 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* et 28,8 g de *glycine R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant ; diluez au 1/10 avec de l'*eau R* immédiatement avant l'emploi.

**Solution tampon barbital pH 8,4.** *4006400.*
Dissolvez 8,25 g de *barbital sodique R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

**Solution tampon tris-EDTA ASB pH 8,4.** *4006500.*
Dissolvez 6,1 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R*, 2,8 g d'*édétate de sodium R*, 10,2 g de *chlorure de sodium R* et 10 g d'*albumine bovine R* dans de l'*eau R*, ajustez à pH 8,4 avec de l'*acide chlorhydrique 1 M* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane-EDTA pH 8,4.** *4006600.*
Dissolvez 5,12 g de *chlorure de sodium R*, 3,03 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* et 1,40 g d'*édétate sodique R* dans 250 mL d'*eau distillée R*. Ajustez à pH 8,4 à l'aide d'*acide chlorhydrique R* et complétez à 500,0 mL avec de l'*eau distillée R*.

**Solution tampon phosphate pH 8,5.** *4013300.*
Dissolvez 3,5 g de *phosphate dipotassique R* et 4,5 g de *chlorure de sodium R* dans 500 mL d'*eau R*. Ajustez le pH avec un mélange à volumes égaux d'*acide phosphorique dilué R* et d'*eau R*.

**Solution tampon tris-acétate pH 8,5.** *4006700.*
Dissolvez 0,294 g de *chlorure de calcium R* et 12,11 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* dans de l'*eau R*, ajustez le pH avec de l'*acide acétique R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon barbital pH 8,6 R1.** *4006900.*
Dissolvez 1,38 g de *barbital R*, 8,76 g de *barbital sodique R* et 0,38 g de *lactate de calcium R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

**Solution tampon tris-chlorhydrate pH 8,8 (1,5 M).** *4009900.*
Dissolvez 90,8 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* dans 400 mL d'*eau R*. Ajustez le pH avec de l'*acide chlorhydrique R* et complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon tris-chlorhydrate pH 9,0 (0,05 M).** *4013500.*
Dissolvez 0,605 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* dans de l'*eau R*. Ajustez le pH avec de l'*acide chlorhydrique 1 M* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon pH 9,0.** *4007000.*
Dissolvez 6,18 g d'*acide borique R* dans de la *solution de chlorure de potassium 0,1 M R* et complétez à 1000,0 mL avec la même solution. Mélangez 1000,0 mL de cette solution avec 420,0 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M*.

**Solution tampon pH 9,0 R1.** *4007100.*
Dissolvez 6,20 g d'*acide borique R* dans 500 mL d'*eau R*, ajustez le pH avec de l'*hydroxyde de sodium 1 M* (environ 41,5 mL) et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon phosphate pH 9,0.** *4008300.*
Dissolvez 1,74 g de *phosphate monopotassique R* dans 80 mL d'*eau R*, ajustez le pH avec de l'*hydroxyde de potassium 1 M* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon chlorure d'ammonium pH 9,5.** *4007200.*
Dissolvez 33,5 g de *chlorure d'ammonium R* dans 150 mL d'*eau R*, ajoutez 42,0 mL d'*ammoniaque concentrée R* et complétez à 250,0 mL avec de l'*eau R*.
*Conservation* : en récipient de polyéthylène.

**Solution tampon chlorure d'ammonium pH 10,0.** *4007300.*
Dissolvez 5,4 g de *chlorure d'ammonium R* dans 20 mL d'*eau R*, ajoutez 35,0 mL d'*ammoniaque R* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solution tampon diéthanolamine pH 10,0.** *4007500.*

Dissolvez 96,4 g de *diéthanolamine R* dans de l'*eau R* et complétez à 400 mL avec le même solvant. Ajoutez 0,5 mL d'une solution de *chlorure de magnésium R* à 186 g/L. Ajustez le pH avec de l'*acide chlorhydrique 1 M* et complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon carbonate d'ammonium pH 10,3 (0,1 M).** *4011900.*

Dissolvez 7,91 g de *carbonate d'ammonium R* dans 800 mL d'*eau R*. Ajustez le pH avec de la *solution diluée d'hydroxyde de sodium R*. Complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon borate pH 10,4.** *4011100.*

Dissolvez 24,64 g d'*acide borique R* dans 900 mL d'*eau distillée R*. Ajustez le pH avec une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 400 g/L, puis complétez à 1000 mL avec de l'*eau distillée R.*

**Solution tampon chlorure d'ammonium pH 10,4.** *4011000.*

Dissolvez 70 g de *chlorure d'ammonium R* dans 200 mL d'*eau R,* ajoutez 330 mL d'*ammoniaque concentrée R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*. Si nécessaire, ajustez à pH 10,4 avec de l'*ammoniaque R.*

**Solution tampon chlorure d'ammonium pH 10,7.** *4013400.*

Dissolvez 67,5 g de *chlorure d'ammonium R* dans de l'*eau R,* ajoutez 570 mL d'*ammoniaque concentrée R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solution tampon pH 10,9.** *4007600.*

Dissolvez 6,75 g de *chlorure d'ammonium R* dans de l'*ammoniaque R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

**Solution tampon pour ajustement de la force ionique totale.** *4007700.*

Dissolvez 58,5 g de *chlorure de sodium R,* 57,0 mL d'*acide acétique glacial R,* 61,5 g d'*acétate de sodium R* et 5,0 g d'*acide cyclohexylènedinitrilotétraacétique R* dans de l'*eau R* et complétez à 500,0 mL avec le même solvant. Ajustez à pH 5,0-5,5 avec une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 335 g/L et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau distillée R.*

**Solution tampon pour ajustement de la force ionique totale R1.** *4008800.*

Dissolvez 210 g d'*acide citrique R* dans 400 mL d'*eau distillée R*. Ajustez à pH 7,0 avec de l'*ammoniaque concentrée R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau distillée R* (solution A). Dissolvez 132 g de *phosphate d'ammonium R* dans de l'*eau distillée R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant (solution B). A une suspension de 292 g d'*acide (éthylènedinitrilo)tétraacétique R* dans environ 500 mL d'*eau distillée R,* ajoutez environ 200 mL d'*ammoniaque concentrée R* pour dissoudre. Ajustez à pH 6-7 avec de l'*ammoniaque concentrée R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau distillée R* (solution C). Mélangez des volumes égaux des solutions A, B et C et ajustez à pH 7,5 avec de l'*ammoniaque concentrée R.*

# 4.2. VOLUMÉTRIE

**04/2010:40201**

## 4.2.1. SUBSTANCES ÉTALONS POUR VOLUMÉTRIE

Les substances étalons pour volumétrie sont désignées par les lettres RV. Des substances étalons de qualité appropriée peuvent être disponibles dans le commerce ou peuvent être préparées d'après les indications suivantes.

**Arsénieux (anhydride).** $As_2O_3$. ($M_r$ 197,8). *2000100.* [1327-53-3].

Faites sublimer l'*anhydride arsénieux R* dans un appareil approprié.

*Conservation* : sur *gel de silice anhydre R.*

**Benzoïque (acide).** $C_7H_6O_2$. ($M_r$ 122,1). *2000200.* [65-85-0].

Faites sublimer l'*acide benzoïque R* dans un appareil approprié.

**Potassium (bromate de).** $KBrO_3$. ($M_r$ 167,0). *2000300.* [7758-01-2].

Faites cristalliser le *bromate de potassium R* dans l'*eau R* bouillante. Essorez et desséchez les cristaux à 180 °C jusqu'à masse constante.

**Potassium (phtalate acide de).** $C_8H_5KO_4$. ($M_r$ 204,2). *2000400.* [877-24-7].

Faites cristalliser le *phtalate acide de potassium R* dans l'*eau R* bouillante et recueillez les cristaux à une température supérieure à 35 °C. Desséchez les cristaux à 110 °C jusqu'à masse constante.

**Sodium (carbonate de).** $Na_2CO_3$. ($M_r$ 106,0). *2000500.* [497-19-8].

Filtrez, à température ambiante, une *solution de carbonate de sodium R* saturée, puis introduisez lentement dans le filtrat un courant de *dioxyde de carbone R* en refroidissant et en agitant. Après environ 2 h, recueillez le précipité sur un filtre de verre fritté (*2.1.2*), puis lavez avec de l'*eau R* glacée contenant du dioxyde de carbone. Après dessiccation à 100-105 °C, chauffez à 270-300 °C jusqu'à masse constante en remuant de temps en temps.

**Sodium (chlorure de).** NaCl. ($M_r$ 58,44). *2000600.* [7647-14-5].

A 1 volume de la *solution saturée de chlorure de sodium R,* ajoutez 2 volumes d'*acide chlorhydrique R*. Essorez les cristaux et lavez à l'*acide chlorhydrique R1.* Eliminez l'acide chlorhydrique par chauffage au bain-marie. Desséchez les cristaux à 300 °C jusqu'à masse constante.

**Sulfanilique (acide).** $C_6H_7NO_3S$. ($M_r$ 173,2). *2000700.* [121-57-3].

Faites cristalliser l'*acide sulfanilique R* dans l'*eau R* bouillante. Filtrez et séchez à 100-105 °C jusqu'à masse constante.

**Zinc.** Zn. ($A_r$ 65,4). *2000800.* [7440-66-6].

*Teneur* : au minimum 99,9 pour cent.

**04/2010:40202**

## 4.2.2. SOLUTIONS TITRÉES

Les solutions titrées pour volumétrie sont préparées suivant les normes de la chimie analytique classique et les appareils utilisés sont soumis à un contrôle qui garantit les limites d'exactitude pour l'opération envisagée.

La concentration des solutions titrées est indiquée en termes de molarité. La molarité exprime en nombre de moles la quantité de matière dissoute dans 1 L de solution. Une solution qui contient $x$ moles de matière par litre est dite $x$ M.

Le facteur de correction des solutions titrées est au maximum de ± 10 pour cent. La molarité des solutions titrées est déterminée par un nombre approprié de titrages. La répétabilité ne dépasse pas 0,2 pour cent (écart type relatif).

Les solutions titrées sont vérifiées d'après les techniques décrites dans ce chapitre. Lorsqu'un dosage dans une monographie est effectué par une méthode électrochimique (par exemple ampérométrie, potentiométrie), les solutions titrées sont étalonnées par la même méthode. Le milieu dans lequel la détermination du titre est effectuée devrait correspondre en composition à celui dans lequel la solution titrée sera utilisée.

Les solutions titrées de titre inférieur à celui des solutions décrites dans ce chapitre sont préparées par dilution de la solution la moins concentrée présentant une détermination du titre, avec de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R*. Les facteurs de correction de ces solutions sont les mêmes que ceux des solutions titrées utilisées pour leur préparation.

**Acétique (acide) 0,1 M.** *3008900.*

Prélevez 6,0 g d'*acide acétique glacial R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

*Détermination du titre.* A 25 mL de la solution d'acide acétique, ajoutez 0,5 mL de *solution de phénolphtaléine R* et titrez par l'*hydroxyde de sodium 0,1 M.*

**Ammonium et de cérium (nitrate d') 0,1 M.** *3000100.*

Agitez 56 mL d'*acide sulfurique R* et 54,82 g de *nitrate d'ammonium et de cérium R* pendant 2 min. Ajoutez 5 fois de suite 100 mL d'*eau R* et agitez après chaque addition. Complétez la solution limpide à 1000,0 mL avec de l'*eau R.* Déterminez le titre de la solution 10 jours après sa préparation.

*Détermination du titre.* A 25,0 mL de la solution de nitrate d'ammonium et de cérium, ajoutez 2,0 g d'*iodure de potassium R* et 150 mL d'*eau R*. Titrez immédiatement par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* en présence de 1 mL de *solution d'amidon R.*

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Ammonium et de cérium (nitrate d') 0,01 M.** *3000200.*

Prélevez 100,0 mL de *nitrate d'ammonium et de cérium 0,1 M,* ajoutez, en refroidissant, 30 mL d'*acide sulfurique R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

**Ammonium et de cérium (sulfate d') 0,1 M.** *3000300.*

Dissolvez 65,0 g de *sulfate d'ammonium et de cérium R* dans un mélange de 500 mL d'*eau R* et de 30 mL d'*acide sulfurique R.* Laissez refroidir et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

*Détermination du titre.* A 25,0 mL de la solution de sulfate d'ammonium et de cérium, ajoutez 2,0 g d'*iodure de potassium R* et 150 mL d'*eau R*. Titrez immédiatement par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* en présence de 1 mL de *solution d'amidon R.*

**Ammonium et de cérium (sulfate d') 0,01 M.** *3000400.*

Prélevez 100,0 mL de *sulfate d'ammonium et de cérium 0,1 M.* Ajoutez, en refroidissant, 30 mL d'*acide sulfurique R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

**Ammonium (thiocyanate d') 0,1 M.** *3000500.*

Dissolvez 7,612 g de *thiocyanate d'ammonium R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* Prélevez 20,0 mL de *nitrate d'argent 0,1 M.* Ajoutez 25 mL d'*eau R* et 2 mL d'*acide nitrique dilué R* ; titrez par la solution de thiocyanate d'ammonium en présence de 2 mL de *solution de sulfate ferrique et d'ammonium R2* jusqu'à coloration jaune-rouge.

**Argent (nitrate d') 0,1 M.** *3005600.*

Dissolvez 17,0 g de *nitrate d'argent R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* Dissolvez 0,100 g de *chlorure de sodium RV* dans 30 mL d'*eau R*. Titrez par la solution de nitrate d'argent et déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (*2.2.20*).

1 mL de *nitrate d'argent 0,1 M* correspond à 5,844 mg de NaCl.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Argent (nitrate d') 0,001 M.** *3009300.*

Prélevez 5,0 mL de *nitrate d'argent 0,1 M* et complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R.*

**Baryum (chlorure de) 0,1 M.** *3000600.*

Dissolvez 24,4 g de *chlorure de baryum R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* Prélevez 10,0 mL de la solution de chlorure de baryum, ajoutez 60 mL d'*eau R,* 3 mL d'*ammoniaque concentrée R,* 0,5-1 mg de *pourpre de phtaléine R* et titrez par l'*édétate de sodium 0,1 M.* Lorsque la solution commence à se décolorer, ajoutez 50 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et continuez le titrage jusqu'à disparition de la coloration bleu-violet.

**Baryum (perchlorate de) 0,025 M.** *3009600.*

Prélevez 500,0 mL de *perchlorate de baryum 0,05 M* et complétez à 1000,0 mL avec la *solution tampon pH 3,7 R.*

**Baryum (perchlorate de) 0,05 M.** *3000700.*

Dissolvez 15,8 g d'*hydroxyde de baryum R* dans un mélange de 7,5 mL d'*acide perchlorique R* et de 75 mL d'*eau R.* Ajustez à pH 3 par addition d'*acide perchlorique R* et filtrez si nécessaire. Ajoutez 150 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et complétez à 250 mL avec de l'*eau R* puis à 1000,0 mL avec la *solution tampon pH 3,7 R.*

*Détermination du titre.* A 5,0 mL d'*acide sulfurique 0,05 M,* ajoutez 5 mL d'*eau R,* 50 mL de *solution tampon pH 3,7 R* et 0,5 mL de *solution d'alizarine S R.* Titrez par la solution de perchlorate de baryum jusqu'à coloration rouge orangé. Déterminez le titre de la solution immédiatement avant son utilisation.

**Benzéthonium (chlorure de) 0,004 M.** *3000900.*

Dissolvez, dans de l'*eau R,* 1,792 g de *chlorure de benzéthonium R* desséché au préalable à 100-105 °C jusqu'à masse constante et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* Calculez la molarité de la solution en tenant compte de la teneur en $C_{27}H_{42}ClNO_2$ du chlorure de benzéthonium desséché, déterminée comme suit : dissolvez 0,350 g de la substance desséchée dans 30 mL d'*acide acétique anhydre R* et ajoutez 6 mL de *solution d'acétate mercurique R.* Titrez par l'*acide perchlorique 0,1 M* en présence de 0,05 mL de *solution de violet cristallisé R.* Effectuez un titrage à blanc.

1 mL d'*acide perchlorique 0,1 M* correspond à 44,81 mg de $C_{27}H_{42}ClNO_2$.

**Bismuth (nitrate de) 0,01 M.** *3010000.*

Dissolvez 4,86 g de *nitrate de bismuth pentahydraté R* dans 60 mL d'*acide nitrique dilué R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

*Détermination du titre.* A 25,0 mL de la solution de nitrate de bismuth, ajoutez 50 mL d'*eau R,* puis titrez par l'*édétate de sodium 0,01 M* en présence de 0,05 mL d'une solution de *xylénolorange R* à 1 g/L.

**Bromure-bromate 0,0167 M.** *3001000.*

Dissolvez 2,7835 g de *bromate de potassium RV* et 13 g de *bromure de potassium R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

**Cérium (sulfate de) 0,1 M.** *3001100.*

Dissolvez 40,4 g de *sulfate de cérium R* dans un mélange de 500 mL d'*eau R* et de 50 mL d'*acide sulfurique R.* Laissez refroidir et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

*Détermination du titre.* A 20,0 mL de la solution de sulfate de cérium, ajoutez 1,6 g d'*iodure de potassium R,* 100 mL d'*eau R* et 40 mL d'*acide sulfurique dilué R.* Titrez immédiatement par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* en présence de 0,8 mL de *solution d'amidon R.*

**Chlorhydrique (acide) 1 M.** *3001800.*

Prélevez 103,0 g d'*acide chlorhydrique R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

*Détermination du titre.* Dissolvez 1,000 g de *carbonate de sodium RV* dans 50 mL d'*eau R*. Ajoutez 0,1 mL de *solution de méthylorange R* et titrez par l'acide chlorhydrique jusqu'au début du virage au rouge-jaune. Chauffez alors à ébullition pendant 2 min. La solution devient jaune. Refroidissez et titrez jusqu'à coloration rouge-jaune.

1 mL d'*acide chlorhydrique 1 M* correspond à 53,00 mg de $Na_2CO_3$.

**Chlorhydrique (acide) 0,1 M.** *3002100.*

Prélevez 100,0 mL d'*acide chlorhydrique 1 M* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

*Détermination du titre.* Déterminez le titre d'après les indications correspondantes de la rubrique *Acide chlorhydrique 1 M,* sur 0,100 g de *carbonate de sodium RV,* dissous dans 20 mL d'*eau R*.

1 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* correspond à 5,30 mg de $Na_2CO_3$.

**Chlorhydrique (acide) alcoolique 0,1 M.** *3008800.*

Prélevez 9,0 mL d'*acide chlorhydrique R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*alcool exempt d'aldéhyde R*.

**Cuivre (sulfate de) 0,02 M.** *3001200.*

Dissolvez 5,0 g de *sulfate de cuivre R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* A 20,0 mL de solution de sulfate de cuivre ajoutez 2 g d'*acétate de sodium R* et 0,1 mL de *solution de pyridylazonaphtol R*. Titrez par l'*édétate de sodium 0,02 M* jusqu'à virage du bleu-violet au vert clair en procédant lentement en fin de titrage.

**Ferreux (sulfate) 0,1 M.** *3001400.*

Dissolvez 27,80 g de *sulfate ferreux R* dans 500 mL d'*acide sulfurique dilué R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

*Détermination du titre.* Prélevez 25,0 mL de solution de sulfate ferreux, ajoutez 3 mL d'*acide phosphorique R* et titrez immédiatement par le *permanganate de potassium 0,02 M*. Déterminez le titre immédiatement avant l'utilisation.

**Ferrique et d'ammonium (sulfate) 0,1 M.** *3001300.*

Dissolvez 50,0 g de *sulfate ferrique et d'ammonium R* dans un mélange de 6 mL d'*acide sulfurique R* et de 300 mL d'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

*Détermination du titre.* Prélevez 25,0 mL de solution de sulfate ferrique et d'ammonium, ajoutez 3 mL d'*acide chlorhydrique R* et 2 g d'*iodure de potassium R*. Laissez reposer pendant 10 min. Titrez par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* en présence de 1 mL de *solution d'amidon R*.

1 mL de *thiosulfate de sodium 0,1 M* correspond à 48,22 mg de $FeNH_4(SO_4)_2,12H_2O$.

**Iode 0,5 M.** *3009400.*

Dissolvez 127 g d'*iode R* et 200 g d'*iodure potassique R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* A 2,0 mL de la solution d'iode, ajoutez 1 mL d'*acide acétique dilué R* et 50 mL d'*eau R*. Titrez par le *thiosulfate de sodium 0,1 M,* en présence de *solution d'amidon R*.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Iode 0,05 M.** *3002700.*

Dissolvez 12,7 g d'*iode R* et 20 g d'*iodure de potassium R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* A 20,0 mL de la solution d'iode, ajoutez 1 mL d'*acide acétique dilué R* et 30 mL d'*eau R*. Titrez par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* en présence de *solution d'amidon R*.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Iode 0,01 M.** *3002900.*

A 20,0 mL d'*iode 0,05 M,* ajoutez 0,3 g d'*iodure de potassium R* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*.

**Lanthane (nitrate de) 0,1 M.** *3010100.*

Dissolvez 43,30 g de *nitrate de lanthane R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* A 20 mL de la solution de nitrate de lanthane, ajoutez 15 mL d'*eau R* et 25 mL d'*édétate de sodium 0,1 M*. Ajoutez environ 50 mg de *mélange composé au xylénolorange R* et environ 2 g d'*hexaméthylènetétramine R*. Titrez par le *sulfate de zinc 0,1 M* jusqu'à virage du jaune au rose-violet.

1 mL d'*édétate de sodium 0,1 M* correspond à 43,30 mg de $La(NO_3)_3,6H_2O$.

**Lithium (méthanolate de) 0,1 M.** *3003300.*

Dissolvez 0,694 g de *lithium R* dans 150 mL de *méthanol anhydre R* et complétez à 1000,0 mL avec du *toluène R*.

*Détermination du titre.* Neutralisez 10 mL de *diméthylformamide R* par la solution de méthanolate de lithium en présence de 0,05 mL d'une solution de *bleu de thymol R* à 3 g/L dans le *méthanol R,* jusqu'à coloration bleu franc. Ajoutez immédiatement 0,200 g d'*acide benzoïque RV,* agitez jusqu'à dissolution et titrez par la solution de méthanolate de lithium jusqu'à réapparition de la coloration bleu franc de l'indicateur. Protégez la solution du dioxyde de carbone de l'air tout au long du titrage. A partir du volume de réactif utilisé dans le second titrage, déterminez le titre exact de la solution de méthanolate de lithium. Déterminez le titre immédiatement avant l'utilisation.

1 mL de *méthanolate de lithium 0,1 M* correspond à 12,21 mg de $C_7H_6O_2$.

**Magnésium (chlorure de) 0,1 M.** *3003400.*

Dissolvez 20,33 g de *chlorure de magnésium R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* Effectuez le dosage du magnésium par complexométrie (*2.5.11*).

**Nitrique (acide) 1 M.** *3003600.*

Dissolvez 96,6 g d'*acide nitrique R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* Dissolvez 1,000 g de *carbonate de sodium RV* dans 50 mL d'*eau R*. Ajoutez 0,1 mL de *solution de méthylorange R* et titrez par l'acide nitrique jusqu'à début du virage au jaune-rouge. Chauffez à ébullition pendant 2 min. La solution devient jaune. Refroidissez et titrez jusqu'à coloration jaune-rouge.

1 mL d'*acide nitrique 1 M* correspond à 53,00 mg de $Na_2CO_3$.

**Perchlorique (acide) 0,1 M.** *3003900.*

Dans un matras jaugé contenant environ 900 mL d'*acide acétique glacial R*, introduisez 8,5 mL d'*acide perchlorique R* et mélangez. Ajoutez 30 mL d'*anhydride acétique R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*acide acétique glacial R*. Mélangez et laissez reposer pendant 24 h. Déterminez la teneur en eau (*2.5.12*) sans addition de méthanol et, si nécessaire, ajustez la teneur en eau à 0,1-0,2 pour cent, en ajoutant de l'*anhydride acétique R* ou de l'*eau R*. Laissez reposer de nouveau pendant 24 h.

*Détermination du titre.* Dissolvez 0,350 g de *phtalate acide de potassium RV* dans 50 mL d'*acide acétique anhydre R,* en chauffant légèrement si nécessaire. Laissez refroidir à l'abri de l'air et titrez par la solution d'acide perchlorique en présence de 0,05 mL de *solution de violet cristallisé R*. Notez la température de la solution d'acide perchlorique pendant la détermination du titre. Si la température à laquelle est effectué le dosage diffère de celle à laquelle a été étalonné l'*acide perchlorique 0,1 M,* le volume d'acide utilisé dans le dosage devient :

$$V_c = V\,[1 + (t_1 - t_2)\,0,0011]$$

$t_1$ = température lors de l'étalonnage,

$t_2$ = température du dosage,

$V_c$ = volume corrigé,

$V$ = volume déterminé au cours du titrage.

1 mL d'*acide perchlorique 0,1 M* correspond à 20,42 mg de $C_8H_5KO_4$.

**Perchlorique (acide) 0,05 M.** *3004000.*

Prélevez 50,0 mL d'*acide perchlorique 0,1 M* et complétez à 100,0 mL avec de l'*acide acétique anhydre R.*

**Perchlorique (acide) 0,02 M.** *3009900.*

Prélevez 20,0 mL *d'acide perchlorique 0,1 M* et complétez à 100,0 mL avec de l'*acide acétique anhydre R.*

**Plomb (nitrate de) 0,1 M.** *3003100.*

Dissolvez 33 g de *nitrate de plomb R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* Prélevez 20,0 mL de la solution de nitrate de plomb. Effectuez le dosage du plomb par complexométrie (*2.5.11*).

**Plomb (nitrate de) 0,05 M.** *3009700.*

Prélevez 50,0 mL de *nitrate de plomb 0,1 M* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R.*

**Potassium (bromate de) 0,033 M.** *3004200.*

Dissolvez 5,5670 g de *bromate de potassium RV* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

**Potassium (bromate de) 0,02 M.** *3004300.*

Dissolvez 3,340 g de *bromate de potassium RV* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

**Potassium (bromate de) 0,0167 M.** *3004400.*

Préparez par dilution du *bromate de potassium 0,033 M.*

**Potassium (bromate de) 0,0083 M.** *3004500.*

Préparez par dilution du *bromate de potassium 0,033 M.*

**Potassium (dichromate de) 0,0167 M.** *3004600.*

Dissolvez 4,90 g de *dichromate de potassium R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* A 20,0 mL de solution de dichromate de potassium, ajoutez 1 g d'*iodure de potassium R* et 7 mL d'*acide chlorhydrique dilué R.* Ajoutez 250 mL d'*eau R* et titrez par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* en présence de 3 mL de *solution d'amidon R* jusqu'à virage du bleu au vert clair.

**Potassium (hydroxyde de) 1 M.** *3009100.*

Dissolvez 60 g d'*hydroxyde de potassium R* dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* Prélevez 20,0 mL de la solution d'hydroxyde de potassium et titrez par l'*acide chlorhydrique 1 M* en présence de 0,5 mL de *solution de phénolphtaléine R.*

**Potassium (hydroxyde de) 0,1 M.** *3004800.*

Dissolvez 6 g d'*hydroxyde de potassium R* dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* Prélevez 20,0 mL de la solution d'hydroxyde de potassium et titrez par l'*acide chlorhydrique 0,1 M* en présence de 0,5 mL de *solution de phénolphtaléine R.*

**Potassium (hydroxyde de) 0,5 M dans l'alcool à 60 pour cent *V/V*.** *3004900.*

Dissolvez 3 g d'*hydroxyde de potassium R* dans de l'*alcool exempt d'aldéhyde R* à 60 pour cent *V/V* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* Titrez 20,0 mL de la solution d'hydroxyde de potassium dans l'alcool à 60 pour cent *V/V* par l'*acide chlorhydrique 0,5 M* en présence de 0,5 mL de *solution de phénolphtaléine R.*

**Potassium (hydroxyde de) alcoolique 0,5 M.** *3005000.*

Dissolvez 3 g d'*hydroxyde de potassium R* dans 5 mL d'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec de l'*alcool exempt d'aldéhyde R.*

*Détermination du titre.* Titrez 20,0 mL de la solution alcoolique d'hydroxyde de potassium par l'*acide chlorhydrique 0,5 M* en présence de 0,5 mL de *solution de phénolphtaléine R.*

**Potassium (hydroxyde de) alcoolique 0,1 M.** *3005100.*

Prélevez 20,0 mL d'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M* et complétez à 100,0 mL avec de l'*alcool exempt d'aldéhyde R.*

**Potassium (hydroxyde de) alcoolique 0,01 M.** *3009000.*

Prélevez 2,0 mL d'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M* et complétez à 100,0 mL avec de l'*alcool exempt d'aldéhyde R.*

**Potassium (iodate de) 0,05 M.** *3005200.*

Dissolvez 10,70 g d'*iodate de potassium R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* Prélevez 25,0 mL de la solution d'iodate de potassium et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R.* A 20,0 mL de cette solution, ajoutez 2 g d'*iodure de potassium R* et 10 mL d'*acide sulfurique dilué R.* Titrez par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* en présence de 1 mL de *solution d'amidon R* ajouté en fin de titrage.

**Potassium (iodure de) 0,001 M.** *3009200.*

Prélevez 10,0 mL de *solution d'iodure de potassium R* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R.* Prélevez 5,0 mL de cette solution et complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R.*

**Potassium (permanganate de) 0,02 M.** *3005300.*

Dissolvez 3,2 g de *permanganate de potassium R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant. Chauffez la solution au bain-marie pendant 1 h, laissez refroidir et filtrez sur un filtre de verre fritté (*2.1.2*).

*Détermination du titre.* Prélevez 20,0 mL de la solution de permanganate de potassium, ajoutez 2 g d'*iodure de potassium R* et 10 mL d'*acide sulfurique dilué R.* Titrez par le *thiosulfate de sodium 0,1 M* en présence de 1 mL de *solution d'amidon R* ajouté en fin de titrage. Déterminez le titre immédiatement avant l'emploi.

*Conservation* : à l'abri de la lumière.

**Potassium (phtalate acide de) 0,1 M.** *3004700.*

Dans une fiole conique contenant environ 800 mL d'*acide acétique anhydre R*, dissolvez 20,42 g de *phtalate acide de potassium RV.* Chauffez au bain-marie, à l'abri de l'humidité, jusqu'à dissolution complète. Refroidissez à 20 °C et complétez à 1000,0 mL avec de l'*acide acétique anhydre R.*

**Sodium (arsénite de) 0,1 M.** *3005800.*

Dissolvez une quantité d'*anhydride arsénieux RV* correspondant à 4,946 g de $As_2O_3$ dans un mélange de 20 mL de *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R* et de 20 mL d'*eau R.* Complétez à 400 mL avec de l'*eau R* et ajoutez de l'*acide chlorhydrique dilué R* jusqu'à ce que la solution soit neutre au *papier tournesol R.* Dissolvez 2 g de *bicarbonate de sodium R* dans la solution et complétez à 500,0 mL avec de l'*eau R.*

**Sodium (édétate de) 0,1 M.** *3005900.*

Dissolvez 37,5 g d'*édétate de sodium R* dans 500 mL d'*eau R,* ajoutez 100 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

*Détermination du titre.* Dissolvez 0,120 g de *zinc RV* dans 4 mL d'*acide chlorhydrique R1* et ajoutez 0,1 mL d'*eau de brome R.* Eliminez l'excès de brome par ébullition. Ajoutez de la *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* jusqu'à réaction faiblement acide ou neutre et effectuez le dosage du zinc par complexométrie (*2.5.11*).

1 mL d'*édétate de sodium 0,1 M* correspond à 6,54 mg de Zn.

*Conservation* : en récipient en polyéthylène.

**Sodium (édétate de) 0,02 M.** *3006000.*

Dissolvez 7,444 g d'*édétate de sodium R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* Dissolvez 0,100 g de *zinc RV* dans 4 mL d'*acide chlorhydrique R1* et ajoutez 0,1 mL d'*eau de brome R.* Eliminez l'excès de brome par ébullition. Transvasez la solution dans un ballon jaugé et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R.* Introduisez 25,0 mL de cette solution dans une fiole conique de 500 mL et complétez à 200 mL avec de l'*eau R.* Ajoutez environ 50 mg de *mélange composé au xylénolorange R* et de l'*hexaméthylènetétramine R* jusqu'à coloration rose-violet. Ajoutez 2 g d'*hexaméthylènetétramine R* en excès. Titrez par la solution d'édétate de sodium jusqu'à virage du rose-violet au jaune.

1 mL d'*édétate de sodium 0,02 M* correspond à 1,308 mg de Zn.

**Sodium (hydroxyde de) 1 M.** *3006300.*

Dissolvez 42 g d'*hydroxyde de sodium R* dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* Titrez 20,0 mL de la solution d'hydroxyde de sodium par l'*acide chlorhydrique 1 M* en présence de l'indicateur prévu pour le dosage dans lequel l'*hydroxyde de sodium 1 M* est utilisé.

S'il est prescrit d'employer des solutions exemptes de carbonate, préparez-les comme suit : dissolvez de l'*hydroxyde de sodium R* à une concentration de 400-600 g/L dans de l'*eau R* et laissez reposer. Prélevez le liquide limpide surnageant en évitant l'introduction de dioxyde de carbone. Diluez avec de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R* jusqu'à la molarité voulue. La solution satisfait à l'essai suivant : titrez 20,0 mL d'acide chlorhydrique de même molarité par la solution d'hydroxyde de sodium, en présence de 0,5 mL de *solution de phénolphtaléine R.* Ajoutez au moment du virage la quantité d'acide nécessaire pour faire disparaître la coloration rose, puis ramenez la solution à 20 mL par ébullition. Ajoutez pendant l'ébullition la quantité d'acide nécessaire pour faire disparaître la coloration rose qui ne réapparaît pas pendant une ébullition prolongée. Le volume d'acide utilisé n'est pas supérieur à 0,1 mL.

**Sodium (hydroxyde de) 0,1 M.** *3006600.*

Prélevez 100,0 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R.*

*Détermination du titre.* Titrez 20,0 mL de la solution d'hydroxyde de sodium par l'*acide chlorhdrique 0,1 M.* Déterminez le point de fin de titrage par la méthode prescrite dans le dosage où l'*hydroxyde de sodium 0,1 M* est utilisé.

*Détermination du titre pour le dosage des sels halogénés de bases organiques.* Dissolvez 0,100 g d'*acide benzoïque RV* dans un mélange de 5 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M* et 50 mL d'*éthanol à 96 pour cent R.* Titrez par la solution d'hydroxyde de sodium et tracez la courbe potentiométrique (*2.2.20*). Mesurez le volume de la solution d'hydroxyde de sodium utilisé entre les 2 points d'inflexion.

1 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* correspond à 12,21 mg de $C_7H_6O_2$.

**Solution éthanolique d'hydroxyde de sodium 0,1 M.** *3007000.*

A 250 mL d'*éthanol anhydre R,* ajoutez 3,3 g de *solution concentrée d'hydroxyde de sodium R.*

*Détermination du titre.* Dissolvez 0,100 g d'*acide benzoïque RV* dans un mélange de 2 mL d'*eau R* et de 10 mL d'*éthanol à 96 pour cent R.* Titrez par la solution éthanolique d'hydroxyde de sodium en présence de 0,2 mL de *solution de thymolphtaléine R.* Déterminez le titre immédiatement avant son utilisation.

1 mL de *solution éthanolique d'hydroxyde de sodium 0,1 M* correspond à 12,21 mg de $C_7H_6O_2$.

**Sodium (méthanolate de) 0,1 M.** *3007100.*

Refroidissez dans l'*eau R* glacée 175 mL de *méthanol anhydre R* et ajoutez, par petites quantités, environ 2,5 g de *sodium R* récemment coupé. Lorsque le métal est dissous, complétez à 1000,0 mL avec du *toluène R.*

*Détermination du titre.* Neutralisez 10 mL de *diméthylformamide R* par la solution de méthanolate de sodium, en présence de 0,05 mL d'une solution de *bleu de thymol R* à 3 g/L dans le *méthanol R,* jusqu'à coloration bleu franc. Ajoutez immédiatement 0,200 g d'*acide benzoïque RV,* agitez jusqu'à dissolution et titrez par la solution de méthanolate de sodium jusqu'à réapparition de la coloration bleu franc de l'indicateur. Protégez la solution du dioxyde de carbone de l'air au cours du titrage. A partir du volume de réactif utilisé dans le second titrage, déterminez le titre exact de la solution de méthanolate de sodium. Déterminez le titre de la solution immédiatement avant son utilisation.

1 mL de *méthanolate de sodium 0,1 M* correspond à 12,21 mg de $C_7H_6O_2$.

**Sodium (nitrite de) 0,1 M.** *3007200.*

Dissolvez 7,5 g de *nitrite de sodium R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* Dissolvez 0,300 g d'*acide sulfanilique RV* dans 50 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et effectuez le dosage de l'azote aminé primaire aromatique (*2.5.8*) par électrométrie avec la solution de nitrite de sodium. Déterminez le titre immédiatement avant son utilisation.

1 mL de *nitrite de sodium 0,1 M* correspond à 17,32 mg de $C_6H_7NO_3S$.

**Sodium (periodate de) 0,1 M.** *3009500.*

Dissolvez 21,4 g de *periodate de sodium R* dans 500 mL environ d'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* Dans une fiole bouchée, introduisez 20,0 mL de la solution de periodate de sodium et ajoutez 5 mL d'*acide perchlorique R.* Bouchez la fiole et agitez. Ajustez à pH 6,4 avec une solution saturée de *bicarbonate de sodium R.* Ajoutez 10 mL de *solution d'iodure de potassium R,* bouchez, agitez et laissez reposer pendant 2 min. Titrez par l'*arsénite de sodium 0,025 M* jusqu'à ce que la coloration jaune ait pratiquement disparu. Ajoutez 2 mL de *solution d'amidon R* et continuez lentement le titrage jusqu'à disparition complète de la coloration.

**Sodium (thiosulfate de) 0,1 M.** *3007300.*

Dissolvez 25 g de *thiosulfate de sodium R* et 0,2 g de *carbonate de sodium R* dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* Prélevez 10,0 mL de *bromate de potassium 0,033 M,* ajoutez 40 mL d'*eau R,* 10 mL de *solution d'iodure de potassium R* et 5 mL d'*acide chlorhydrique R1.* Titrez par la solution de thiosulfate de sodium en présence de 1 mL de *solution d'amidon R* ajouté en fin de titrage.

**Sulfurique (acide) 0,5 M.** *3007800.*

Dissolvez 28 mL d'*acide sulfurique R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* Dissolvez 1,000 g de *carbonate de sodium RV* dans 50 mL d'*eau R.* Ajoutez 0,1 mL de *solution de méthylorange R* et titrez par l'acide sulfurique jusqu'au début du virage au jaune-rouge. Chauffez à ébullition pendant environ 2 min. La solution redevient jaune. Refroidissez et titrez jusqu'à virage au jaune-rouge.

1 mL d'*acide sulfurique 0,5 M* correspond à 53,00 mg de $Na_2CO_3$.

**Sulfurique (acide) 0,05 M.** *3008000.*

Prélevez 100,0 mL d'*acide sulfurique 0,5 M* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

*Détermination du titre.* Déterminez le titre de la solution d'acide sulfurique selon les indications correspondantes de la rubrique *Acide sulfurique 0,5 M,* sur une prise d'essai de *carbonate de sodium RV* de 0,100 g, dissoute dans 20 mL d'*eau R.*

1 mL d'*acide sulfurique 0,05 M* correspond à 5,30 mg de $Na_2CO_3$.

**Tétrabutylammonium (hydroxyde de) 0,1 M.** *3008300.*

Dissolvez 40 g d'*iodure de tétrabutylammonium R* dans 90 mL de *méthanol anhydre R*, ajoutez 20 g d'*oxyde d'argent R* finement pulvérisé et agitez vigoureusement pendant 1 h. Centrifugez quelques millilitres du mélange et vérifiez la présence éventuelle d'iodures dans le surnageant. Dans le cas d'une réaction positive, ajoutez encore 2 g d'*oxyde d'argent R* et continuez à agiter pendant 30 min. Répétez le procédé jusqu'à ce que le liquide soit exempt d'iodures, filtrez le mélange sur un filtre de verre fritté (*2.1.2*), lavez le ballon et le filtre avec 3 fois 50 mL de *toluène R*. Réunissez le filtrat et les liquides de lavage, puis complétez à 1000,0 mL avec du *toluène R*. Faites passer de l'azote desséché exempt de dioxyde de carbone dans la solution pendant 5 min.

*Détermination du titre.* Neutralisez 10 mL de *diméthylformamide R* par la solution d'hydroxyde de tétrabutylammonium, en présence de 0,05 mL d'une solution de *bleu de thymol R* à 3 g/L dans le *méthanol R*, jusqu'à coloration bleu franc. Ajoutez immédiatement 0,200 g d'*acide benzoïque RV*, agitez jusqu'à dissolution et titrez par la solution d'hydroxyde de tétrabutylammonium jusqu'à réapparition de la coloration bleu franc de l'indicateur. Protégez la solution du dioxyde de carbone de l'air tout au long du titrage. A partir du volume de réactif utilisé dans le second titrage, déterminez le titre exact de la solution d'hydroxyde de tétrabutylammonium. Déterminez le titre immédiatement avant l'utilisation.

1 mL d'*hydroxyde de tétrabutylammonium 0,1 M* correspond à 12,21 mg de $C_7H_6O_2$.

**Tétrabutylammonium (hydroxyde de) propanolique 0,1 M.** *3008400.*

Préparez la solution d'après les indications données pour l'*hydroxyde de tétrabutylammonium 0,1 M* en remplaçant le *toluène R* par le *2-propanol R* et déterminez le titre comme indiqué dans cette rubrique.

**Zinc (chlorure de) 0,05 M.** *3008500.*

Dissolvez 6,82 g de *chlorure de zinc R* (pesés avec précaution) dans de l'*eau R*. Si nécessaire ajoutez, goutte à goutte, de l'*acide chlorhydrique dilué R* jusqu'à disparition de l'opalescence. Complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

*Détermination du titre.* Prélevez 20,0 mL de la solution de chlorure de zinc, ajoutez 5 mL d'*acide acétique dilué R* et effectuez le dosage du zinc par complexométrie (*2.5.11*).

**Zinc (sulfate de) 0,1 M.** *3008600.*

Dissolvez 29 g de *sulfate de zinc R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

*Détermination du titre.* Prélevez 20,0 mL de la solution de sulfate de zinc, ajoutez 5 mL d'*acide acétique dilué R* et effectuez le dosage du zinc par complexométrie (*2.5.11*).

# 5. TEXTES GÉNÉRAUX

# 5.1. TEXTES GÉNÉRAUX SUR LA MICROBIOLOGIE

# 5.1. TEXTES GÉNÉRAUX SUR LA MICROBIOLOGIE

**01/2008:50101**

## 5.1.1. MÉTHODES DE PRÉPARATION DES PRODUITS STÉRILES

La stérilité est l'absence de microorganismes viables. La réalisation d'essais ne suffit pas à garantir la stérilité d'un produit, et l'assurance de la stérilité passe également par l'application de procédés de production convenablement validés. Il est essentiel d'étudier l'effet de la méthode de stérilisation choisie sur le produit (récipient ou emballage final compris) sous l'aspect de son efficacité et du maintien de l'intégrité du produit, et de valider cette méthode avant de la mettre en pratique. Il est recommandé de choisir un récipient qui soit compatible avec l'emploi de la méthode de stérilisation optimale. La mise en oeuvre scrupuleuse d'un procédé validé est une condition à respecter sous peine d'obtenir un produit non stérile ou détérioré. Une nouvelle validation est effectuée chaque fois que des changements majeurs sont apportés à la procédure de stérilisation, y compris en ce qui concerne la charge. Il va de soi que les principes de bonnes pratiques de fabrication (décrits par exemple dans le Guide CEE relatif aux BPF) auront été observés lors la mise au point du procédé, notamment quant aux aspects suivants :

– emploi d'un personnel qualifié et convenablement formé,
– utilisation de locaux adéquats,
– utilisation d'un équipement de production approprié, conçu pour pouvoir être facilement nettoyé et stérilisé,
– respect des précautions requises pour réduire la charge microbienne (biocharge) avant la stérilisation,
– mise en oeuvre de méthodes validées, à toutes les étapes critiques de la production,
– surveillance de l'environnement et contrôles en cours de production.

Les précautions à prendre pour limiter la charge microbienne avant la stérilisation comprennent l'utilisation de composés présentant un niveau suffisamment faible de contamination microbienne. Une surveillance microbiologique et l'établissement de limites appropriées peuvent être souhaitables pour les composants comportant des risques de contamination en raison de leur origine, de leur nature ou de leur mode de préparation.

*Les méthodes décrites ici s'appliquent principalement à l'inactivation ou l'élimination des bactéries, levures et moisissures. Toutefois, pour les produits biologiques d'origine animale ou humaine, ou lorsque du matériel d'origine animale ou humaine est utilisé pour la production, il est nécessaire de démontrer dans le cadre de la validation que le procédé utilisé permet d'éliminer ou d'inactiver les contaminants viraux potentiels. Des indications sont fournies à cet égard, par exemple, dans les Notes Explicatives CEE.*

Il convient, chaque fois que possible, de choisir un procédé permettant la stérilisation du produit dans son récipient final (stérilisation terminale). Lorsqu'un procédé de stérilisation terminale (par la vapeur, la chaleur sèche ou l'irradiation) totalement validé est utilisé, il peut être admis, sous réserve de l'approbation de l'Autorité compétente, de recourir à la libération paramétrique, c'est à dire de se fonder pour la libération d'un lot d'unités stérilisées sur les données de production plutôt que sur les résultats d'un essai de stérilité effectué sur un échantillon prélevé dans ce lot.

Si la stérilisation terminale n'est pas possible, il convient de recourir à la filtration sur filtre antibactérien ou au traitement aseptique ; chaque fois que possible, un traitement complémentaire approprié (par exemple chauffage) est appliqué au produit dans son récipient final. Dans tous les cas, le récipient et le système de fermeture doivent maintenir la stérilité du produit pendant toute sa durée de conservation.

**Niveau d'assurance de stérilité (NAS)**

Dans les cas appropriés, il est fait référence dans les méthodes décrites ci-après au concept de « niveau d'assurance de la stérilité », ou « NAS ». On ne peut en effet ni garantir dans l'absolu, ni vérifier, la stérilité de tous les articles contenus dans une population ayant fait l'objet d'un traitement de stérilisation. L'inactivation des microorganismes par des procédés physiques ou chimiques suit une loi exponentielle, et il existe par conséquent toujours une certaine probabilité statistique qu'un microorganisme puisse survivre à la stérilisation. Pour un procédé donné, cette probabilité de survie est fonction du nombre, du type et de la résistance des microorganismes présents, ainsi que de l'environnement dans lequel ils se trouvent au cours du traitement. Le NAS d'un procédé de stérilisation indique le degré d'assurance avec lequel une population d'articles est rendue stérile par le procédé considéré. Le NAS pour un procédé donné est exprimé comme la probabilité d'occurrence d'un article non stérile dans cette population. Un NAS de $10^{-6}$, par exemple, correspond à une probabilité d'au plus 1 microorganisme viable pour $1 \times 10^6$ unités stérilisées du produit final. Le NAS associé à un procédé, pour un produit donné, est établi sur la base d'études de validation appropriées.

MÉTHODES ET CONDITIONS DE STÉRILISATION

La stérilisation peut être effectuée par l'une des méthodes décrites ci-après. Il est admis d'utiliser des variantes ou combinaisons de ces méthodes à condition que la procédure choisie soit validée à la fois sous l'aspect de son efficacité et du maintien de l'intégrité du produit, récipient ou emballage compris.

Quelle que soit la méthode de stérilisation employée, les paramètres critiques font l'objet d'une surveillance visant à confirmer que l'ensemble du lot est soumis, pendant toute la durée du traitement, aux conditions de stérilisation préalablement définies. Cette exigence est valable dans tous les cas, y compris lorsque sont appliquées des conditions de référence.

*STÉRILISATION TERMINALE*

Pour la stérilisation terminale, il est essentiel de prendre en compte la non-uniformité des conditions physiques et, le cas échéant, chimiques, réalisées dans l'enceinte de stérilisation. L'emplacement le moins accessible à l'agent de stérilisation (par ex. le point le plus froid d'un autoclave) est déterminé pour chaque configuration de chargement et chaque type et taille de récipients ou d'emballages. Il convient également de déterminer la dose minimale létale résultant du cycle de stérilisation et la reproductibilité du cycle de stérilisation, pour s'assurer que toutes les charges soumises à stérilisation recevront le traitement requis.

Après mise au point d'un procédé de stérilisation terminale, il est pris connaissance de ses performances en routine, chaque fois que possible, par surveillance et enregistrement approprié des conditions physiques, et le cas échéant chimiques, atteintes par la charge, dans l'enceinte, pendant toute la durée de chaque cycle de stérilisation.

**Stérilisation par la vapeur (passage en autoclave).** Lorsqu'elle est applicable, la stérilisation par la vapeur saturée sous pression est la méthode recommandée, notamment pour les solutions aqueuses. Pour cette méthode de stérilisation terminale, les conditions de référence applicables aux préparations aqueuses sont de 121 °C minimum pendant 15 min. D'autres combinaisons de température et de durée peuvent être utilisées à condition qu'il ait été démontré que le procédé choisi assure un taux de létalité adéquat et reproductible lorsqu'il est appliqué en routine dans les limites des tolérances établies. Les méthodes et précautions employées sont telles qu'elles

5. Textes généraux

permettent d'obtenir un NAS d'au moins $10^{-6}$. Des informations relatives à la validation au moyen du concept $F_0$ sont données plus loin (*5.1.5*).

Les paramètres physiques (température et pression) régnant à l'intérieur de l'autoclave au cours du processus de stérilisation sont relevés. La température est généralement mesurée au moyen de sondes installées à l'intérieur de plusieurs récipients représentatifs ainsi qu'aux emplacements préalablement identifiés comme les plus froids dans l'enceinte chargée. Les paramètres physiques sont enregistrés pendant toute la durée de chaque cycle, par exemple sous la forme d'un diagramme température-temps ou sous toute autre forme appropriée.

Lorsqu'il est procédé à une évaluation biologique, il convient d'utiliser un indicateur biologique approprié (*5.1.2*).

**Stérilisation par la chaleur sèche**. Pour cette méthode de stérilisation terminale, les conditions de référence sont de 160 °C minimum pendant 2 h au moins. D'autres combinaisons de température et de durée peuvent être utilisées à condition qu'il ait été démontré que le procédé choisi assure un taux de létalité adéquat et reproductible lorsqu'il est utilisé en routine dans les limites de tolérance établies. Les méthodes et précautions employées doivent permettre d'obtenir un NAS d'au moins $10^{-6}$.

La stérilisation par la chaleur sèche est réalisée dans un four muni d'une ventilation forcée ou d'un autre dispositif spécialement conçu. Le chargement du stérilisateur est effectué de telle sorte que la température soit uniforme dans l'ensemble de la charge. Des données relatives à la température interne du stérilisateur au cours du processus de stérilisation sont recueillies, généralement au moyen de sondes installées à l'intérieur de plusieurs récipients représentatifs ainsi qu'aux emplacements préalablement identifiés comme les plus froids dans le stérilisateur chargé. La température est enregistrée pendant toute la durée de chaque cycle, sous une forme appropriée.

Lorsqu'il est procédé à une évaluation biologique, il convient d'utiliser un indicateur biologique approprié (*5.1.2*).

La chaleur sèche à plus de 220 °C est souvent utilisée pour la stérilisation et la dépyrogénisation de la verrerie. Dans ce cas, au lieu d'employer des indicateurs biologiques (*5.1.2*), il est possible de démontrer l'existence d'une réduction de 3 log des endotoxines résistant à la chaleur.

**Stérilisation par irradiation ionisante**. Ce mode de stérilisation est effectué par exposition du produit à un rayonnement ionisant, qui peut être un rayonnement gamma provenant d'un radio-isotope approprié (le cobalt 60 par exemple) ou un faisceau électronique énergisé au moyen d'un accélérateur d'électrons appropriés.

*Il existe dans certains pays des réglementations régissant l'utilisation des rayonnements ionisants aux fins de stérilisation (voir par exemple les Notes explicatives CEE).*

Pour cette méthode de stérilisation terminale, la dose de référence (dose absorbée) est de 25 kGy. D'autres valeurs peuvent être utilisées à condition qu'il ait été démontré que la dose choisie assure un taux de létalité adéquat et reproductible lorsqu'elle est appliquée en routine dans les limites de tolérance établies. Les méthodes et précautions employées doivent permettre d'obtenir un NAS d'au moins $10^{-6}$.

Pendant le processus de stérilisation, le rayonnement absorbé par le produit fait l'objet de contrôles réguliers, effectués par des procédés dosimétriques reconnus permettant de mesurer la dose réellement reçue par le produit, indépendamment du taux d'irradiation. Les dosimètres sont étalonnés par rapport à une source étalon, dans une installation d'irradiation de référence, lors de la réception, puis à intervalles de temps appropriés qui ne doivent pas dépasser un an.

Lorsqu'il est procédé à une évaluation biologique, il convient d'utiliser un indicateur biologique approprié (*5.1.2*).

**Stérilisation par les gaz**. Cette méthode de stérilisation n'est à utiliser que lorsqu'aucun autre procédé n'est applicable. Il est essentiel d'assurer la pénétration du gaz et de l'humidité dans le produit à stériliser, et d'utiliser ensuite un procédé d'élimination du gaz dans des conditions dont il a été préalablement établi qu'elles permettent de ramener, dans le produit stérilisé, les résidus ou produits de transformation du gaz à une concentration inférieure à celle qui peut provoquer des effets toxiques lors de l'utilisation du produit. A cet égard, des indications concernant l'emploi de l'oxyde d'éthylène sont fournies, par exemple, dans les Notes explicatives CEE.

Il convient, chaque fois que possible, de mesurer et d'enregistrer la concentration en gaz, l'humidité relative, la température et la durée du processus de stérilisation. Les mesures sont effectuées aux emplacements les plus défavorables du point de vue de la réalisation des conditions de stérilisation, ces emplacements ayant été déterminés lors de la validation.

L'efficacité du procédé est vérifiée, pour chaque charge stérilisée, à l'aide d'indicateurs biologiques appropriés (*5.1.2*).

Un échantillon approprié de chaque lot est soumis à l'essai de stérilité (*2.6.1*) avant libération du lot.

*FILTRATION*

Certaines substances actives ou produits qui ne peuvent pas faire l'objet d'une stérilisation terminale peuvent être traités par filtration, avec un type de filtre reconnu satisfaisant à l'issue d'une épreuve microbienne réalisée avec un microorganisme d'essai approprié. Une suspension de *Pseudomonas diminuta* (ATCC 19146, NCIMB 11091 ou CIP 103020) peut convenir. Il est recommandé d'appliquer une charge d'épreuve d'au moins $10^7$ UFC par centimètre carré de surface active de filtration et de préparer la suspension dans du bouillon tryptone-soja qui, après passage à travers le filtre, est recueillie dans des conditions aseptiques et mise en incubation dans des conditions aérobies à 32 °C. Ces produits nécessitent des précautions spéciales. Le procédé et l'environnement de production sont choisis de façon à limiter les risques de contamination microbienne, et ils font régulièrement l'objet de contrôles appropriés. L'équipement, les récipients et fermetures et, si possible, les composants du produit sont soumis à un procédé de stérilisation approprié. Il est recommandé d'effectuer la filtration aussi près que possible du point de remplissage. Les opérations qui suivent la filtration stérilisante sont réalisées dans des conditions aseptiques.

Les solutions sont filtrées sur une membrane antibactérienne, de porosité nominale inférieure ou égale à 0,22 μm, ou sur un autre type de filtre possédant des propriétés de rétention bactérienne équivalentes. Des précautions doivent être prises pour éviter à la fois les pertes de soluté par adsorption sur le filtre et le relargage de contaminants par le filtre. Il convient de tenir compte de la contamination microbienne avant filtration, de la capacité du filtre, de la taille des lots et de la durée de filtration. Un même filtre ne doit pas être utilisé pendant une durée supérieure à celle qui a été définie comme adéquate lors de la validation du couple filtre-produit considéré.

L'intégrité des filtres stérilisants assemblés est vérifiée avant et après usage, au moyen d'essais adaptés au type de filtre et à l'étape où est effectuée la vérification (par exemple point de bulle, résistance à la pression, ou taux de diffusion).

Du fait des risques supplémentaires que comporte la filtration, par rapport aux autres méthodes de stérilisation, il peut être souhaitable de procéder à une pré-filtration sur filtre antibactérien dans les cas où il est impossible de limiter la contamination microbienne par d'autres moyens.

*PRÉPARATION ASEPTIQUE*

L'objectif de la préparation aseptique est de maintenir la stérilité d'un produit obtenu à partir de composants préalablement stérilisés par l'une des méthodes citées plus haut. Le moyen d'atteindre cet objectif est d'opérer dans des conditions et au sein d'installations conçues pour empêcher la contamination microbienne. La préparation aseptique peut comprendre le

remplissage et la fermeture aseptique des récipients, le mélange aseptique des composants de la formulation suivi du remplissage et du conditionnement aseptiques.

Pour maintenir la stérilité des composants et du produit au cours de la préparation, il convient de porter une attention vigilante aux aspects suivants :

– environnement,
– personnel,
– surfaces critiques,
– stérilisation des récipients/fermetures et opérations de transfert,
– durée maximale de stockage du produit avant mise en récipient final.

La validation du procédé de préparation comprend des contrôles adéquats portant sur l'ensemble de ces paramètres, et le procédé lui-même fait l'objet de vérifications régulières par simulation avec des milieux de croissance microbienne, qui sont ensuite mis en incubation et examinés en vue de la détection d'une éventuelle contamination microbienne. Par ailleurs, dans le cas des produits stérilisés par filtration ou préparés dans des conditions aseptiques, un échantillon approprié de chaque lot est soumis à l'essai de stérilité (*2.6.1*) avant libération du lot.

**01/2011:50102**

# 5.1.2. INDICATEURS BIOLOGIQUES DE STÉRILISATION

Les indicateurs biologiques sont des préparations normalisées de microorganismes sélectionnés, utilisées pour évaluer l'efficacité d'un procédé de stérilisation. Ils sont généralement constitués par une population de spores bactériennes déposées sur un support inerte approprié. Le support ensemencé est emballé de telle sorte que l'ensemble soit protégé de toute altération ou contamination, tout en permettant à l'agent stérilisant d'entrer en contact avec les microorganismes. Les suspensions bactériennes peuvent être présentées en ampoules scellées. Les indicateurs biologiques sont préparés de façon à pouvoir être conservés dans des conditions définies. Une date de péremption est déterminée.

Des microorganismes de la même espèce bactérienne que les bactéries utilisées pour fabriquer les indicateurs biologiques peuvent être inoculés directement dans un produit liquide à stériliser, ou dans un produit liquide similaire au produit à stériliser. Dans ce cas, la preuve doit être faite que le produit liquide n'a pas d'effet inhibiteur sur les spores utilisées, en particulier quant à leur germination.

Les indicateurs biologiques sont caractérisés par le nom de l'espèce bactérienne du microorganisme témoin, le numéro de la souche dans la collection d'origine, le nombre de spores viables par support et la valeur *D*. La valeur *D* est la valeur d'un paramètre de stérilisation (durée ou dose absorbée) nécessaire pour réduire jusqu'à 10 pour cent de sa valeur initiale le nombre de microorganismes viables. Elle n'a de signification que dans des conditions expérimentales bien définies. Seuls les microorganismes indiqués sont présents. Des indicateurs biologiques comportant plusieurs espèces bactériennes sur le même support peuvent être utilisés. Des renseignements concernant le milieu de culture et les conditions d'incubation sont fournis.

Il est recommandé de déposer les indicateurs biologiques aux emplacements considérés comme les moins accessibles à l'agent de stérilisation, si possible identifiés comme tels par des mesures physiques préalables. Après exposition à l'agent stérilisant, une technique aseptique est appliquée pour le transfert des supports chargés de spores dans les milieux de culture, pour éviter tout risque de contamination à la révélation. Des indicateurs biologiques, comportant une ampoule de milieu de culture directement placée dans l'emballage protégeant le support ensemencé, peuvent être utilisés.

Le choix des microorganismes témoins est effectué sur la base des critères suivants :

a) la résistance de la souche témoin est appropriée au regard de la méthode de stérilisation considérée et est importante comparée à celle des microorganismes potentiellement présents dans le produit,

b) la souche témoin doit être non pathogène,

c) la souche témoin doit se développer facilement.

Après incubation, l'existence d'une croissance des microorganismes témoins qui ont été soumis à un procédé de stérilisation indique l'insuffisance du procédé.

**Stérilisation par la vapeur**. L'utilisation d'indicateurs biologiques destinés à la stérilisation par la vapeur est recommandée pour la validation des cycles de stérilisation. L'utilisation de spores de *Geobacillus stearothermophilus* (par exemple ATCC 7953, NCTC 10007, NCIMB 8157 ou CIP 52.81) ou d'autres souches présentant des performances démontrées équivalentes est recommandée. Le nombre de spores viables par support est supérieur à $5 \times 10^5$ et la valeur *D* à 121 °C est supérieure ou égale à 1,5 min. Il est vérifié que l'exposition à la vapeur des indicateurs biologiques durant 6 min à 121 ± 1 °C laisse des spores revivifiables, et qu'il n'y a pas de croissance des microorganismes témoins après exposition à la vapeur des indicateurs biologiques durant 15 min à 121 ± 1 °C.

**Stérilisation par la chaleur sèche**. L'utilisation de spores de *Bacillus atrophaeus* (par exemple ATCC 9372, NCIMB 8058 ou CIP 77.18) ou d'autres souches présentant des performances démontrées équivalentes est recommandée pour la préparation des indicateurs biologiques. Le nombre de spores viables par support est supérieur à $1 \times 10^6$ et la valeur *D* à 160 °C est supérieure ou égale à 2,5 min. La chaleur sèche à plus de 220 °C est souvent utilisée pour la stérilisation et la dépyrogénisation de la verrerie. Dans ce cas, au lieu d'employer des indicateurs biologiques, il est possible de démontrer l'existence d'une réduction de 3 log des endotoxines bactériennes résistant à la chaleur.

**Stérilisation par irradiation**. Les indicateurs biologiques peuvent être utilisés pour la surveillance des opérations de routine, comme moyen supplémentaire d'évaluer l'efficacité de la dose d'irradiation choisie, particulièrement dans le cas de la stérilisation par électrons accélérés. L'utilisation de spores de *Bacillus pumilus* (par exemple ATCC 27142, NCTC 10327, NCIMB 10692 ou CIP 77.25) ou d'autres souches présentant des performances démontrées équivalentes est recommandée. Le nombre de spores viables par support est supérieur à $1 \times 10^7$ et la valeur *D* est supérieure ou égale à 1,9 kGy. Il est vérifié qu'il n'y a pas de croissance des microorganismes témoins après exposition des indicateurs biologiques à 25 kGy (dose minimale absorbée).

**Stérilisation par les gaz**. L'utilisation d'indicateurs biologiques est nécessaire pour tous les procédés de stérilisation par les gaz, tant pour la validation des cycles que pour les opérations de routine. La stérilisation par les gaz est communément utilisée pour les dispositifs médicaux, les isolateurs, les locaux, etc. L'utilisation des gaz dans ce contexte n'entre pas dans le champ d'activités de la Pharmacopée Européenne. L'utilisation de spores de *Bacillus atrophaeus* (par exemple ATCC 9372, NCIMB 8058 ou CIP 77.18) ou d'autres souches présentant des performances démontrées équivalentes est recommandée pour l'oxyde d'éthylène. Le nombre de spores viables par support est supérieur à $1 \times 10^6$. Les paramètres de résistance sont les suivants : la valeur *D* est supérieure ou égale à 2,5 min pour un cycle d'essai mettant en jeu 600 mg/L d'oxyde d'éthylène, à 54 °C et sous 60 pour cent d'humidité relative. Il est vérifié qu'il n'y a pas de croissance des microorganismes témoins après exposition des indicateurs biologiques pendant 25 min au cycle d'essai décrit ci-dessus, et que l'exposition des indicateurs pendant 50 min à un cycle à température réduite (600 mg/L, 30 °C et 60 pour cent d'humidité relative) laisse des spores revivifiables.

**01/2011:50103**

# 5.1.3. EFFICACITÉ DE LA CONSERVATION ANTIMICROBIENNE

Dans le cas où les préparations pharmaceutiques elles-mêmes ne possèdent pas de propriétés antimicrobiennes adéquates, des agents de conservation antimicrobienne peuvent être ajoutés, spécialement aux préparations aqueuses, pour éviter la prolifération ou limiter la contamination microbienne qui, dans les conditions normales de conservation et d'emploi, notamment pour des récipients multidoses, pourrait se produire et entraîner un risque d'infection pour le malade et une détérioration de la préparation. Les agents de conservation antimicrobienne ne doivent pas remplacer des bonnes pratiques de fabrication.

L'efficacité d'un agent de conservation antimicrobienne peut être accrue ou diminuée par le composant actif de la préparation ou par la composition de la préparation dans laquelle il est incorporé ou par le récipient et le mode de fermeture adopté. L'activité antimicrobienne de la préparation dans son récipient définitif est évaluée pour sa durée de validité, afin de s'assurer que cette activité ne se modifie pas au cours de la période de conservation. Ces examens peuvent être effectués sur des échantillons prélevés à partir du récipient définitif immédiatement avant l'essai.

Au cours de la phase de développement d'une préparation pharmaceutique, il doit être démontré que l'activité antimicrobienne de la préparation telle quelle ou, si nécessaire, additionnée d'un ou de plusieurs agents de conservation, assure une protection appropriée contre les effets nocifs qui peuvent résulter d'une contamination microbienne ou d'une prolifération au cours de la conservation et de l'usage de la préparation.

L'efficacité de l'activité antimicrobienne peut être démontrée à l'aide de l'essai décrit ci-après. L'essai n'est pas destiné au contrôle de routine.

## ESSAI DE L'EFFICACITÉ DE LA CONSERVATION ANTIMICROBIENNE

L'essai consiste en la contamination artificielle de la préparation, si possible dans son récipient définitif, au moyen d'un inoculum de microorganismes appropriés prescrit, au maintien de la préparation inoculée à une température prescrite, au prélèvement d'échantillons à partir du récipient à intervalles de temps donnés et au dénombrement des organismes dans les échantillons ainsi prélevés.

Les propriétés de conservation de la préparation sont adéquates si, dans les conditions de l'essai, une diminution importante ou, selon le cas, l'absence d'augmentation du nombre de microorganismes dans la préparation ensemencée se produit après les temps et aux températures prescrits. Les critères d'acceptation, en terme de diminution du nombre de microorganismes en fonction du temps, varient pour les diverses catégories de préparations, selon le degré de protection recherché (voir tableaux 5.1.3.-1, 5.1.3.-2, 5.1.3.-3).

*Microorganismes d'essai*

| | |
|---|---|
| *Pseudomonas aeruginosa* | ATCC 9027 ; NCIMB 8626 ; CIP 82.118. |
| *Staphylococcus aureus* | ATCC 6538 ; NCTC 10788 ; NCIMB 9518 ; CIP 4.83. |
| *Candida albicans* | ATCC 10231 ; NCPF 3179 ; IP 48.72. |
| *Aspergillus brasiliensis* | ATCC 16404 ; IMI 149007 ; IP 1431.83. |

Les essais sont effectués à l'aide de souches uniques. Aux microorganismes prescrits peuvent être ajoutées, dans les cas appropriés, d'autres souches ou espèces qui peuvent représenter des contaminants potentiels de la préparation. Il est recommandé d'utiliser, par exemple, *Escherichia coli* (ATCC 8739 ; NCIMB 8545 ; CIP 53.126) pour toutes les préparations orales et *Zygosaccharomyces rouxii* (NCYC 381 ; IP 2021.92) pour les préparations orales à concentration élevée en sucre.

**Préparation de l'inoculum**

Avant l'essai, ensemencez la surface d'un milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja (*2.6.12*) pour les bactéries ou celle d'un milieu Sabouraud dextrosé-gélosé sans addition d'antibiotique (*2.6.12*) pour les champignons, avec la culture mère récemment obtenue de chacun des microorganismes spécifiés. Incubez les cultures bactériennes à une température de 30-35 °C pendant 18-24 h, la culture de *C. albicans* à une température de 20-25 °C pendant 48 h et la culture de *A. brasiliensis* à une température de 20-25 °C pendant 1 semaine ou jusqu'à obtention d'une sporulation satisfaisante. Des subcultures peuvent être nécessaires après reprise des microorganismes, avant qu'ils n'atteignent leur état optimal, mais il est recommandé de maintenir au minimum le nombre de repiquages.

Pour récolter les cultures bactériennes et de *C. albicans*, utilisez un liquide de suspension stérile contenant 9 g/L de *chlorure de sodium R*. Dispersez et transférez la culture développée en surface dans un récipient approprié. Ajoutez une quantité de liquide de suspension suffisante pour réduire le nombre de microorganismes à environ $10^8$ par millilitre. Pour récolter la culture de *A. brasiliensis*, utilisez un liquide de suspension stérile contenant 9 g/L de *chlorure de sodium R* et 0,5 g/L de *polysorbate 80 R* et ajustez le nombre des spores à environ $10^8$ par millilitre avec la même solution.

Prélevez immédiatement un échantillon approprié de chaque suspension et déterminez le nombre d'unités formant colonie par millilitre dans chaque suspension par dénombrement sur plaques ou par filtration sur membrane (*2.6.12*). Ce chiffre sert à déterminer l'inoculum et le niveau de base à employer dans l'essai. Les suspensions doivent être utilisées immédiatement.

## PROCÉDÉ

Pour le dénombrement des microorganismes viables dans les préparations ensemencées, utilisez le même milieu gélosé que celui employé dans la culture initiale du microorganisme correspondant.

Ensemencez une série de récipients du produit à examiner avec une suspension de l'un des microorganismes d'essais afin d'obtenir un inoculum de $10^5$ à $10^6$ microorganismes par millilitre ou par gramme de préparation. Le volume de la suspension de l'inoculum ne dépasse pas 1 pour cent du volume du produit. Mélangez soigneusement pour assurer une répartition homogène.

Maintenez le produit ensemencé à une température de 20-25 °C à l'abri de la lumière. Prélevez des échantillons appropriés de chaque récipient, par exemple 1 mL ou 1 g, au temps zéro et aux intervalles appropriés, selon le type de préparation, et déterminez le nombre de microorganismes viables par dénombrement sur plaques ou par filtration sur membrane (*2.6.12*), en vérifiant que toute activité antimicrobienne résiduelle dans la préparation est éliminée par dilution, par filtration ou par l'utilisation d'un neutralisant spécifique. Lorsque des procédés de dilution sont utilisés, tenez compte de la réduction de la sensibilité dans la détection de petits nombres de microorganismes viables. Lorsqu'un neutralisant spécifique est utilisé, la capacité du système à permettre la croissance des microorganismes d'essai est confirmée à l'aide de contrôles appropriés.

La méthode est validée afin de vérifier sa capacité à mettre en évidence la réduction requise du nombre de microorganismes viables.

## CRITÈRES D'ACCEPTATION

Les critères pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne sont donnés dans les tableaux 5.1.3.-1, 5.1.3.-2 et 5.1.3.-3 en termes de réduction logarithmique du nombre de microorganismes viables par rapport à la valeur obtenue pour l'inoculum.

Tableau 5.1.3.-1. – *Préparations parentérales, préparations ophtalmiques, préparations intra-utérines et préparations intramammaires*

| | | Réduction logarithmique | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **6 h** | **24 h** | **7 j** | **14 j** | **28 j** |
| Bactéries | A | 2 | 3 | - | - | NR |
| | B | - | 1 | 3 | - | NI |
| Champignons | A | - | - | 2 | - | NI |
| | B | - | - | - | 1 | NI |

NR : non retrouvé
NI : pas d'augmentation du nombre de microorganismes viables par rapport à la lecture précédente

Les critères A représentent l'efficacité qu'il est recommandé d'atteindre. Dans des cas justifiés, lorsque les critères A ne peuvent être respectés, par exemple en raison d'une augmentation du risque de réactions indésirables, les critères B s'appliquent.

Tableau 5.1.3.-2. – *Préparations auriculaires, préparations nasales, préparations pour application cutanée et préparations pour inhalation*

| | | Réduction logarithmique | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **2 j** | **7 j** | **14 j** | **28 j** |
| Bactéries | A | 2 | 3 | - | NI |
| | B | - | - | 3 | NI |
| Champignons | A | - | - | 2 | NI |
| | B | - | - | 1 | NI |

NI : pas d'augmentation du nombre de microorganismes viables par rapport à la lecture précédente

Les critères A représentent l'efficacité qu'il est recommandé d'atteindre. Dans des cas justifiés, lorsque les critères A ne peuvent être respectés, par exemple en raison d'une augmentation du risque de réactions indésirables, les critères B s'appliquent.

Tableau 5.1.3.-3. – *Préparations orales, préparations buccales et préparations rectales*

| | Réduction logarithmique | |
|---|---|---|
| | **14 j** | **28 j** |
| Bactéries | 3 | NI |
| Champignons | 1 | NI |

NI : pas d'augmentation du nombre de microorganismes viables par rapport à la lecture précédente

Ces critères représentent l'efficacité qu'il est recommandé d'atteindre.

**01/2011:50104**

# 5.1.4. QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE DES PRÉPARATIONS PHARMACEUTIQUES ET DES SUBSTANCES POUR USAGE PHARMACEUTIQUE NON STÉRILES(1)

La présence de certains microorganismes dans des préparations non stériles peut réduire voire annuler l'activité thérapeutique du produit, et constitue un danger potentiel pour la santé du patient. Les fabricants sont donc tenus d'assurer une faible charge microbienne (biocharge) dans les formes pharmaceutiques finies, par la mise en oeuvre des textes en vigueur sur les Bonnes Pratiques de Fabrication au cours de la fabrication, de la conservation et de la distribution des préparations pharmaceutiques.

Le contrôle microbiologique des produits non stériles est réalisé selon les méthodes décrites dans les chapitres généraux *2.6.12* et *2.6.13*. Les tableaux 5.1.4.-1 et 5.1.4.-2 donnent des critères d'acceptation applicables aux produits pharmaceutiques non stériles sur la base du dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT) et du dénombrement des moisissures/levures totales (DMLT). Ces critères d'acceptation reposent sur des résultats individuels, ou sur des résultats moyens lorsque l'on effectue plusieurs dénombrements (réplicats), par exemple pour les dénombrements sur plaques.

Lorsqu'un critère d'acceptation est prescrit en matière de qualité microbiologique, il est interprété comme suit :

– $10^1$ UFC : nombre maximal acceptable = 20 ;
– $10^2$ UFC : nombre maximal acceptable = 200 ;
– $10^3$ UFC : nombre maximal acceptable = 2000, et ainsi de suite.

Le tableau 5.1.4.-1 comprend une liste de microorganismes spécifiés pour lesquels sont établis des critères d'acceptation. Cette liste n'est pas forcément exhaustive et la recherche d'autres microorganismes peut être nécessaire pour une préparation donnée, selon la nature de la matière de départ et le procédé de fabrication.

S'il a été démontré qu'aucune des recherches prescrites ne permet un dénombrement valide des microorganismes au niveau prescrit, une méthode validée ayant une limite de détection aussi proche que possible du critère d'acceptation indiqué est utilisée.

Outre les microorganismes cités dans le tableau 5.1.4.-1, l'importance à accorder à la présence d'autres microorganismes doit être évaluée au regard de différents facteurs :

– utilisation du produit : risque variable selon la voie d'administration (ophtalmique, nasale, respiratoire) ;
– nature du produit : aptitude à favoriser la croissance microbienne, propriétés antimicrobiennes adéquates ;
– mode d'administration ;
– catégorie de patients visée : risque potentiellement différent pour les nourrissons, les jeunes enfants, les personnes fragiles ;
– emploi d'agents immunosuppresseurs, de corticostéroïdes ;
– existence de pathologies, de blessures, de lésions organiques.

Lorsqu'elle est justifiée, une évaluation des facteurs en cause, au regard du risque induit, est conduite par du personnel disposant d'une formation spécialisée en analyse microbiologique et interprétation des données microbiologiques. Pour les matières premières, cette évaluation tient compte du traitement auquel est soumis le produit, des techniques actuelles de contrôle et de la disponibilité de produits de la qualité désirée.

♦*Des critères d'acceptation recommandés en matière de qualité microbiologique des médicaments à base de plantes pour usage oral sont donnés dans le chapitre général 5.1.8.*♦

(1) Ce chapitre a fait l'objet du processus d'harmonisation des pharmacopées. Voir chapitre *5.8. Harmonisation des pharmacopées.*

5. Textes généraux

Tableau 5.1.4.-1. – *Critères d'acceptation de la qualité microbiologique des formes pharmaceutiques non stériles*

| Voie d'administration | DGAT (UFC/g ou UFC/mL) | DMLT (UFC/g ou UFC/mL) | Microorganismes spécifiés |
|---|---|---|---|
| Voie orale : préparations non aqueuses | $10^3$ | $10^2$ | Absence d'*Escherichia coli* (1 g ou 1 mL) |
| Voie orale : préparations aqueuses | $10^2$ | $10^1$ | Absence d'*Escherichia coli* (1 g ou 1 mL) |
| Voie rectale | $10^3$ | $10^2$ | - |
| Voie buccale<br>Voie gingivale<br>Voie cutanée<br>Voie nasale<br>Voie auriculaire | $10^2$ | $10^1$ | Absence de *Staphylococcus aureus* (1 g ou 1 mL)<br>Absence de *Pseudomonas aeruginosa* (1 g ou 1 mL) |
| Voie vaginale | $10^2$ | $10^1$ | Absence de *Pseudomonas aeruginosa* (1 g ou 1 mL)<br>Absence de *Staphylococcus aureus* (1 g ou 1 mL)<br>Absence de *Candida albicans* (1 g ou 1 mL) |
| Voie transdermique (limites pour un dispositif transdermique, film protecteur et support compris) | $10^2$ | $10^1$ | Absence de *Staphylococcus aureus* (1 dispositif)<br>Absence de *Pseudomonas aeruginosa* (1 dispositif) |
| Inhalation (des exigences spécifiques s'appliquent aux préparations liquides dispensées au moyen de nébuliseurs) | $10^2$ | $10^1$ | Absence de *Staphylococcus aureus* (1 g ou 1 mL)<br>Absence de *Pseudomonas aeruginosa* (1 g ou 1 mL)<br>Absence de bactéries gram-négatives résistantes aux sels biliaires (1 g ou 1 mL) |
| ♦Disposition spéciale de la Ph. Eur. pour les préparations pour administration par voie orale contenant des matières premières d'origine naturelle (animale, végétale ou minérale), lorsqu'un prétraitement antimicrobien est impossible et que l'Autorité compétente admet une DGAT des matières premières supérieure à $10^3$ UFC/g ou UFC/mL. | $10^4$ | $10^2$ | Au maximum $10^2$ UFC de bactéries gram-négatives résistantes aux sels biliaires (1 g ou 1 mL)<br>Absence de salmonelles (10 g ou 10 mL)<br>Absence d'*Escherichia coli* (1 g ou 1 mL)<br>Absence de *Staphylococcus aureus* (1 g ou 1 mL)♦ |

Tableau 5.1.4.-2. – *Critères d'acceptation de la qualité microbiologique des substances pour usage pharmaceutique non stériles*

| | DGAT (UFC/g ou UFC/mL) | DMLT (UFC/g ou UFC/mL) |
|---|---|---|
| Substances pour usage pharmaceutique | $10^3$ | $10^2$ |

**01/2009:50105**

# 5.1.5. APPLICATION DU CONCEPT $F_0$ À LA STÉRILISATION PAR LA VAPEUR DES PRÉPARATIONS AQUEUSES

*Le chapitre suivant est publié à titre d'information.*

La valeur $F_0$ associée à un procédé de stérilisation par la vapeur saturée exprime sa létalité, en termes de temps (en minutes) d'exposition à une température de 121 °C qui serait nécessaire pour obtenir le même résultat qu'avec le procédé utilisé, appliqué au produit dans son récipient final, par rapport à des microorganismes possédant une valeur $Z$ théorique de 10.

La $F_0$ totale d'un procédé prend en compte les phases de montée en température et de refroidissement du cycle, et peut être calculée par intégration par rapport au temps des taux de létalité associés à des intervalles de température discrets.

Lorsqu'un cycle de stérilisation par la vapeur est choisi sur la base du concept $F_0$, il faut s'assurer qu'il permet d'obtenir de façon constante une assurance de stérilité adéquate. Pour valider le procédé, il peut également être nécessaire d'effectuer un suivi microbiologique continu et rigoureux pendant la production de routine, afin de démontrer que les paramètres microbiologiques restent compris dans les tolérances établies, de façon à donner un NAS d'au moins $10^{-6}$.

Dans le contexte de la stérilisation par la vapeur, la valeur $Z$ caractérise la résistance d'un microorganisme aux variations de température. Elle est définie comme la variation de température nécessaire pour modifier la valeur $D$ d'un facteur 10.

La valeur $D$ est la valeur d'un paramètre de stérilisation (durée ou dose absorbée) nécessaire pour réduire jusqu'à 10 pour cent de sa valeur initiale le nombre de microorganismes viables. La valeur $D$ n'a de signification que dans des conditions expérimentales bien définies.

Il existe entre ces différents paramètres les relations mathématiques suivantes :

$$F_0 = D_{121} (\log N_0 - \log N) = D_{121} \log IF$$

$D_{121}$ = valeur $D$ des spores de référence (*5.1.2*) à 121 °C,
$N_0$ = nombre initial de microorganismes viables,
$N$ = nombre final de microorganismes viables,
$IF$ = facteur d'inactivation.

$$Z = \frac{T_2 - T_1}{\log D_1 - \log D_2}$$

$D_1$ = valeur $D$ du microorganisme à la température $T_1$,
$D_2$ = valeur $D$ du microorganisme à la température $T_2$.

$$IF = \frac{N_0}{N} = 10^{t/D}$$

$t$ = temps d'exposition,
$D$ = valeur $D$ du microorganisme dans les conditions d'exposition.

**01/2008:50106**

# 5.1.6. MÉTHODES ALTERNATIVES POUR LE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE

*Le chapitre suivant est publié à titre d'information.*

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'objectif du présent chapitre est de faciliter la mise en oeuvre et l'emploi de méthodes microbiologiques alternatives, lorsqu'elles permettent d'assurer des contrôles microbiologiques à meilleur coût et d'apporter une garantie accrue quant à la qualité des produits pharmaceutiques. Ces méthodes alternatives peuvent également trouver des applications dans le cadre de la surveillance de l'environnement.

Les méthodes microbiologiques décrites dans la Pharmacopée Européenne sont utilisées depuis près d'un siècle, et ces méthodes de dénombrement et d'identification des microorganismes rendent encore de grands services aux microbiologistes. Pendant toutes ces années, elles ont constitué un outil précieux pour contrôler les produits pharmaceutiques et assurer leur sécurité microbiologique. Toutefois, les méthodes microbiologiques conventionnelles sont lentes et ne livrent des résultats qu'au terme d'un temps d'incubation pouvant aller jusqu'à 14 jours. Les résultats des contrôles microbiologiques conventionnels permettent donc rarement une intervention corrective proactive.

Au cours des dernières années sont apparues des méthodes alternatives de contrôle de la qualité microbiologique, dont certaines se sont avérées capables de livrer des résultats en temps réel (ou quasi réel), ouvrant la possibilité d'une action corrective plus précoce. Ces nouvelles méthodes apportent également une amélioration significative de la qualité des contrôles.

Le présent chapitre décrit un ensemble de nouvelles méthodes microbiologiques possédant des applications pharmaceutiques. Il en expose le principe, en discute les avantages et inconvénients, puis en présente les utilisations potentielles, c'est-à-dire les applications qui peuvent être envisagées au vu des principes sur lesquels se fonde la méthode. Son objectif n'est pas de suggérer quelles doivent être les applications effectives. Il comporte enfin des considérations d'ordre général sur la validation de ces méthodes, illustrée par des exemples spécifiques pour chaque type de méthode. Pour information, un protocole de validation détaillé est décrit en fin de chapitre.

Ce chapitre n'a pas pour objectif de recommander l'une ou l'autre méthode, ni de fournir une liste exclusive ou exhaustive des méthodes microbiologiques alternatives qui peuvent être utilisées pour le contrôle pharmaceutique. Son contenu est purement informatif, mais il peut être utilisé comme guide pour choisir une méthode microbiologique alternative en complément ou remplacement des approches microbiologiques conventionnelles, ainsi que pour procéder à la validation de la méthode choisie. Dans ce domaine en évolution constante et rapide, de nouvelles méthodes sont toujours susceptibles d'apparaître et les indications figurant dans ce chapitre peuvent leur être également applicables.

Il existe en matière de contrôles microbiologiques 3 grands types de déterminations spécifiques :

- essais qualitatifs de présence/absence de microorganismes,
- essais quantitatifs de dénombrement de microorganismes,
- essais d'identification.

1-1. *ESSAIS QUALITATIFS DE PRÉSENCE/ABSENCE DE MICROORGANISMES*

En analyse microbiologique conventionnelle, les essais de ce type utilisent typiquement le développement, dans un milieu de culture, d'une turbidité ou autre modification liée à la croissance comme preuve de la présence de microorganismes viables dans l'échantillon examiné. L'exemple le plus courant est l'essai de stérilité. Les essais visant à établir la présence/absence dans un échantillon de microorganismes viables d'un type particulier constituent d'autres exemples.

1-2. *ESSAIS QUANTITATIFS DE DÉNOMBREMENT DE MICROORGANISMES*

La filtration sur membrane et le dénombrement sur plaque sont les méthodes conventionnelles utilisées pour estimer le nombre de microorganismes viables présents dans un échantillon. La méthode dite du nombre le plus probable (NPP) constitue un autre exemple de ce type de méthodes. Elle a été développée comme outil d'estimation du nombre de microorganismes viables présents dans un échantillon lorsque celui-ci ne se prête pas à un dénombrement direct sur plaque.

1-3. *ESSAIS D'IDENTIFICATION*

La caractérisation biochimique et morphologique d'un microorganisme inconnu est la méthode classique d'identification utilisée dans les essais de la pharmacopée. Des méthodes récemment développées ont permis de rationaliser et d'automatiser certains aspects de cette identification, notamment pour ce qui concerne le traitement, l'analyse et le stockage des données. Plusieurs approches nouvelles ont été intégrées à ces méthodes, dont certaines réactions biochimiques, l'utilisation de substrats carbonés, la caractérisation de la composition en acides gras, le profilage à l'aide d'endonucléases de restriction et le séquençage de l'ADNr 16S.

2. PRINCIPES GÉNÉRAUX DES MÉTHODES ALTERNATIVES

Les méthodes microbiologiques alternatives font appel à des techniques directes ou indirectes de détection ; dans certains cas, une amplification du signal est obtenue par des méthodes d'enrichissement. Pour tenir compte de ces différences et pour des raisons de commodité dans la présentation de ce chapitre, les méthodes alternatives de contrôle de la qualité microbiologique sont divisées en 3 catégories :

- méthodes fondées sur la croissance, avec, généralement, obtention d'un signal détectable au terme d'une période de subculture,
- mesure directe, avec différenciation et visualisation de cellules individuelles,
- analyse de composants cellulaires, avec mesure indirecte d'une présence microbienne via l'expression de composants cellulaires spécifiques.

Ces distinctions peuvent dans certains cas être artificielles, mais elles permettent d'établir une classification opérationnelle.

2-1. *MÉTHODES FONDÉES SUR LA CROISSANCE*

2-1-1. **Détection précoce de croissance**

2-1-1-1. *Aspects critiques généraux des méthodes fondées sur une détection précoce de croissance*

Ces méthodes sont tributaires de l'existence d'une croissance microbienne permettant l'obtention d'un nombre détectable de microorganismes. Aux niveaux de contamination, typiquement faibles, qui caractérisent les produits pharmaceutiques, la détection peut demander 24 h ou même davantage, surtout dans le cas des moisissures et levures. Il est possible d'en accroître la sensibilité en procédant à la filtration du produit. La membrane filtrante est alors incubée dans le milieu et le résultat est exprimé en termes de présence/absence dans la quantité de produit correspondant au volume filtré. Ces systèmes comportant des étapes d'incubation en milieu liquide n'apportent pas d'informations quantitatives mais permettent seulement d'établir une présence/absence dans la quantité de produit analysée. L'analyse de différentes quantités d'échantillon peut permettre une détermination semi-quantitative (essai limite). Le principal avantage de ces méthodes, par rapport aux méthodes classiques, réside souvent dans leur capacité à permettre le traitement simultané d'un grand nombre d'échantillons et, potentiellement, l'obtention d'un résultat dans un temps plus court.

2-1-1-2. *Méthodes électrochimiques*

*Principe.* La multiplication et l'activité métabolique des microorganismes, dans un milieu de croissance approprié, entraînent la production de métabolites ioniques fortement chargés à partir des nutriments organiques faiblement chargés, induisant ainsi une modification des propriétés électriques du milieu. Ces modifications d'impédance (mesurée par la conductance ou la capacitance) sont suivies au moyen d'électrodes intégrées aux récipients de culture et en contact avec le milieu. Le point final de mesure est le temps requis pour

détecter une variation d'impédance prédéterminée. Le temps de détection est inversement proportionnel à la taille de l'inoculum initial. Pour les moisissures et levures qui ne produisent que de faibles variations d'impédance, on a généralement recours à une mesure indirecte de la conductance par le biais d'un réceptacle d'hydroxyde de potassium. Une mesure directe de la capacitance est également possible.

*Aspects critiques.* Détection automatisée avec génération de données électroniques, graphique des variations d'impédance reflétant la courbe de croissance des microorganismes, réduction à 48 h de la durée de l'essai.

*Utilisations potentielles.* Dosage microbiologique des antibiotiques, efficacité de la conservation antimicrobienne, présence/absence dans la quantité d'échantillon examinée lors du dénombrement de microorganismes viables totaux.

2-1-1-3. *Mesure de la consommation ou production d'un gaz*

*Principe.* Les microorganismes en phase de multiplication et de métabolisme actifs utilisent des milieux de croissance appropriés, produisant en retour des métabolites ou induisant l'élimination d'éléments nutritifs spécifiques. L'une des approches possibles consiste à surveiller les modifications de composition de l'espace de tête gazeux dans des récipients de culture fermés, à l'aide de transducteurs de pression réagissant à la production d'un gaz ($CO_2$ par exemple) ou à la consommation d'un gaz ($O_2$ par exemple). D'autres indicateurs peuvent également être utilisés, notamment la détection colorimétrique du $CO_2$.

*Aspects critiques.* Pour les microorganismes à croissance lente tels que les mycobactéries, cette méthode permet une détection plus rapide. Il n'existe pas de relation directe entre la charge microbiologique initiale et le point final de détection. La température d'incubation et l'algorithme de traitement des données influencent fortement les résultats.

*Utilisations potentielles.* Produits dans lesquels des microorganismes à croissance lente peuvent être présents.

2-1-1-4. *Bioluminescence*

*Principe.* L'adénosine triphosphate (ATP) est un marqueur bien connu de viabilité cellulaire. La méthode de bioluminescence consiste à provoquer la libération d'ATP par les microorganismes, à l'aide d'un agent d'extraction approprié, puis à en effectuer un dosage quantitatif au moyen du système enzymatique luciférine/luciférase, qui émet une lumière d'intensité proportionnelle à la quantité d'ATP présente. La lumière émise est mesurée avec un bioluminomètre et exprimée en unité de lumière relative (ULR) dans le cas de la bioluminescence en milieu liquide. La valeur ULR obtenue pour l'échantillon est comparée à une valeur seuil, établie à 2 ou 3 fois l'ULR du milieu utilisé pour la culture ou la mise en suspension de l'échantillon. Le résultat est positif si l'ULR obtenue pour l'échantillon est supérieure à la valeur seuil. Cette méthode comporte une variante qui consiste à retenir les microorganismes sur une membrane, puis à les cultiver par incubation sur milieu gélosé, les microcolonies formées étant détectées au moyen d'une caméra à détecteur à couplage de charge (CCD) et les résultats exprimés en microUFC. Cette méthode est quantitative, mais sur un intervalle de linéarité étroit.

*Aspects critiques.* Si le produit dont provient l'échantillon présente un niveau de contamination bactérienne élevé (de l'ordre de 500-1000 UFC par quantité d'échantillon examinée), la détection est rapide (1 h). Si le niveau de contamination est faible (moins de 100 UFC par quantité d'échantillon examinée), il est nécessaire d'amplifier le nombre de microorganismes par incubation sur un milieu de culture (liquide ou gélosé) pendant 12-48 h selon la méthode utilisée. Après ce temps d'incubation, une cellule unique capable de croissance sera multipliée par 1000 et pourra être détectée. La production d'ATP est variable d'un microorganisme à l'autre, les bactéries en contenant 1-10 fg et les germes fongiques environ 100 fg par cellule, et il existe de nombreux autres facteurs pouvant affecter la teneur en ATP de la cellule : espèce, phase de croissance, état nutritionnel, stress ou âge de la cellule. Il n'est donc pas possible d'obtenir un dénombrement direct à partir de la valeur ULR. Par ailleurs, la turbidité et la coloration de l'échantillon peuvent affecter la réaction, soit en l'amplifiant (d'où une augmentation du signal lumineux émis) soit en l'atténuant (d'où une diminution du signal lumineux émis). En raison de sa nature enzymatique, la réaction est également sensible à l'interférence de produits susceptibles d'inhiber ou de réduire l'activité enzymatique. En pratique, ce type d'interférence est rare mais il doit néanmoins faire l'objet d'une étude approfondie lors de la validation. La réaction est également sensible à la présence d'autres nucléotides phosphatés tels que l'ADP ou le GTP, qui interfèrent en produisant de l'ATP en présence d'adénylate kinase. Cette enzyme est utilisée pour améliorer la sensibilité de certaines méthodes de bioluminescence : un 3$^{e}$ réactif contenant de l'ADP est alors ajouté et de l'ATP supplémentaire est produit en présence de l'adénylate kinase libérée par les microorganismes.

*Utilisations potentielles.* Efficacité de la conservation antimicrobienne, présence/absence de microorganismes dans la quantité d'échantillon examinée lors du dénombrement des germes aérobies viables totaux (bioluminescence en tube ou sur plaque de microtitrage), dénombrement des germes aérobies viables totaux (bioluminescence sur membrane), surveillance de l'environnement et de la qualité de l'eau. La méthode est applicable aux produits filtrables ou non filtrables.

2-1-1-5. *Microcalorimétrie*

*Principe.* Le catabolisme microbien génère de la chaleur qui peut être mesurée avec exactitude par microcalorimétrie. On peut détecter l'existence d'un dégagement thermique en introduisant l'échantillon contaminé dans une ampoule scellée contenant un milieu de croissance, qui sera placée dans un calorimètre. L'emploi d'instruments sensibles permet d'établir des courbes de croissance. La calorimétrie de flux permet de détecter des charges microbiologiques importantes.

*Aspects critiques.* Théoriquement, cette méthode ne requiert pas une croissance microbienne mais simplement une activité catabolique. Néanmoins, il faut un nombre minimal de microorganismes pour générer des mesures thermiques supérieures à la ligne de base, ce que l'on obtient généralement en utilisant un milieu d'enrichissement.

*Utilisations potentielles.* Efficacité de la conservation antimicrobienne.

2-1-1-6. *Turbidimétrie*

*Principe.* La croissance microbienne peut entraîner des modifications détectables de l'opacité des milieux, qu'il est possible de quantifier avec exactitude par mesure de la densité optique à une longueur d'onde spécifiée. Sous leur forme la plus simple, ces mesures sont effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre standard, en général sur une plage de longueur d'onde de 420-615 nm. Il existe également des systèmes automatisés comportant des lecteurs de plaques de microtitrage, qui délivrent des mesures en continu et permettent une détection précoce des modifications de densité optique.

*Aspects critiques.* Des tentatives ont été faites pour déduire par extrapolation la charge microbiologique initiale à partir de la durée de détection, mais elles sont limitées aux microorganismes sains présentant des caractéristiques de croissance reproductibles. La méthode ne permet pas de différencier les microorganismes viables et non viables.

*Utilisations potentielles.* A partir de courbes d'étalonnage, détermination de la taille des inoculums de suspensions microbiennes à utiliser dans les essais pharmaceutiques. En mode automatisé, détermination de la sensibilité aux conservateurs des microorganismes de référence recouvrés dans les produits formulés.

2-1-1-7. *Méthodes utilisant des phages*

*Principe.* Des virus bactériens (bactériophages ou phages) peuvent infecter les cellules hôtes et entraîner leur lyse ou l'incorporation de leur matériel génétique et l'expression de nouvelles protéines. Leur haute spécificité vis-à-vis de l'hôte

peut être mise à profit dans les méthodes de détection, qui utilisent comme point final les conséquences de l'infection. Les points finals de ce type sont par exemple la formation d'une plaque sur un tapis solide de bactéries, la détection de composants intracellulaires libérés par la lyse des bactéries (éventuellement par colorimétrie) ou l'observation d'effets d'origine phagique tels que la nucléation de cristaux de glace ou la bioluminescence après infection par un phage génétiquement modifié. Des coliphages couplés à un marqueur fluorescent peuvent être utilisés pour la détection sélective d'*E. coli* viable, en combinaison avec la méthode DEFT (voir 2-2-3.).

*Aspects critiques*. La détection à l'aide de phages peut être utilisée tant pour des cultures homogènes que pour des cultures mixtes, où la spécificité vis-à-vis de l'hôte permet à la fois la détection et l'identification. Pour être décelable, le point final requiert souvent la présence d'un nombre minimum de cellules cibles assurant l'obtention d'un signal mesurable, ce qui implique un enrichissement dans les situations de faible charge microbiologique. Le processus d'infection virale peut être affecté par la composition de l'échantillon. Dans la plupart des cas, la forte spécificité vis-à-vis de l'hôte s'oppose à la détection d'un large spectre de contaminants microbiens.

*Utilisations potentielles*. Méthodes surtout utilisées dans le domaine de la recherche, avec quelques développements commerciaux ciblant principalement la microbiologie clinique et alimentaire. Ces méthodes sont susceptibles d'être utilisées pour déterminer la présence/absence de microorganismes spécifiés.

2-1-2. **Développement de milieux destinés à améliorer la détection**

*Principe*. Les milieux de culture existent depuis de nombreuses années et ont fait l'objet d'améliorations constantes. Innovation récente dans ce domaine, les substrats chromogènes sont de plus en plus utilisés en microbiologie clinique et alimentaire. La possibilité de détecter la présence d'enzymes spécifiques au moyen de substrats appropriés a conduit au développement d'un grand nombre de méthodes visant à l'identification de microorganismes par des techniques manuelles ou automatisées. L'incorporation de tels substrats dans un milieu d'isolement primaire, sélectif ou non sélectif, évite d'avoir à procéder à des subcultures et tests biochimiques ultérieurs pour identifier certains microorganismes. Les milieux de culture chromogènes, liquides ou solides, visent donc à induire des activités enzymatiques spécifiques permettant la détection et la différenciation de microorganismes. La formulation de ces milieux particuliers comporte des substrats définis, qui sont hydrolysés par une enzyme cellulaire spécifique produite par une bactérie donnée lors de sa croissance. Ces substrats sont choisis en fonction de l'activité enzymatique diagnostique recherchée et sont associés à des indicateurs colorés.

*Aspects critiques*. L'emploi de milieux innovants comporte plusieurs avantages : meilleure discrimination des colonies dans une culture mixte, facilité d'emploi et d'interprétation, temps de réponse plus court du fait de la simultanéité de la croissance et de l'identification des microorganismes. Elle exige toutefois une validation soignée des milieux pour s'assurer qu'ils sont à la fois spécifiques, sélectifs et robustes. La qualité du signal ne repose pas seulement sur le choix des enzymes utilisées pour la détection, car ces enzymes peuvent être présentes dans de nombreux genres, mais aussi sur certaines caractéristiques physicochimiques du milieu telles que le pH.

*Utilisations potentielles*. Détection de microorganismes spécifiés tels que *E. coli*, coliformes, salmonelles, staphylocoques et streptocoques. Grande utilité pour les contrôles de présence/absence. Détection des levures également possible à l'aide de milieux de culture chromogènes.

2-2. *MESURES DIRECTES*

2-2-1. **Cytométrie en phase solide**

*Principe*. Un filtre membrane est utilisé pour retenir les contaminants microbiens, lesquels sont colorés par marquage à l'aide d'un fluorophore (indicateur de viabilité) avant ou après filtration. Le fluorophore est un substrat conjugué, initialement non fluorogène, dont le clivage, qui nécessite une activité enzymatique intracellulaire, libère l'entité fluorescente. La membrane cellulaire doit être intacte pour assurer la rétention du fluorophore au sein du cytoplasme. La détection est ensuite opérée par excitation laser puis balayage automatique permettant la visualisation individuelle des microorganismes fluorescents viables. Un logiciel approprié fait le tri entre microorganismes viables et particules autofluorescentes. La grande sensibilité et la rapidité de la méthode permettent la détection en temps quasi réel des contaminants microbiens. On peut obtenir des nombres totaux de cellules en utilisant un colorant à fluorescence permanente.

*Aspects critiques*. La méthode rend possible la détection des microorganismes viables, métaboliquement actifs, difficilement ou non cultivables. Ceci peut nécessiter un réajustement des limites de contamination microbienne établies pour les échantillons en cours d'examen. La détection des spores exige que la germination ait commencé. La détection de cellules individuelles est possible, mais leur identification ne fait pas actuellement partie du protocole d'essai de routine. L'emploi d'anticorps fluorescents pourraient ouvrir la voie à une détection sélective. La présence de particules autofluorescentes, parfois difficiles à distinguer des microorganismes, peut donner lieu à des faux positifs.

*Utilisations potentielles*. Outil rapide et sensible d'évaluation non spécifique de la charge microbiologique. La cytométrie en phase solide possède des applications dans le domaine du contrôle des eaux de qualité pharmaceutique.

2-2-2. **Cytométrie en flux**

*Principe*. Les microorganismes en suspension, marqués par des fluorophores, sont détectés lors de leur passage dans un cytomètre en flux. L'emploi d'un substrat fluorophore indicateur de viabilité permet de différencier les microorganismes viables des particules non viables (voir section 2-2-1.).

*Aspects critiques*. La cytométrie en flux est applicable à l'analyse microbiologique des produits filtrables et non filtrables. Elle permet une détection en temps quasi réel, mais n'est pas aussi sensible que la cytométrie en phase solide. Pour obtenir la sensibilité requise par les applications pharmaceutiques, il est souvent nécessaire d'introduire une étape d'incubation en milieu de culture, ce qui ramène la méthode dans la catégorie des méthodes fondées sur la croissance. Des dilutions en série peuvent être nécessaires pour optimiser les performances de l'analyse des échantillons non filtrables et la taille des particules peut avoir une influence significative sur ces performances. Sauf pour ce qui concerne la filtrabilité, cette méthode relève des mêmes considérations que la cytométrie en phase solide. L'agglomération des bactéries peut poser problème (par exemple pour *S. aureus*).

*Utilisations potentielles*. Contrairement à la cytométrie en phase solide, possibilité de détection et dénombrement des microorganismes dans des produits contenant des quantités significatives de particules. Si une étape de pré-incubation est nécessaire, la méthode devient une détermination qualitative.

2-2-3. **Technique de filtration et épifluorescence directe (DEFT)**

*Principe*. Cette méthode peut être considérée comme un précurseur de la cytométrie en phase solide. Les microorganismes, concentrés par filtration de l'échantillon, sont colorés avec un réactif fluorescent (autrefois l'acridine orange mais plus fréquemment aujourd'hui le 4′,6-diamidino-2-phénylindole ou DAPI), qui peut être détecté sous éclairage épifluorescent. Les techniques de coloration vitale à fluorescence employées en cytométrie en phase solide (voir section 2-2-1.) sont transposables à la DEFT et des colorants redox fluorescents tels que le chlorure de 5-cyano-2,3-ditolyltétrazolium (CTC) peuvent être utilisés pour mettre en évidence les cellules ayant une activité respiratoire. Couplée à la microscopie, la DEFT permet la détection rapide

5. Textes généraux

des microorganismes avec une sensibilité absolue qui dépend du volume de produit filtré et du nombre de champs examinés. L'emploi de systèmes autofocalisants semi-automatisés couplés à une analyse d'images a sensiblement perfectionné la méthode. Une variante de cette méthode utilise une technique d'échantillonnage avec un film adhésif pour collecter les cellules sur les surfaces, la coloration étant ensuite effectuée sur le film, qui est examiné directement sous le microscope à épifluorescence.

*Aspects critiques.* La distribution des microorganismes sur la membrane influence la robustesse de la méthode. L'intensité de fluorescence peut être affectée par le procédé de coloration et l'état métabolique des microorganismes. Une courte phase de culture à la surface du filtre avant la coloration permet la formation de microcolonies. Celles-ci se colorent facilement, peuvent être aisément dénombrées et apportent la preuve de la viabilité. De nouveaux développements utilisant l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), qui résulte de l'interaction complémentaire d'une sonde oligonucléotidique couplée à un marqueur de fluorescence et d'une séquence spécifique d'ARNr ouvrent la voie à la détection sélective.

*Utilisations potentielles.* Emploi généralement limité aux fluides de faible viscosité, bien qu'une prédilution ou préfiltration soit parfois effectuée pour des produits visqueux ou particulaires. Donne de bons résultats pour la surveillance de la charge microbiologique des produits pharmaceutiques aqueux.

2-3. *ANALYSE DE COMPOSANTS CELLULAIRES*

2-3-1. **Phénotype**

2-3-1-1. *Méthodes immunologiques*

*Principe.* Des réactions de type antigène-anticorps peuvent être utilisées pour détecter des identifiants cellulaires caractérisant de façon univoque des microorganismes spécifiques. La mise en évidence de ces réactions peut faire intervenir l'agglutination, la colorimétrie ou la fluorimétrie, permettant une détection tant qualitative que quantitative. L'immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA) offre des méthodologies en phase solide simples.

*Aspects critiques.* La détection par des méthodes immunologiques dépend de l'expression univoque d'identifiants spécifiques. Ces méthodes ne démontrent pas nécessairement la présence de microorganismes viables.

*Utilisations potentielles.* Détection et identification de microorganismes spécifiés.

2-3-1-2. *Profil de composition en acides gras*

*Principe.* La composition en acides gras des microorganismes est stable, bien conservée et présente un degré d'homogénéité élevé au sein des différents groupes taxonomiques. L'isolat est cultivé sur milieu standard, puis récolté. Après saponification, méthylation et extraction des acides gras, l'identification et la quantification des esters de méthyle résultants sont effectuées par chromatographie en phase gazeuse. La composition en acides gras de l'isolat inconnu est comparée aux profils d'isolats connus figurant dans une base de données, pour une recherche de concordance et une éventuelle identification.

*Aspects critiques.* L'emploi de profils de composition en acides gras pour l'identification de microorganismes requiert un niveau élevé de standardisation. Il est crucial, pour l'analyse de la composition en acides gras de cellules microbiennes, que les isolats soient cultivés sur des milieux et dans des conditions d'incubation normalisés. La chromatographie en phase gazeuse doit également être effectuée dans des conditions opératoires normalisées, avec analyse fréquente de préparations d'étalonnage et d'isolats connus.

*Utilisations potentielles.* Identification ou caractérisation de la flore dans l'environnement ou dans un produit, pour le traçage de contaminants ou la détection de microorganismes spécifiés.

2-3-1-3. *Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)*

*Principe.* La transformée de Fourier du spectre infrarouge de microorganismes entiers donne un profil stable, identifiable et caractéristique d'un groupe taxonomique. Des instruments disponibles sur le marché assurent l'analyse du profil FTIR. L'isolat est cultivé sur milieu standard, puis récolté. Après transfert de la masse cellulaire sur un support, enregistrement du spectre infrarouge et calcul de la transformée de Fourier, le profil obtenu est comparé aux profils d'isolats connus figurant dans une base de données, pour une recherche de concordance et une éventuelle identification.

*Aspects critiques.* L'emploi de profils FTIR pour l'identification de microorganismes requiert un niveau élevé de standardisation. Il est crucial, pour l'analyse d'un profil FTIR, que les isolats soient cultivés sur des milieux et dans des conditions d'incubation normalisés. Toutes les cellules doivent être au même stade du cycle de croissance lors de l'analyse. Une attention particulière doit être portée à la validation.

*Utilisations potentielles.* Identification ou caractérisation de la flore dans l'environnement ou dans un produit, pour le traçage de contaminants ou la détection de microorganismes spécifiés.

2-3-1-4. *Spectrométrie de masse*

*Principe.* Le chauffage sous vide d'isolats microbiens libère des produits de décomposition gazeux qui peuvent être analysés par spectrométrie de masse et donnent des spectres de masse caractéristiques. De même, des cellules microbiennes intactes, lorsqu'elles sont soumises à une ionisation intense dans un système de spectrométrie de masse à ionisation par désorption laser avec analyse à temps de vol (MALDI-TOF), présentent un profil distinctif en espèces chargées. Ces spectres peuvent être comparés à des profils connus pour une aide rapide à l'identification.

*Aspects critiques.* L'analyse des isolats nécessite une phase de culture préalable.

*Utilisations potentielles.* Identification ou caractérisation de la flore dans l'environnement ou dans un produit, pour le traçage de contaminants ou la détection de microorganismes spécifiés.

2-3-1-5. *Dosages biochimiques fondés sur des réactions physiologiques*

*Principe.* Le dosage est généralement précédé par une coloration de Gram ou un autre test de différenciation précoce permettant de choisir le protocole d'essai approprié. Les suspensions de cellules microbiennes sont examinées à l'aide de trousses d'identification utilisant une propriété biochimique particulière du microorganisme, telle que l'utilisation de sources carbonées spécifiques. L'identification de la culture est effectuée par comparaison de son profil de réaction biochimique avec une base de données. Ces méthodes sont mises en oeuvre manuellement ou à l'aide d'instruments automatisés.

*Aspects critiques.* Il est nécessaire de disposer d'une colonie pure qui ne soit pas âgée de plus de 3 jours. La mise en oeuvre du système est sans difficulté, mais l'interprétation des résultats peut être subjective. Selon le système utilisé et les microorganismes étudiés, l'obtention des résultats peut être très rapide.

*Utilisations potentielles.* Identification ou caractérisation de la flore dans l'environnement ou dans un produit, pour le traçage de contaminants ou la détection de microorganismes spécifiés.

2-3-2. **Génotype**

2-3-2-1. *Techniques d'amplification des acides nucléiques*

*Principe général.* Les techniques d'amplification reposent sur la réitération de la réaction de polymérisation de l'ADN, selon un processus dit de polymérisation en chaîne (PCR), qui conduit à une augmentation exponentielle de la teneur d'un fragment spécifique de l'acide nucléique considéré. Ce processus cyclique, thermophile, consiste à amplifier un fragment d'ADN spécifique à l'aide d'amorces oligonucléotidiques (voir chapitre *2.6.21*). L'ARN peut également être amplifié par PCR après transcription en ADNc par une transcriptase inverse, méthode

appelée PCR à transcriptase inverse (RT-PCR). D'autres méthodes spécifiques ciblant l'ARN, telles que les techniques de *nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA) ou de *transcription-mediated amplification* (TMA), permettent d'amplifier des copies anti-sens multiples de l'ARN cible. Les fragments d'acide nucléique amplifiés peuvent être analysés par plusieurs méthodes : analyse de la taille des fragments, analyse d'une séquence spécifique, réamplification avec une seconde paire d'amorces, ou détection spécifique par hybridation avec une sonde associée à un marqueur fluorescent. Selon la méthode d'analyse choisie, la technique d'amplification peut être qualitative, semi-quantitative ou quantitative. Pour les applications d'identification/caractérisation, on peut recourir à un séquençage de régions spécifiques du génome (ARNr cibles 16S ou 23S).

*Aspects critiques généraux.* Les techniques d'amplification des acides nucléiques comportent de nombreux avantages par rapport aux méthodes classiques de détection des microorganismes :

- elles sont hautement spécifiques, à condition que les amorces choisies soient spécifiques d'un microorganisme ou groupe de microorganismes particulier ;
- les procédures sont rapides et permettent de s'affranchir du problème que pose une incubation prolongée ;
- leur grande sensibilité autorise théoriquement la détection et l'amplification d'un fragment unique d'acide nucléique dans le mélange réactif.

Leur emploi se heurte cependant à de nombreuses restrictions pratiques :

- l'influence très importante sur la sensibilité de l'efficacité atteinte quant à la concentration des fragments cibles dans l'échantillon ;
- la présence d'inhibiteurs du processus enzymatique, qui entraîne l'obtention de réactions faussement négatives ;
- le faible volume de départ de l'échantillon analysé ;
- la sensibilité des procédures à la contamination croisée par des fragments précédemment amplifiés, qui conduit à des résultats faussement positifs.

Selon l'objectif de l'analyse, il faut opter pour l'amplification de cibles ARN ou ADN. Le choix de la cible affecte la corrélation avec la viabilité. L'emploi d'ADN comme marqueur comporte un inconvénient, la rémanence de l'ADN dans les microorganismes morts. L'ARNm rapidement dégradé après la mort des bactéries, est considéré comme un meilleur marqueur de viabilité.

*Aspects critiques de la RT-PCR.* La RT-PCR repose sur la synthèse d'ADNc à partir d'une matrice d'ARN, opérée par une transcriptase inverse. Une partie spécifique de l'ADNc est ensuite amplifiée par PCR. L'efficacité de la synthèse d'ADNc varie selon la qualité de la procédure d'isolement de l'ARN. La RT-PCR peut être utilisée pour la détection spécifique d'ARN si la contamination de l'échantillon d'ARN par de l'ADN est très faible.

*Aspects critiques des techniques d'amplification de l'ARN.* Ces techniques se sont avérées très utiles pour la détection spécifique (quantitative) d'ARN. Elles peuvent néanmoins être d'une mise en oeuvre plus délicate en routine.

*Aspects critiques de la détection (semi-)quantitative (PCR en temps réel).* Les méthodes PCR classiques sont fondées sur une détection au point final. L'analyse des fragments est généralement effectuée à l'aide de gels d'agarose et de marqueurs de taille spécifiques. Il n'existe toutefois pas de corrélation entre la quantité de produit d'amplification obtenue en fin de réaction et la quantité initiale de molécule cible. En revanche, la quantité de produit d'amplification détectée en début de phase exponentielle de la réaction présente une très bonne corrélation avec la quantité initiale d'acide nucléique à amplifier. Des techniques modernes de PCR en temps réel, fondées sur la mesure de cette phase exponentielle de la réaction, sont actuellement développées. Elles génèrent des données d'amplification dont il est possible de déduire la quantité initiale de molécule cible. Une sonde marquée spécifique permet de détecter en temps réel le produit d'amplification formé et ainsi d'obtenir une visualisation directe de la phase exponentielle de la réaction de PCR. Une quantification de la molécule cible est alors possible par comparaison avec les tracés d'amplification obtenus avec une série de dilutions de référence. Des systèmes de PCR en temps réel automatisés sont disponibles sur le marché. Un autre avantage de cette technique est de réduire le risque de contamination croisée, les produits d'amplification étant détectés par balayage laser dans les tubes encore fermés. Toutefois, la génération de préparations de référence est une opération difficile.

*Aspects critiques de l'amplification des gènes codant pour l'ARNr 16S ou 23S.* Une des applications les plus puissantes de la PCR est l'amplification, suivie du séquençage, de régions spécifiques de l'ADN codant pour l'ARNr 16S ou 23S. L'analyse de ces séquences spécifiques permet dans la plupart des cas l'identification d'un microorganisme à l'échelle de l'espèce. La sélection d'amorces universelles appropriées, ou même de paires d'amorces spécifiques de l'espèce, à partir de bases de données internationales, autorise une haute spécificité dans l'amplification des fragments. La systématique moderne repose sur l'analyse comparée des séquences.

*Utilisations potentielles.* Du fait de leur haute spécificité, les techniques d'amplification sont bien adaptées aux identifications. Elles permettent la détection de microorganismes spécifiés ou de certains groupes de microorganismes tels que les mycoplasmes. Pour les dénombrements, il faut faire appel à la PCR quantitative (en temps réel).

2-3-2-2. *Empreinte génétique*

*Principe.* Cette méthode permet de caractériser et d'identifier les microorganismes à l'aide de fragments de restriction des acides nucléiques, à partir de génomes bactériens ou fongiques. Après lyse des cellules d'une colonie pure, l'ADN est extrait du lysat et fragmenté par une enzyme de restriction. Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse en fonction de leur taille, visualisés et comparés à d'autres profils connus d'isolats microbiens. L'empreinte génétique constitue un marqueur stable qui permet une discrimination absolue des espèces, voire une caractérisation au-dessous du niveau de l'espèce. Le ribotypage constitue un exemple type de cette méthode. Il existe également des méthodes d'empreinte génétique faisant appel à la PCR, avec des amorces qui se lient à plusieurs sites du génome microbien et génèrent des amplicons présentant une distribution de taille caractéristique.

*Aspects critiques.* Il est nécessaire de disposer d'une colonie pure mais pas de procéder à une étape de culture préliminaire. Les conditions de croissance (température, type de milieu) n'affectent pas les résultats de l'analyse. Il existe sur le marché des systèmes semi-automatisés destinés à l'identification des bactéries.

*Utilisations potentielles.* Discrimination des souches (caractérisation au-dessous du niveau de l'espèce) plutôt qu'identification des espèces.

## 3. EXIGENCES GÉNÉRALES DE VALIDATION

L'objectif de cette section est de fournir des indications pour la validation des méthodes alternatives pouvant se substituer aux méthodes microbiologiques classiques de la Pharmacopée. Les laboratoires d'analyse microbiologique ont en effet parfois recours pour l'isolement et l'identification des microorganismes à des méthodes alternatives qu'ils utilisent de préférence à celles décrites dans les chapitres généraux, pour des raisons diverses qui peuvent être en rapport avec le coût, la commodité ou la rapidité des analyses. La validation de ces méthodes est exigée et la section 1.1 des Prescriptions générales fournit des indications à cet égard.

La validation des méthodes microbiologiques alternatives doit prendre en compte la variabilité inhérente aux méthodes conventionnelles. Lors d'une analyse microbiologique classique

par dénombrement sur plaque par exemple, l'étendue des résultats observés est souvent plus large que celle que l'on obtient couramment lors des essais chimiques.

Lorsque l'emploi d'un équipement spécifique est crucial pour l'application de la méthode alternative, cet équipement (matériels et logiciels informatiques compris) doit faire l'objet d'une qualification complète sous les aspects suivants :

– qualification de conception, à fournir par le fabricant, apportant la preuve documentée que la conception de l'équipement est compatible avec l'application correcte de la méthode ;
– qualification de l'installation, apportant la preuve documentée que l'équipement a été fourni et installé conformément à ses spécifications ;
– qualification opérationnelle, apportant la preuve documentée que l'équipement installé opère dans des limites préétablies lorsqu'il est utilisé conformément aux procédures opératoires ;
– qualification des performances, apportant la preuve documentée que l'équipement, installé et utilisé conformément aux procédures opératoires, donne de façon constante des performances conformes à des critères préétablis et donc des résultats corrects pour la méthode. Cette qualification s'effectue typiquement au moyen d'un système modèle (utilisant les microorganismes de référence) permettant de s'assurer que les conditions opératoires mises en oeuvre par le laboratoire utilisateur permettent de satisfaire au sein du laboratoire aux critères établis par le développeur de la méthode.

Certaines méthodes alternatives reposent sur l'emploi de bases de données. Il est nécessaire, pour la validation, de prendre en compte le caractère plus ou moins complet de la base de données au regard de la gamme de microorganismes considérée.

La validité de toute méthode nouvelle ou modifiée doit être démontrée par le biais d'une étude comparative de la méthode officielle et de la méthode alternative. Cette comparaison doit être effectuée sur la base des paramètres définis dans la présente section.

3-1. *DIVERS TYPES D'ESSAIS MICROBIOLOGIQUES*

Il est crucial pour le travail de validation d'identifier la partie de l'essai concernée par la méthode alternative. Il existe par exemple un certain nombre de méthodes permettant de détecter la présence de cellules viables. Elles peuvent être mises en oeuvre dans le cadre de divers essais (charge microbiologique, stérilité, etc.), mais ne se substituent pas forcément à la totalité de l'essai dans tous ses aspects critiques. Par exemple, un essai de stérilité par filtration sur membrane peut être effectué par la procédure de la pharmacopée jusqu'au moment où sont réunis le filtre traité et le milieu de croissance. La présence de cellules viables peut alors être démontrée par l'une ou l'autre des méthodes disponibles. La validation d'une telle application porterait sur le système de recouvrement utilisé plutôt que sur l'essai dans son ensemble.

*Critères généraux.* La validation d'une méthode microbiologique est le processus visant à établir expérimentalement que les paramètres de performance de la méthode sont conformes aux exigences attachées à l'application envisagée. Les applications possibles des essais microbiologiques relevant de 3 grands types, elles imposent d'établir 3 ensembles distincts de critères de validation, qui sont décrits ci-après.

3-2. *VALIDATION DES ESSAIS QUALITATIFS ALTERNATIFS (PRÉSENCE/ABSENCE DE MICROORGANISMES)*

3-2-1. **Exactitude et fidélité**

Une méthode directe, pour démontrer l'équivalence de 2 méthodes qualitatives, consisterait à les effectuer côte à côte et à déterminer le degré d'équivalence entre la méthode à évaluer et la méthode de la pharmacopée. L'essai de stérilité pourrait fournir un exemple, où cette approche se traduirait par une comparaison entre les taux de résultats positifs et négatifs respectivement obtenus pour des échantillons identiques avec la méthode alternative et avec la méthode de la pharmacopée. Toutefois, dans un cas tel que celui de l'essai de stérilité, le problème est que des milliers d'essais comparatifs seraient nécessaires pour établir l'équivalence, en raison du faible nombre d'échecs.

Une méthode plus réaliste, pour évaluer la fidélité d'une méthode qualitative alternative par comparaison à une méthode de la pharmacopée, peut être de considérer le degré d'agrément entre les 2 méthodes lorsque les procédures sont appliquées de façon répétée à différents lots du même produit. L'exactitude et la fidélité de la méthode alternative peut être exprimée en termes de proportions relatives de faux négatifs et faux positifs obtenus avec la nouvelle méthode, par rapport à la méthode de la pharmacopée, lorsque l'on utilise un inoculum normalisé de faible concentration.

Le taux d'occurrence de faux négatifs obtenus en présence de l'échantillon avec les 2 méthodes peut être estimé à l'aide de microorganismes de référence présents en faible concentration. Ce dispositif d'essai est similaire à celui utilisé pour l'essai standard de bactériostase/fongistase, mais le nombre de microorganismes inoculés doit être très faible, par exemple de l'ordre de 5 UFC par unité, afin d'assurer une fréquence d'échec suffisamment élevée pour permettre la comparaison des 2 méthodes. La méthode alternative doit assurer une fréquence de recouvrement au moins aussi élevée que la méthode de la pharmacopée.

3-2-2. **Spécificité**

La spécificité d'une méthode qualitative alternative est sa capacité à détecter la gamme voulue de microorganismes potentiellement présents dans l'échantillon examiné. Cet aspect est convenablement couvert par l'essai de fertilité des milieux, pour les méthodes qualitatives utilisant la croissance afin de démontrer la présence/absence de microorganismes. Pour les méthodes qui ne reposent pas sur la croissance comme indicateur d'une présence microbienne, la spécificité assure l'absence d'interférence dans l'essai d'éléments étrangers présents dans le système. Si l'objectif de l'essai le justifie, des mélanges de microorganismes sont utilisés lors de la validation.

3-2-3. **Limite de détection**

La limite de détection d'une méthode qualitative alternative est le plus petit nombre de microorganismes pouvant être détecté dans un échantillon dans les conditions expérimentales décrites. En microbiologie, un essai limite sert à déterminer la présence/absence de microorganismes et la limite de détection se réfère au nombre de microorganismes présents dans l'échantillon initial, avant toute dilution ou incubation, et non au nombre de microorganismes présents au moment de l'essai.

Les 2 méthodes (alternative et pharmacopée) doivent être évaluées au moyen d'un inoculum contenant un faible nombre de microorganismes de référence (par exemple environ 5 UFC par unité), puis mesure du recouvrement. La concentration de l'inoculum doit être ajustée jusqu'à ce qu'au moins 50 pour cent des échantillons manifestent une croissance dans l'essai de la pharmacopée. Il est nécessaire de répéter plusieurs fois cette détermination, car la limite de détection d'un essai est déterminée sur la base d'un nombre approprié de réplicats (par exemple au moins 5). L'aptitude des 2 méthodes à détecter la présence de microorganismes individuels peut être démontrée par le test du $\chi^2$.

3-2-4. **Robustesse**

La robustesse d'une méthode qualitative alternative est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées des paramètres opératoires, et donne une indication de la fiabilité de la méthode dans des conditions d'essai normales, mais variables, telles que différents analystes, instruments, lots de réactifs et laboratoires. Elle peut être définie comme la résistance intrinsèque aux influences exercées sur les résultats de l'essai par les variables opératoires et environnementales. C'est le développeur de la méthode qui

est le mieux à même de déterminer la robustesse, mais, si l'utilisateur apporte des modifications à certains paramètres critiques, leur effet sur la robustesse doit être évalué. La robustesse d'une méthode qualitative est jugée à son aptitude à détecter les microorganismes de référence lorsque l'on fait délibérément varier les paramètres opératoires.

3-3. *VALIDATION DES ESSAIS QUANTITATIFS ALTERNATIFS (DÉNOMBREMENT DES MICROORGANISMES)*

3-3-1. **Exactitude**

L'exactitude d'une méthode quantitative alternative est l'étroitesse de l'accord entre les résultats respectivement obtenus par la méthode alternative et par la méthode de la pharmacopée. L'exactitude doit être établie sur l'intervalle de mesure de l'essai. Elle est généralement exprimée par le pourcentage de recouvrement des microorganismes obtenu avec la méthode.

On peut établir l'exactitude en préparant une suspension de microorganismes à la limite supérieure de l'intervalle de mesure, puis en procédant à des dilutions en série jusqu'à la limite inférieure de l'intervalle de mesure. Si, par exemple, la méthode alternative est destinée à remplacer un dénombrement sur plaque traditionnel des microorganismes viables, un intervalle de mesure raisonnable peut être de $10^0$-$10^6$ UFC/mL. S'il s'agit plutôt de remplacer la méthode NPP, un intervalle beaucoup plus étroit peut être utilisé. Il faut analyser, pour chaque microorganisme de référence, au moins 5 suspensions réparties sur l'intervalle de mesure. Si la méthode alternative est destinée à remplacer une méthode conventionnelle, elle doit fournir une estimation du nombre de microorganismes viables qui ne soit pas inférieure à 70 pour cent de l'estimation obtenue avec la méthode de la pharmacopée.

Le protocole utilisé pour vérifier la linéarité de la méthode (voir 3-3-5.) peut également être utilisé pour vérifier l'exactitude : les suspensions de microorganismes préparées pour la méthode alternative sont dénombrées au même moment par la méthode de la pharmacopée. L'exactitude est établie si les tests de conformité montrent que la pente de la droite de régression n'est pas significativement différente de la valeur 1 et si l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de la valeur 0.

3-3-2. **Fidélité**

La fidélité d'une méthode quantitative alternative est le degré d'agrément obtenu entre les résultats individuels lorsque la procédure est appliquée de façon répétée à des échantillons multiples de suspensions homogènes de microorganismes dans les conditions prescrites. Elle est généralement exprimée en termes de variance, d'écart type ou de coefficient de variation d'une série de résultats de mesure.

La procédure minimale consiste à dénombrer plusieurs fois une suspension de microorganismes de concentration située, en général, au centre de l'intervalle de mesure. Le nombre de réplications est fixé de telle sorte que l'ensemble de l'essai puisse être effectué au cours d'une même session de travail, c'est-à-dire dans les mêmes conditions opératoires et sans modification de la suspension de microorganismes. D'autres sessions de travail sont ensuite conduites dans des conditions de variabilité maximale (réactifs différents, opérateurs différents, jours différents, etc.). La variance des résultats observés lors de chaque session (« groupe ») est calculée. Si les variances sont homogènes, la variance de répétabilité peut être calculée. La variance inter-groupes des résultats est calculée. La variance de fidélité intermédiaire est la somme de la variance de répétabilité et de la variance inter-groupes. Les coefficients de variation sont ensuite calculés. En règle générale, un coefficient de variation de l'ordre de 10-15 pour cent est acceptable. Indépendamment des résultats spécifiques obtenus, la méthode alternative ne doit pas donner un coefficient de variation plus élevé que la méthode de la pharmacopée.

3-3-3. **Spécificité**

La spécificité d'une méthode quantitative alternative est démontrée à l'aide d'une gamme de microorganismes appropriés. Si l'objectif de l'essai le justifie, des mélanges de microorganismes sont utilisés lors de la validation.

3-3-4. **Limite de quantification**

La limite de quantification d'une méthode quantitative alternative est le plus petit nombre de microorganismes pouvant être dénombré avec exactitude. L'obtention d'un échantillon fiable contenant un nombre connu de microorganismes étant impossible, il est indispensable de déterminer la limite de quantification à partir d'un certain nombre de réplicats, par exemple au moins 5. Les résultats des études de linéarité et d'exactitude peuvent également être utilisés. La plus faible concentration de l'intervalle de linéarité est alors considérée comme la limite de quantification de la méthode. Cette valeur ne doit pas être supérieure à la limite de quantification de la méthode de la pharmacopée.

3-3-5. **Linéarité**

La linéarité d'une méthode quantitative alternative est sa capacité à produire, sur un certain intervalle, des résultats proportionnels à la concentration des microorganismes dans l'échantillon. Il convient d'établir la linéarité sur l'intervalle de mesure correspondant à l'objectif de la méthode alternative. On peut à cet effet sélectionner différentes concentrations de chaque microorganisme de référence et effectuer la mesure sur plusieurs réplicats pour chaque concentration. Le nombre de réplicats est fixé de telle sorte que l'ensemble de l'essai puisse être effectué au cours d'une même session de travail. 2 autres sessions de travail sont ensuite conduites dans des conditions de variabilité maximale (réactifs différents, opérateurs différents, jours différents, etc.). Après vérification de l'homogénéité des variances des résultats obtenus pour chaque concentration, on calcule la droite de régression. La linéarité est établie si la pente estimée est significative et si l'écart de linéarité est non significatif.

3-3-6. **Intervalle de mesure**

L'intervalle de mesure d'une méthode quantitative alternative est l'intervalle compris entre la plus faible et la plus élevée des concentrations en microorganismes ayant pu être déterminées avec la fidélité, l'exactitude et la linéarité voulues en appliquant la méthode décrite. L'intervalle de mesure est déduit des études de fidélité, d'exactitude et de linéarité.

3-3-7. **Robustesse**

La robustesse d'une méthode quantitative alternative est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées des paramètres opératoires. Elle donne une indication de la fiabilité de la méthode dans des conditions d'essai normales, mais variables, telles que différents analystes, instruments, lots de réactifs et laboratoires. Elle peut être définie comme la résistance intrinsèque aux influences exercées sur les résultats de l'essai par les variables opératoires et environnementales. C'est le développeur de la méthode qui est le mieux à même de déterminer la robustesse, mais si l'utilisateur apporte des modifications à certains paramètres critiques, leur effet sur la robustesse doit être évalué. La robustesse d'une méthode quantitative est jugée à son aptitude à assurer un dénombrement statistiquement correct des microorganismes de référence lorsque l'on fait délibérément varier les paramètres opératoires.

3-4. *VALIDATION DES ESSAIS D'IDENTIFICATION ALTERNATIFS*

De multiples observations montrent la variabilité considérable des différentes méthodes quant à leur capacité à identifier des microorganismes dans les produits pharmaceutiques. Il faut accepter l'idée qu'une méthode de systématique, si elle doit posséder une cohérence interne, peut différer d'autres méthodes quant à l'identification des isolats. En d'autres termes, l'identification d'un isolat peut ne pas conduire à la même conclusion selon qu'elle est effectuée sur la base de l'activité biochimique, du profil de composition en acides gras, de l'analyse ADN ou d'une autre méthode. Les identifications microbiologiques selon un système particulier dérivent

5. Textes généraux

directement de l'expérience acquise avec ce système et peuvent donc sensiblement différer d'identifications conduites selon un autre système. Il est crucial que chaque système permette une identification cohérente des microorganismes isolés à partir de produits pharmaceutiques.

3-4-1. **Exactitude**

L'exactitude d'une méthode d'identification alternative est sa capacité à identifier le microorganisme étudié au niveau taxonomique requis et à le différencier des autres microorganismes présents dans l'échantillon. Elle doit être démontrée au moyen d'une gamme de microorganismes de référence ou de microorganismes obtenus à partir d'échantillons types et préalablement identifiés par une autre méthode.

3-4-2. **Fidélité**

La fidélité d'une méthode d'identification alternative est le degré d'agrément obtenu entre les résultats individuels lorsque la procédure est appliquée de façon répétée à des échantillons multiples de suspensions de microorganismes de référence couvrant l'intervalle de mesure de l'essai.

3-4-3. **Robustesse**

La robustesse d'une méthode d'identification alternative est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées des paramètres opératoires. Elle donne une indication de la fiabilité de la méthode dans des conditions d'essai normales, mais variables telles que différentes analystes, instruments, lots de réactifs et laboratoires. Elle peut être définie comme la résistance intrinsèque aux influences exercées sur les résultats de l'essai par les variables opératoires et environnementales. C'est le développeur de la méthode qui est le mieux à même de déterminer la robustesse, mais, si l'utilisateur apporte des modifications à certains paramètres critiques, leur effet sur la robustesse doit être évalué. La robustesse d'une méthode d'identification est jugée à son aptitude à assurer de façon constante l'identification des microorganismes de référence lorsque l'on fait délibérément varier les paramètres opératoires.

## 4. EXIGENCES DE VALIDATION SPÉCIFIQUES

### 4-1. *CONTEXTE*

La validation est définie, selon les contextes, de façon quelque peu différente, mais sa définition consensuelle est qu'elle consiste à établir la preuve documentée qu'un processus permettra de réaliser de façon reproductible l'objectif auquel il est destiné. Il est par conséquent essentiel, pour la validation correcte d'une nouvelle méthode, de bien comprendre et définir quel en est l'objectif.

Pour l'application de méthodes microbiologiques conventionnelles ou alternatives, il faut envisager 2 niveaux de validation. La validation primaire d'une méthode est en règle générale réalisée par le développeur de la méthode, tandis que sa validation pour l'usage effectif prévu, qui consiste à vérifier l'adéquation ou l'applicabilité de la méthode dans une situation donnée, relève de la responsabilité de l'utilisateur. Avant la validation pour l'usage effectif prévu, une qualification des performances est effectuée par l'utilisateur comme décrit dans la section 3. *Exigences générales de validation*.

Les méthodes microbiologiques utilisent typiquement certaines caractéristiques spécifiques des microorganismes comme indicateurs ou principes de détection pour répondre à des questions plus générales. Les informations recherchées sont la présence, le nombre, la viabilité, la résistance ou l'identité des microorganismes dans un produit ou un environnement donné.

Une méthode donnée fournira généralement une réponse indirecte et conditionnelle aux questions posées. Par exemple, une indication sur le nombre total et la viabilité des microorganismes est donnée par le nombre de microorganismes capables de se reproduire dans certaines conditions de préparation de l'échantillon, de culture et d'incubation. La reproduction est donc, en microbiologie classique, utilisée comme indicateur général de viabilité. Il existe cependant d'autres paramètres pouvant servir d'indicateurs de viabilité. Le niveau d'ATP, l'accumulation ou la métabolisme de substrats dans les cellules vivantes sont également des indicateurs possibles de viabilité. Les résultats obtenus à partir de différents indicateurs de viabilité ne seront pas toujours identiques. Des microorganismes peuvent être incapables de se reproduire sur un milieu donné, tout en étant capables d'accumuler et métaboliser un substrat. De même, dans un état d'endommagement donné, ils peuvent être incapables d'accumuler un substrat tout en restant capables de se perpétuer et de se reproduire.

Ces considérations s'appliquent également aux méthodes utilisées pour l'identification de microorganismes. La caractérisation du profil métabolique de microorganismes est souvent utilisée pour l'identification des espèces, tandis qu'une autre méthode consiste à comparer des séquences d'ADN. Ici encore, les réponses obtenues avec les différentes méthodes d'identification peuvent ne pas coïncider totalement et une réponse peut être appropriée à la construction d'un arbre de corrélation phylogénétique, tandis qu'une autre sera plus utile dans le contexte de la pathogénicité ou d'autres propriétés des microorganismes différenciés.

4-1-1. **Validation primaire**

Pour caractériser une méthode microbiologique spécifique, il est essentiel que le principe de détection associé soit clairement décrit par le développeur. Tous les détails voulus concernant les conditions d'application de la méthode, les produits et équipements requis et le signal attendu doivent être donnés. Le principe de la méthode doit être décrit dans une publication scientifique reconnue.

Le principe de détection doit être caractérisé dans un système modèle et/ou avec un ensemble de microorganismes de référence, pour les aspects suivants (au minimum) :

– traitement préalable de l'échantillon ou des microorganismes,
– type de réponse,
– spécificité de la réponse,
– limite de détection,
– intervalle de mesure,
– linéarité de la réponse,
– exactitude et fidélité de la réponse,
– robustesse de la méthode dans un système modèle,
– limites d'applicabilité.

Une fois la méthode ainsi caractérisée par le développeur, le principe de détection n'a plus à être vérifié par chaque utilisateur.

4-1-2. **Validation d'une méthode microbiologique alternative**

4-1-2-1. *Analyse risque/bénéfice*

Il est crucial, pour la validation de méthodes microbiologiques alternatives spécifiques, que l'objectif de la procédure soit précisément décrit. Au vu de cet objectif, il faut alors définir le type et le degré de précision des informations requises. Une étude comparative de la méthode conventionnelle et de la méthode alternative, quant aux informations qu'elles apportent et à leurs limites, doit être effectuée dans le cadre d'une analyse risque/bénéfice.

L'application d'une méthode alternative peut être considérée comme justifiée si les informations délivrées apportent une réponse scientifiquement fondée aux questions posées par la procédure et si la méthode n'est pas plus restrictive que la méthode conventionnelle.

4-1-2-2. *Validation pour l'usage effectif prévu*

La méthode alternative doit être appliquée dans le cadre de la procédure en vigueur et avec les échantillons à analyser, sous la responsabilité de l'utilisateur. La démonstration doit être apportée qu'elle fournit des résultats comparables à ceux caractérisés par le développeur dans un système modèle. Les questions spécifiques à poser dans ce contexte sont, par exemple, selon les cas :

– la compatibilité de la réponse avec les modalités de préparation des échantillons associées à l'essai,
– les limites et la plage de détection de la méthode eu égard à la taille et la disponibilité des échantillons,
– la spécificité de la réponse eu égard à l'influence des ingrédients du produit,
– la linéarité de la réponse eu égard à tous les types d'échantillons à analyser,
– l'exactitude et la fidélité de la réponse eu égard à tous les types d'échantillons à analyser,
– la robustesse de la méthode eu égard à tous les types d'échantillons à analyser.

Il sera nécessaire de définir des critères d'acceptation applicables à l'utilisation en routine de la méthode, en fonction de l'application et des données de validation.

4-2. *DÉNOMBREMENT DES MICROORGANISMES PAR BIOLUMINESCENCE*

4-2-1. **Analyse risque/bénéfice**

Comme en attestent des études scientifiques approfondies et des années d'utilisation, la méthode utilisant l'ATP comme marqueur de viabilité est équivalente, quant à la gamme de microorganismes qu'elle permet de détecter, aux méthodes classiques de dénombrement sur plaque. Étant dépendante de la croissance, cette méthode apporte principalement, par rapport aux méthodes classiques, l'avantage d'une plus grande rapidité d'obtention des résultats (24 h pour la bioluminescence, 5 jours pour la culture sur plaque). L'identification des microorganismes détectés par bioluminescence est possible à partir du milieu d'incubation, mais il ne faut pas oublier que, dans une culture mixte, certains microorganismes peuvent supplanter les autres au cours de l'incubation. L'évaluation des échantillons est effectuée dans les 24 h, pour les produits filtrables et non filtrables (eau, contrôles en cours de processus, prélèvements environnementaux, matières premières solides et liquides, produits finis solides et liquides, etc.) ainsi que pour un grand nombre d'échantillons, lorsque l'étape de détection est automatisée.

4-2-2. **Validation pour l'usage effectif prévu**

La méthode repose sur la détection de l'ATP produit par les microorganismes viables. Une qualification des performances est effectuée avec les microorganismes de référence pour s'assurer que les conditions opératoires appliquées par le laboratoire utilisateur permettent de satisfaire aux critères définis par le développeur en matière de fidélité, d'exactitude et de linéarité (méthode quantitative), de limite de détection (méthode qualitative et semi-quantitative) dans l'intervalle de mesure requis pour l'usage prévu. Après cette étape, la validation se poursuit en 3 phases :

– *phase 1* : fertilité du milieu en présence du produit (si une étape d'incubation est réalisée),
– *phase 2* : recherche des interférences pouvant accroître ou inhiber la production d'ATP (par addition d'une solution étalon d'ATP au produit à examiner),
– *phase 3* : étude comparative par rapport à la méthode de la pharmacopée.

Un exemple détaillé de validation d'une méthode de bioluminescence est décrit en fin de chapitre.

4-3. *DÉNOMBREMENT DES MICROORGANISMES PAR CYTOMÉTRIE (EN FLUX ET EN PHASE SOLIDE)*

4-3-1. **Analyse risque/bénéfice**

Comme en attestent des études scientifiques approfondies, cette méthode, qui utilise un fluorophore comme marqueur de viabilité, est supérieure, quant à la gamme de microorganismes qu'elle permet de détecter et/ou de dénombrer, aux méthodes classiques de dénombrement sur plaque. La cytométrie permet en effet de détecter la totalité des microorganismes viables, y compris certains qui peuvent ne pas être décelables par les méthodes fondées sur la croissance. Bien que rapide, le recouvrement post-analyse des microorganismes est limité. La poursuite de l'analyse des échantillons en vue d'une identification nécessite l'emploi d'autres colorants fluorescents ou d'une méthode alternative. Il n'est pas possible, à l'heure actuelle, d'utiliser la cytométrie pour l'identification en routine des microorganismes, bien que leur morphologie générale soit clairement discernable sous un microscope à fluorescence en cytométrie en phase solide. Cette méthode permet une évaluation rapide des échantillons et autorise donc une approche proactive lors de la fabrication, facilitant ainsi l'intégration de la qualité dans les opérations pharmaceutiques. N'étant pas dépendante de la croissance, elle permet la détection de tous les microorganismes ayant une activité métabolique. Toutefois, à l'heure actuelle, la limite de détection de la cytométrie en flux s'oppose, pour la plupart des échantillons pharmaceutiques, à l'application de cette méthode au dénombrement par examen direct. Si une pré-incubation est nécessaire, l'estimation devient semi-quantitative (essai limite).

4-3-2. **Validation pour l'usage effectif prévu**

La cytométrie repose sur la détection d'un signal de fluorescence émis par des microorganismes marqués.

Une qualification des performances est effectuée pour s'assurer que les instruments fonctionnent dans la limite des paramètres opérationnels définis. Ces contrôles font intervenir des étalons fluorescents d'intensité prescrite ainsi que des cultures contenant un type et un nombre connus de microorganismes. Ils permettent de mettre à l'épreuve le système de détection quantitatif. Des réactifs et consommables (témoins négatifs) doivent également être utilisés pour s'assurer de l'applicabilité du protocole d'essai de routine et vérifier que la qualité des matériels utilisés dans l'essai ne fausse pas le résultat final. Des cultures pures de microorganismes de référence sont utilisées à la fois pour mettre à l'épreuve le système de détection et comparer les résultats avec ceux obtenu par dénombrement sur plaque classique. Des réplicats multiples (au moins 5) de cultures incubées pendant 1 nuit, diluées sur un certain intervalle de concentrations (par exemple 100 pour cent, 75 pour cent, 50 pour cent, 25 pour cent, 10 pour cent) doivent être utilisés pour évaluer la linéarité, l'exactitude, la fidélité, l'intervalle de mesure, la spécificité, la limite de quantification (méthode quantitative) et la limite de détection (cytométrie en flux avec pré-incubation). La cytométrie se caractérisant par une sensibilité élevée (la cytométrie en phase solide permet la détection de cellules individuelles et la cytométrie en flux possède une sensibilité de l'ordre de 10-50 cellules par millilitre), et par une détection non fondée sur la croissance, la linéarité de la réponse instrumentale peut être vérifiée par comparaison des résultats effectifs avec la valeur attendue.

Après cette étape, la validation se poursuit en 2 phases : validation par rapport au produit à examiner et essais comparatifs. Les résultats de chaque phase doivent être évalués par rapport à des critères d'acceptation préétablis, en présence de témoins positifs et négatifs :

– *phase 1* : il faut « surcharger » les produits à évaluer par cytométrie avec une quantité définie de microorganismes pour vérifier que le processus de préparation des échantillons et les échantillons eux-mêmes n'affectent pas les performances du système de détection ; une attention particulière doit être portée à l'absence dans la matrice de l'échantillon de facteurs influençant la détection (chromophores endogènes, particules autofluorescentes) et, dans le cas de la cytométrie en flux, la taille/dilution de l'échantillon ainsi que le débit doivent être optimisés ;
– *phase 2* : des essais doivent être réalisés pour comparer les résultats obtenus par cytométrie et par la méthode de la pharmacopée. Le nombre d'échantillons requis et la durée d'essai doivent être définis dans un protocole de comparabilité. Le nombre d'échantillons requis est variable, mais doit être représentatif du processus d'évaluation du produit (temps/nombre) et permettre une évaluation statistique. Tous les échantillons doivent être préparés selon

les procédures définies et évalués par rapport aux critères de validation et d'acceptation choisis, semblables à ceux utilisés pour l'évaluation des cultures pures.

4-4. *IDENTIFICATION PAR ANALYSE DU PROFIL DE COMPOSITION EN ACIDES GRAS*

4-4-1. **Analyse risque/bénéfice**

L'identification par analyse du profil de composition en acides gras peut s'avérer plus précise que les identifications reposant sur des profils métaboliques dans les méthodes de culture conventionnelles. Les bases de données disponibles sont plus étendues. Une pré-incubation est nécessaire, mais l'extraction et l'identification sont plus rapides qu'avec les méthodes biochimiques, ainsi que l'obtention des résultats par conséquent. D'autres méthodes modernes telles que l'analyse des séquences d'ARNr 16S ou l'empreinte génétique présentent un domaine de différenciation aussi large et donnent des résultats aussi rapides que cette méthode.

La discrimination de microorganismes étroitement apparentés (comme *E. coli* et les salmonelles) par analyse des profils de composition en acides gras peut être difficile. Lorsque cette différenciation est particulièrement importante, d'autres systèmes peuvent donner des résultats plus précis. Pour une application donnée, il est important de spécifier les types de microorganismes que l'on cherche absolument à identifier. S'il est crucial de caractériser correctement l'espèce de l'isolat d'un point de vue phylogénétique, les méthodes d'identification d'après la séquence ADN donneront des résultats plus fiables.

Une autre des limitations de l'identification par le biais des profils de composition en acide gras est la nécessité de cultiver les microorganismes sur des milieux standards et dans des conditions standards de température et de durée d'incubation. L'identification des microorganismes ne pouvant pas être cultivés sur ces milieux est impossible.

4-4-2. **Validation pour l'usage effectif prévu**

Il doit être démontré au moyen d'une gamme de microorganismes de référence, avec au moins 3 répétitions dans chaque cas, que la méthode fournit des résultats constants.

L'identification d'un nombre significatif d'isolats obtenus à partir d'échantillons types à analyser par l'utilisateur doit être effectuée au moins 3 fois pour chacun. Les résultats obtenus dans chaque cas doivent être cohérents et conformes aux résultats obtenus par d'autres méthodes d'identification. Si un autre système d'identification donne un résultat différent, la cause doit en être recherchée. Lorsqu'il existe une explication scientifiquement plausible à la reconnaissance d'espèces différentes, l'existence d'une divergence entre les systèmes d'identification peut être acceptable. Dans ce cas, il faut s'assurer que la reconnaissance de l'espèce identifiée est robuste. Il faut également vérifier que le système ne conduit pas au regroupement sous une « espèce » unique d'isolats médiocrement reconnus, donc à l'apparence fallacieuse de l'isolement répétée d'une même espèce.

4-5. *TECHNIQUES D'AMPLIFICATION DES ACIDES NUCLÉIQUES*

4-5-1. **Analyse risque/bénéfice**

Les techniques d'amplification des acides nucléiques sont largement utilisées pour des usages diagnostiques, en raison de leur fidélité et de leur rapidité, auxquelles s'ajoute le coût relativement bas des analyses, sinon des instruments, par rapport aux méthodes traditionnelles. A condition qu'aient été effectuées des validations spécifiques, ces méthodes, correctement utilisées, peuvent comporter par rapport aux méthodes classiques des avantages non négligeables dans certains domaines. Les méthodes classiques, en revanche, sont en général plus faciles à standardiser, nécessitent un moindre niveau de compétences techniques et peuvent avoir un coût moins élevé. En règle générale, même lorsque la mise en oeuvre des techniques d'amplification des acides nucléiques n'est pas plus difficile que celle des méthodes traditionnelles, l'interprétation des résultats requiert un degré supérieur de compétences scientifiques.

Les techniques d'amplification de l'ADN, lorsqu'elles sont utilisées pour l'identification, ne permettent pas de distinguer les microorganismes vivants des microorganismes morts. Il s'ensuit que, pour permettre cette identification, elles ne peuvent pas être utilisées directement sur le produit, mais seulement après passage sur un milieu de culture traditionnel, ce qui leur fait perdre une partie de leur avantage en termes de rapidité. En outre, si elles sont appliquées directement au produit, elles ne permettent pas d'obtenir en fin d'analyse une souche pouvant être utilisée pour des expériences ultérieures, et elles ne peuvent apporter aucun avantage lorsque les microorganismes à détecter sont difficilement cultivables ou en état de stress. Les techniques d'amplification de l'ARN (par exemple la RT-PCR) permettent l'identification directe dans le produit des microorganismes vivants (mais pas des spores), mais sont beaucoup plus difficiles à utiliser en routine que les méthodes traditionnelles. En revanche, lorsque des amorces spécifiques sont utilisées, les méthodes recourant à l'amplification des acides nucléiques permettent une identification (ou typage) plus précise que les méthodes traditionnelles et comportent parfois d'autres avantages encore. Par exemple, pour l'identification de certains vaccins (vaccin cholérique, vaccin coquelucheux à cellules entières), elles peuvent se substituer à l'emploi de sérums spécifiques et contribuer à réduire l'utilisation d'animaux ou, pour d'autres vaccins (BCG), elles peuvent permettre une identification très spécifique, jusqu'alors impossible.

Ces méthodes sont en général non quantitatives (PCR) ou semi-quantitatives (PCR en temps réel). Leurs résultats ne peuvent donc pas être comparés à ceux des dénombrements de colonies, pour lesquels un dénombrement exact des microorganismes présents dans l'échantillon est exigé. Toutefois, malgré la valeur avérée des dénombrements de colonies, ce dogme ne se vérifie pas réellement dans le cas des bactéries qui présentent une tendance à l'agglomération (mycobactéries) ou à l'organisation en chaînes ou agrégats (streptocoques, staphylocoques). Une standardisation précise des méthodes semi-quantitatives peut alors donner des résultats de fiabilité comparable.

4-5-2. **Validation pour l'usage effectif prévu**

La méthode est validée conformément aux dispositions du chapitre *2.6.21*. La comparaison des méthodes conventionnelles et des méthodes basées sur la PCR, qui présentent d'importantes différences de sensibilité et de spécificité, est particulièrement difficile et peut conduire à des conclusions divergentes.

*L'exemple suivant est publié à titre d'information, non pour application générale.*

## Exemple de validation d'une méthode alternative : protocole détaillé suivi par un laboratoire pour la mise en oeuvre de la bioluminescence

CONTEXTE

Les méthodes comportant une étape de pré-incubation en milieu liquide (bioluminescence en tube ou sur plaque de microtitrage) n'apportent pas d'informations quantitatives, mais permettent de déterminer une présence/absence dans la quantité de produit analysée. Si l'on opère sur plusieurs quantités différentes d'échantillon, le système peut permettre une détermination semi-quantitative (essai limite). Par exemple, la quantité de produit classiquement examinée pour le dénombrement des germes aérobies viables totaux dans des produits non stériles est de 0,1 g ou 0,1 mL, et permet de conclure à l'absence de germes dans 0,1 g ou 0,1 mL ; un résultat négatif correspond donc à un nombre de microorganismes inférieur à 10 dans 1 g ou 1 mL, et un résultat positif à un nombre de microorganismes supérieur ou égal à 10 dans 1 g ou 1 mL. Si l'on examine

simultanément une quantité de 0,01 g ou 0,01 mL, un résultat négatif correspond à un nombre de microorganismes inférieur à 100 dans 1 g ou 1 mL. La combinaison d'un résultat négatif pour 0,01 g ou 0,01 mL et d'un résultat positif pour 0,1 g ou 0,1 mL donne une estimation du niveau de contamination du produit, qui est inférieur à 100 microorganismes mais supérieur ou égal à 10 microorganismes par gramme ou par millilitre.

Comme indiqué dans la section 2, la bioluminescence peut être utilisée comme méthode quantitative si les microorganismes sont retenus sur une membrane filtrante puis incubés sur un milieu de culture (bioluminescence sur membrane).

Le protocole décrit ci-après concerne la validation de méthodes de bioluminescence qualitatives, semi-quantitatives et quantitatives.

## QUALIFICATION DES PERFORMANCES DE LA MÉTHODE ALTERNATIVE

### Spécificité

Procéder à une évaluation préalable de la méthode avec des microorganismes de référence appropriés. Par exemple, pour le dénombrement des germes aérobies viables totaux dans des produits non stériles, il faut au minimum utiliser les microorganismes spécifiés dans le chapitre *2.6.12* pour vérifier la fertilité des milieux en présence du produit. Effectuer cette détermination au moins 3 fois pour chaque microorganisme. Critère d'acceptation : tous les microorganismes de référence sont détectés.

### Limite de détection (méthodes semi-quantitative et qualitative uniquement)

Préparer un petit inoculum (environ 5 UFC dans l'échantillon initial) de chaque microorganisme de référence. Effectuer l'analyse avec au moins 5 réplications par la méthode de la pharmacopée et par la méthode de bioluminescence considérée. Critère d'acceptation : aptitude des 2 méthodes à détecter la présence d'un microorganisme isolé, qui peut être établie par le test du $\chi^2$. Procédure alternative : préparer pour chaque microorganisme de référence des séries de dilutions comportant plusieurs dilutions qui donnent autour de 5 UFC par inoculum (par exemple 10 UFC/inoculum, 5 UFC/inoculum, 2,5 UFC/inoculum, 1,25 UFC/inoculum, 0,75 UFC/inoculum). Effectuer l'essai sur 5 séries indépendantes par la méthode de la pharmacopée et par la méthode de bioluminescence. Déterminer la limite de détection pour chaque méthode. Elle correspond à la dernière dilution pour laquelle un résultat positif est obtenu dans les 5 séries. Critère d'acceptation : la limite de détection de la méthode de bioluminescence est inférieure ou égale à celle de la méthode de la pharmacopée.

### Limite de quantification (méthode quantitative)

Elle peut être déterminée en même temps que la linéarité. Elle correspond à la concentration la plus basse de l'intervalle de mesure choisi qui satisfait aux critères de linéarité, d'exactitude et de fidélité. Critère d'acceptation : la limite de quantification de la méthode de bioluminescence est inférieure ou égale à celle de la méthode de la pharmacopée.

### Fidélité

*Evaluations quantitatives.* Pour chaque microorganisme de référence, effectuer avec au moins 5 répétitions l'analyse d'une même série comportant au moins la concentration en microorganismes qui correspond au centre de l'intervalle. Effectuer 3 essais indépendants. Procéder à une analyse statistique pour comparer la fidélité des deux méthodes ou calculer le coefficient de variation (CV). Critère d'acceptation : CV de 15 pour cent à 30 pour cent, ou pas de différence de fidélité (au risque alpha 5 pour cent) entre les 2 méthodes. Si la fidélité est différente, la méthode de bioluminescence est supérieure à la méthode de la pharmacopée si elle donne un écart type moins élevé.

*Evaluations qualitatives ou semi-quantitatives.* Utiliser la procédure alternative décrite pour l'établissement de la limite de détection et comparer les pourcentages de résultats positifs obtenus avec la méthode de bioluminescence et la méthode de la pharmacopée. Critère d'acceptation : le pourcentage de résultats positifs obtenus à la limite de détection avec la méthode de bioluminescence est de 100 pour cent et il est supérieur ou égal à celui obtenu avec la méthode de la pharmacopée.

### Linéarité

Pour chaque microorganisme de référence, préparer 5 concentrations comprises dans l'intervalle de mesure (normalement indiqué par le développeur) de la méthode de bioluminescence. Effectuer l'essai en parallèle par la méthode de la pharmacopée et la méthode de bioluminescence. Répéter 2 autres fois cet essai pour obtenir les résultats de 3 essais indépendants. Effectuer des tests de régression linéaire, de pente, et d'absence d'ajustement par le test F (au risque alpha 5 pour cent). Si une analyse statistique n'est pas possible, calculer pour les 2 méthodes le coefficient de corrélation $R^2$ et la pente. Critère d'acceptation : l'analyse statistique permet d'établir la régression linéaire, l'existence d'une pente et la non absence d'ajustement au risque 5 pour cent ; l'équation $y = a + bx$ est déterminée, $b$ étant la pente et $a$ l'ordonnée à l'origine. En l'absence d'analyse statistique, $R^2$ doit être égal ou supérieur à 0,9 et la pente ne doit pas s'écarter de plus de 20 pour cent de la valeur 1 ($b$ compris entre 0,8 et 1,2). Si la linéarité n'est pas démontrée sur tout l'intervalle, celui-ci peut être réduit et la linéarité démontrée avec seulement 3 concentrations au lieu de 5.

### Exactitude

*Evaluations quantitatives.* L'exactitude peut être déterminée à partir des valeurs obtenues pour la linéarité. Pour chaque microorganisme, utiliser 3 à 5 concentrations comprises dans l'intervalle de linéarité de la méthode. Effectuer une analyse statistique (test $t$ de Student au risque 5 pour cent) pour vérifier la conformité de la pente estimée (valeur = 1) par rapport à la pente obtenue, et celle de l'ordonnée à l'origine estimée (valeur = 0) par rapport à l'ordonnée obtenue. Par exemple, pour une pente estimée $b$ d'écart type $s_{(b)}$ égal à 0,090 pour 5 concentrations en microorganismes, calculer $t = (b - 1)/s_{(b)}$ ; pour une ordonnée à l'origine $a$ d'écart type $s_{(a)}$, calculer $t = (a - 0)/s_{(a)}$. Comparer ces valeurs à la valeur $t$ de Student à 5 pour cent, pour 13 degrés de liberté (3 essais, 5 concentrations). Critère d'acceptation : si les valeurs $t$ obtenues sont inférieures aux valeurs $t$ de Student, la méthode est exacte sur l'intervalle considéré. Dans les cas de non conformité de la pente (valeur différente de 1) ou de l'ordonnée à l'origine (valeur différente de 0), la méthode n'est pas exacte sur l'intervalle considéré.

*Evaluations qualitatives ou semi-quantitatives.* Utiliser la procédure alternative décrite pour l'établissement de la limite de détection. Calculer le pourcentage de faux négatifs pour la méthode de bioluminescence et pour la méthode de la pharmacopée sur l'ensemble des dilutions examinées. Comparer les pourcentages de faux négatifs obtenus pour les 2 ou 3 concentrations en microorganismes immédiatement inférieures à la limite de détection (par exemple 5 UFC/inoculum ou 2,5 UFC/inoculum ou 1,25 UFC/inoculum) donnant un résultat positif. La limite de détection correspond par définition à 0 pour cent de faux négatifs. Critère d'acceptation : le pourcentage de faux négatifs obtenu avec la méthode de bioluminescence aux concentrations inférieures à la limite de détection est inférieur ou égal à celui obtenu avec la méthode de la pharmacopée.

### Intervalle de mesure

Il s'agit de l'intervalle compris entre la plus basse et la plus haute des concentrations en microorganismes pour lesquelles la linéarité, la fidélité et l'exactitude sont vérifiées.

### Robustesse

Cette information est fournie par le fabricant.

VALIDATION POUR L'USAGE EFFECTIF PRÉVU

Dans l'exemple considéré ici, il n'est pas nécessaire de déterminer l'exactitude et la limite de détection en présence du produit. La validation comporte 3 phases, permettant de vérifier :

– *phase 1* : la fertilité du milieu en présence du produit,
– *phase 2* : l'absence d'interférence du produit susceptible d'augmenter ou réduire la production d'ATP,
– *phase 3* : l'examen du produit en parallèle avec la méthode de la pharmacopée.

Ces 3 phases de la validation sont effectuées sur 3 essais indépendants en utilisant, par exemple, au moins 2 lots différents du produit.

**Phase 1 : fertilité du milieu en présence du produit**

Si le produit présente un niveau de contamination connu élevé (plus de 500 microorganismes par gramme ou par millilitre), l'étape d'incubation est inutile et les microorganismes peuvent être détectés directement. Dans ce cas, le contrôle de fertilité du milieu en présence du produit n'est pas nécessaire. Toutefois, le niveau de contamination des produits pharmaceutiques est généralement beaucoup plus faible et la croissance des microorganismes est nécessaire pour permettre une détection par bioluminescence. Il faut par conséquent démontrer que le produit n'inhibe pas la croissance des microorganismes dans les conditions de l'essai. A cette fin, ajouter séparément un inoculum d'au maximum 100 UFC de chaque microorganisme de référence à une portion du milieu contenant le produit. Pour la bioluminescence en tube ou sur plaque de microtitrage, effectuer l'essai de bioluminescence. Pour la bioluminescence sur membrane, incubez à 30-35 °C ou 20-25 °C pendant 5 jours, puis décomptez les colonies bioluminescentes présentes sur la membrane. Critère d'acceptation : l'essai est positif (bioluminescence en tube ou sur plaque de microtitrage) ; le recouvrement des microorganismes est supérieur ou égal à 70 pour cent (bioluminescence sur membrane).

**Phase 2 : absence d'interférence du produit**

L'objectif est de démontrer que le produit n'introduit pas de lumière parasite ou d'ATP non microbien (n'induit pas de résultat faussement positif : critère A), ou n'affaiblit pas la détection d'ATP (n'induit pas de résultat faussement négatif : critère B).

*Bioluminescence en tube ou sur plaque de microtitrage*

A. Effectuer l'essai de bioluminescence sur le milieu de culture seul et sur le milieu de culture en présence du produit, et déterminer les valeurs ULR correspondantes.
B. Effectuer l'essai de bioluminescence sur le milieu de culture seul et sur le milieu de culture en présence d'ATP et déterminer le coefficient de réponse à la concentration d'ATP, en pourcentage.

Critères d'acceptation :

– *critère A* : la valeur obtenue en présence du produit est inférieure à 2 fois la valeur obtenue avec le milieu de culture seul (si le critère A n'est pas satisfait, il est nécessaire de déterminer un seuil spécifique pour ce produit),
– *critère B* : la valeur obtenue en présence du produit et d'ATP est comprise entre 25 pour cent et 200 pour cent de la valeur obtenue en présence d'ATP.

*Bioluminescence sur membrane*

Effectuer l'intégralité de l'essai de bioluminescence pour la recherche d'interférences. Critère d'acceptation : le recouvrement des microorganismes est supérieur ou égal à 70 pour cent et inférieur ou égal à 200 pour cent.

**Phase 3 : examen du produit en parallèle avec la méthode de la pharmacopée**

Examiner en parallèle le produit considéré par la méthode de bioluminescence validée et par la méthode de la pharmacopée, pour établir la corrélation entre les 2 méthodes pour le produit considéré, en effectuant 3 essais indépendants sur au moins 2 lots différents. Exprimer le résultat comme positif ou négatif dans une quantité donnée de produit (bioluminescence en tube ou sur plaque de microtitrage) ou en nombre de microorganismes par quantité de produit filtrée (bioluminescence sur membrane). Critère d'acceptation : les résultats sont corrélés avec ceux de la méthode de la pharmacopée.

**01/2008:50107**

# 5.1.7. SÉCURITÉ VIRALE

Ce chapitre contient des exigences générales concernant la sécurité virale des médicaments dont la fabrication a impliqué l'utilisation de matières d'origine humaine ou animale. La sécurité virale constituant une question complexe, il est important de procéder à une évaluation du risque. Les exigences s'appliquant à un médicament spécifique sont du ressort de l'Autorité compétente.

En cas de risque de contamination virale, des mesures complémentaires sont prises, selon le cas, pour garantir la sécurité virale des médicaments, sur la base de :

– la sélection des matières sources et la recherche de contaminants viraux,
– le contrôle de la capacité du procédé de production à éliminer et/ou inactiver les virus,
– la recherche d'une contamination virale aux étapes de production appropriées.

Dans les cas appropriés, une ou plusieurs procédures validées d'élimination ou d'inactivation des virus sont appliquées.

Des recommandations supplémentaires détaillées sur la sécurité virale, comprenant les études de validation, sont fournies, en particulier, par la *Note explicative relative aux études de validation virologique : planification, contribution et interprétation des études validant l'inactivation et l'élimination des virus (CPMP/BWP/268/95)* du Comité des Spécialités Pharmaceutiques et le *Guideline ICH Q5A sur l'évaluation de la sécurité virale des produits issus de la biotechnologie et dérivés de lignées cellulaires d'origine humaine ou animale* (ainsi que les révisions ultérieures de ces documents).

Les exigences concernant les produits immunologiques pour usage vétérinaire figurent dans les monographies *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)* et *Immunosérums pour usage vétérinaire (0030)* et les chapitres généraux associés.

**Evaluation du risque**

Une évaluation du risque virologique est effectuée si des matières d'origine humaine ou animale sont utilisées comme ingrédients de médicaments ou lors de la fabrication de substances actives, d'excipients ou de médicaments.

Le principe de l'évaluation du risque est de considérer divers facteurs pouvant influencer le niveau potentiel de particules infectieuses dans le médicament ainsi que des facteurs liés à l'utilisation du médicament déterminant ou influençant le risque viral pour les individus traités.

L'évaluation du risque prend en considération des facteurs pertinents, par exemple :

– espèce d'origine,
– organe, tissu, fluide d'origine,
– contaminants potentiels au vu de l'origine de la matière première et des antécédents du (des) donneur(s) avec, de préférence, des données épidémiologiques,
– contaminants potentiels issus du procédé de fabrication (provenant, par exemple, de matières à risque utilisées lors de la fabrication),
– infectiosité et pathogénicité des contaminants potentiels pour les individus auxquels le médicament est destiné, en tenant compte de la voie d'administration du médicament,
– quantité de matière utilisée pour produire une dose de médicament,

– contrôles effectués sur le (les) donneur(s), sur la matière première, en cours de production et sur le produit final,
– procédé de fabrication du produit et capacité de celui-ci à éliminer et/ou inactiver les virus.

L'évaluation du risque peut principalement être fondée sur les conditions de fabrication si celles-ci incluent des étapes d'inactivation rigoureuses (par exemple, pour la gélatine etc. et les produits faisant l'objet d'une stérilisation terminale par la vapeur ou la chaleur sèche, comme décrit dans les textes généraux sur la stérilité (*5.1*)).

**04/2010:50108**

## 5.1.8. QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE DES MÉDICAMENTS À BASE DE PLANTES POUR USAGE ORAL

*Ce chapitre présente les critères d'acceptation recommandés en matière de qualité microbiologique pour les médicaments à base de plantes.*

La présence de certains microorganismes dans des préparations non stériles peut réduire, voire annuler, l'activité thérapeutique du produit et constitue un danger potentiel pour la santé du patient. Les fabricants sont donc tenus d'assurer une faible charge microbienne (biocharge) dans les formes pharmaceutiques finies, par la mise en oeuvre des textes en vigueur sur les BPF au cours de la fabrication, de la conservation et de la distribution des préparations pharmaceutiques.

Le contrôle microbiologique des produits non stériles est réalisé selon les méthodes décrites dans les chapitres généraux *2.6.12*, *2.6.13* et *2.6.31*. Des critères d'acceptation applicables aux produits pharmaceutiques non stériles, fondés sur le dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT) et des moisissures/levures totales (DMLT), sont donnés ci-après.

Ces critères d'acceptation reposent sur des résultats individuels ou sur des résultats moyens lorsque l'on effectue plusieurs dénombrements (réplicats), par exemple pour les dénombrements sur plaques.

Une liste de microorganismes spécifiés pour lesquels sont établis des critères d'acceptation est donnée ci-après. Cette liste n'est pas forcément exhaustive et la recherche d'autres microorganismes peut être nécessaire pour une préparation donnée, selon la nature de la matière de départ et le procédé de fabrication utilisés.

**A. Médicaments à base de plantes contenant des drogues végétales, avec ou sans excipients, qui sont destinés à la préparation d'infusions ou décoctions avec de l'eau bouillante (exemple : tisanes avec ou sans aromatisants)**

| | |
|---|---|
| DGAT (*2.6.12*) | Critère d'acceptation : $10^7$ UFC/g<br>Nombre maximum admissible : 50 000 000 UFC/g |
| DMLT (*2.6.12*) | Critère d'acceptation : $10^5$ UFC/g<br>Nombre maximum admissible : 500 000 UFC/g |
| *Escherichia coli* (*2.6.31*) | Critère d'acceptation : $10^3$ UFC/g |
| Salmonelles (*2.6.31*) | Absence (25 g) |

**B. Médicaments à base de plantes contenant, par exemple, des extraits et/ou des drogues végétales, avec ou sans excipients, dont le procédé de production (par exemple par extraction) ou le cas échéant, dans le cas des drogues végétales, de prétraitement permet de réduire le nombre de microorganismes présents jusqu'à un niveau inférieur aux critères spécifiés pour la catégorie**

| | |
|---|---|
| DGAT (*2.6.12*) | Critère d'acceptation : $10^4$ UFC/g ou UFC/mL<br>Nombre maximum admissible : 50 000 UFC/g ou UFC/mL |
| DMLT (*2.6.12*) | Critère d'acceptation : $10^2$ UFC/g ou UFC/mL<br>Nombre maximum admissible : 500 UFC/g ou UFC/mL |
| Bactéries gram-négatives résistantes aux sels biliaires (*2.6.31*) | Critère d'acceptation : $10^2$ UFC/g ou UFC/mL |
| *Escherichia coli* (*2.6.31*) | Absence (1 g ou 1 mL) |
| Salmonelles (*2.6.31*) | Absence (25 g ou 25 mL) |

**C. Médicaments à base de plantes contenant, par exemple, des extraits et/ou des drogues végétales, avec ou sans excipients, dont il peut être démontré que le procédé de production (par exemple par extraction à l'éthanol de faible concentration ou à l'eau non bouillante, ou par concentration à basse température) ou, dans le cas des drogues végétales, de prétraitement ne permet pas de réduire suffisamment le nombre de microorganismes présents pour satisfaire aux critères spécifiés pour la catégorie B**

| | |
|---|---|
| DGAT (*2.6.12*) | Critère d'acceptation : $10^5$ UFC/g ou UFC/mL<br>Nombre maximum admissible : 500 000 UFC/g ou UFC/mL |
| DMLT (*2.6.12*) | Critère d'acceptation : $10^4$ UFC/g ou UFC/mL<br>Nombre maximum admissible : 50 000 UFC/g ou UFC/mL |
| Bactéries gram-négatives résistantes aux sels biliaires (*2.6.31*) | Critère d'acceptation : $10^4$ UFC/g ou UFC/mL |
| *Escherichia coli* (*2.6.31*) | Absence (1 g ou 1 mL) |
| Salmonelles (*2.6.31*) | Absence (25 g ou 25 mL) |

*Il est admis que, pour certains médicaments à base de plantes, les critères indiqués ci-dessus sous A, B, C pour le DGAT, le DMLT et les bactéries gram-négatives résistantes aux sels biliaires sont impossibles à satisfaire en raison du niveau usuel de contamination microbienne. Des critères d'acceptation plus élevés peuvent alors être appliqués sur la base d'une évaluation du risque prenant en compte la caractérisation qualitative et quantitative de la biocharge et l'usage auquel est destiné le médicament considéré.*

S'il a été démontré qu'aucune des recherches prescrites ne permet un dénombrement valide des microorganismes au niveau spécifié, une méthode validée ayant une limite de détection aussi proche que possible du critère d'acceptation indiqué est utilisée.

**01/2009:50109**

## 5.1.9. INDICATIONS SUR L'APPLICATION DE L'ESSAI DE STÉRILITÉ

L'objectif de l'essai de stérilité (*2.6.1*), comme celui de tout essai de la Pharmacopée, est d'apporter à un analyste-contrôleur indépendant les moyens de vérifier qu'un produit particulier répond aux exigences de la Pharmacopée Européenne. Un fabricant n'est pas tenu d'effectuer l'essai, pas plus qu'il ne lui est interdit d'appliquer des variantes de la méthode spécifiée ou des méthodes alternatives à condition qu'il ait établi que le produit en question, s'il était contrôlé par la méthode officielle, satisferait aux exigences de la Pharmacopée Européenne.

PRÉCAUTIONS CONCERNANT LA CONTAMINATION MICROBIENNE

Les conditions aseptiques requises pour effectuer l'essai de stérilité peuvent être réalisées, par exemple, sous une hotte à flux laminaire de classe A située dans une salle propre de classe B ou dans un isolateur.

INDICATIONS À L'INTENTION DES FABRICANTS

Le niveau d'assurance qu'apporte, quant à la qualité globale du lot, l'obtention d'un résultat satisfaisant à l'essai de stérilité (absence d'unités contaminées dans l'échantillon contrôlé) est fonction de l'homogénéité du lot, des conditions de fabrication et de l'efficacité du plan d'échantillonnage adopté. C'est pourquoi, pour les besoins du présent texte, le lot est défini comme un ensemble homogène de récipients scellés préparés de telle sorte que le risque de contamination soit le même pour chacune des unités composantes.

Dans le cas des produits faisant l'objet d'une stérilisation terminale, l'assurance qu'apportent des preuves physiques, biologiquement fondées et enregistrées automatiquement, démontrant que le traitement de stérilisation a été correctement appliqué à l'ensemble du lot, est supérieure à celle qu'apporte l'essai de stérilité. Les circonstances dans lesquelles il est admis de recourir à la libération paramétrique sont décrites dans le chapitre *5.1.1. Méthodes de préparation des produits stériles*. La simulation avec des témoins-milieux peut être utilisée pour évaluer l'asepsie d'un procédé de fabrication. Ceci mis à part, l'essai de stérilité reste la seule méthode analytique qui convient aux produits préparés dans des conditions aseptiques ; il constitue par ailleurs, dans tous les cas, la seule méthode analytique à disposition des autorités amenées à contrôler la stérilité d'un échantillon du produit.

La probabilité de détecter des microorganismes par l'essai de stérilité augmente avec leur nombre dans l'échantillon contrôlé et varie selon la capacité de croissance des espèces microbiennes présentes. La probabilité de détection d'une très faible contamination même uniformément répartie au sein du lot est très réduite. L'interprétation des résultats de l'essai de stérilité repose sur l'hypothèse que tous les récipients constituant le lot donneraient le même résultat si leur contenu était contrôlé. Comme il est à l'évidence impossible de contrôler chacun des récipients, il convient d'appliquer un plan d'échantillonnage approprié. Dans le cas de la production dans des conditions aseptiques, il est recommandé d'examiner des échantillons répartis en récipients en début et en fin de lot et après toute intervention significative.

OBSERVATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les techniques microbiologiques/biochimiques conventionnelles sont généralement satisfaisantes pour l'identification des microorganismes isolés lors de l'essai de stérilité. Néanmoins, si un fabricant souhaite utiliser la condition (d) comme critère unique d'invalidation d'un essai de stérilité, il peut être nécessaire de recourir à des techniques de typage sensibles pour démontrer qu'un microorganisme isolé à partir du produit examiné est identique à un microorganisme isolé à partir du matériel et/ou de l'environnement d'essai. En effet, si les techniques microbiologiques/biochimiques d'identification de routine permettent d'établir la non-identité de 2 isolats, elles ne sont pas toujours suffisamment sensibles ou fiables pour apporter la preuve absolue que 2 isolats proviennent de la même source. Il peut être nécessaire de recourir à des méthodes plus sensibles, par exemple un typage moléculaire basé sur le pourcentage d'homologie ARN/ADN, pour établir la parenté clonale et l'origine commune des microorganismes.

**01/2010:50110**

# 5.1.10. RECOMMANDATIONS POUR LA RÉALISATION DE L'ESSAI DES ENDOTOXINES BACTÉRIENNES

## 1. INTRODUCTION

Les endotoxines issues de bactéries gram-négatives sont les principales responsables des effets toxiques attribués à la contamination de produits pharmaceutiques par des pyrogènes. Leur activité pyrogène est beaucoup plus élevée que celle de la plupart des autres substances pyrogènes. Ces endotoxines sont des lipopolysaccharides. Malgré l'existence de quelques pyrogènes ayant une structure chimique différente, il est souvent justifié d'interpréter l'absence d'endotoxines bactériennes dans un produit comme équivalant à l'absence de pyrogènes, à condition que l'éventualité de la présence de pyrogènes autres que des endotoxines puisse être exclue.

La présence d'endotoxines dans un produit peut être masquée par l'existence de facteurs interférant dans la réaction entre les endotoxines et le lysat d'amoebocytes. L'analyste qui souhaite remplacer l'essai des pyrogènes sur lapin prescrit dans une monographie de la Pharmacopée par un essai des endotoxines bactériennes doit donc démontrer que celui-ci peut être réalisé de façon satisfaisante sur le produit considéré. Ceci peut nécessiter l'élimination des facteurs d'interférence, par une méthode appropriée.

Comme indiqué dans l'essai des endotoxines bactériennes (*2.6.14*), il faut disposer d'informations sur les 2 aspects suivants pour que l'essai réalisé sur un échantillon puisse être considéré comme valable.

– L'aptitude à l'emploi du matériel utilisé pour l'essai doit être établie. Il faut s'assurer de l'absence d'endotoxines dans l'eau EEB et dans les autres réactifs utilisés, et vérifier la sensibilité du lysat d'amoebocytes afin de confirmer la valeur déclarée par le fabricant.
– Comme le produit à examiner peut interférer dans l'essai, on détermine la sensibilité du lysat d'amoebocytes en présence et en l'absence du produit à examiner ; il ne doit pas exister de différence significative entre les 2 valeurs de sensibilité obtenues.

Le texte *2.6.14. Essai des endotoxines bactériennes* indique des procédés permettant d'éliminer les facteurs d'interférence. Si une interférence est détectée, le contrôle doit être répété après mise en oeuvre de ces procédés pour s'assurer que les facteurs d'interférence ont effectivement été neutralisés ou éliminés.

Ce chapitre général expose en premier lieu les fondements des exigences spécifiées dans l'essai des endotoxines bactériennes, puis traite de la lecture et de l'interprétation des résultats.

Lorsque l'essai des pyrogènes sur lapin est prescrit dans une monographie de la Pharmacopée, son remplacement par un essai sur lysat d'amoebocytes constitue un cas de recours à une méthode alternative, et nécessite par conséquent une validation ; des recommandations sur la procédure à suivre sont données à la section 11.

Lorsqu'une monographie prescrit un essai des endotoxines bactériennes en indiquant la méthode à employer, c'est la méthode spécifiée dans la monographie qui a statut de méthode de référence ; si aucune méthode n'est spécifiée, c'est la méthode de gélification A qui constitue la méthode de référence pour le produit considéré. Si au lieu de la méthode de référence, un analyste souhaite utiliser l'une des autres méthodes, il est tenu de démontrer que cette méthode est appropriée pour le produit et qu'elle donne un résultat conforme à celui obtenu par la méthode de référence (voir également la section 13).

## 2. MÉTHODE

L'addition d'endotoxines à un lysat d'amoebocytes peut provoquer une turbidité, une précipitation ou une gélification. Seule la méthode de gélification était auparavant utilisée comme critère d'évaluation dans l'essai des endotoxines bactériennes de la Pharmacopée. L'avantage de cette méthode est sa simplicité, la décision de déclarer le résultat de l'essai positif ou négatif reposant sur la présence ou de l'absence de gélification, visible à l'oeil nu. Les méthodes quantitatives (C, D, E et F) ont été développées ultérieurement ; elles nécessitent davantage d'instrumentation, mais sont plus faciles à automatiser pour le contrôle de routine de grands nombres d'échantillons d'un même produit.

Les endotoxines peuvent être adsorbées à la surface des tubes ou pipettes constitués de certains types de plastique ou de verre. Il peut également y avoir interférence avec des substances relarguées par les matières plastiques. Il convient donc de

vérifier le matériel utilisé. La constitution des tubes ou pipettes pouvant varier légèrement d'un lot à l'autre, il est conseillé de répéter ces contrôles chaque fois qu'un nouveau lot de matériel est utilisé.

La décision d'utiliser l'essai des endotoxines bactériennes sous forme d'essai limite implique premièrement qu'il faut définir une teneur limite en endotoxines pour le produit à examiner, et deuxièmement que l'objectif de l'essai est de déterminer si la teneur en endotoxines du produit est inférieure ou supérieure à la limite définie. Les méthodes quantitatives C, D, E et F permettent de déterminer la teneur en endotoxines de l'échantillon examiné mais, pour la conformité à la Pharmacopée et les contrôles de routine, la question finale est de savoir si cette teneur dépasse ou non une limite définie.

Pour fixer la teneur limite en endotoxines du produit à examiner, il convient de tenir compte de la posologie de ce produit. Il convient en effet d'assurer que, tant que la teneur en endotoxines du produit reste inférieure à la limite définie, même la dose horaire maximale, administrée par la voie spécifiée, ne contient pas une quantité d'endotoxines suffisante pour entraîner un effet toxique.

Lorsque la teneur en endotoxines du produit est exactement égale à la limite, il y a gélification, tout comme si la teneur en endotoxines était sensiblement plus élevée, et le résultat de l'essai est considéré comme positif car, comme il s'agit d'un essai tout ou rien, il est impossible de différencier une concentration exactement égale à la limite d'une concentration supérieure. Ce n'est qu'en l'absence de gélification qu'il est possible de conclure que la teneur en endotoxines est inférieure à la limite définie.

Pour les produits à l'état solide, la teneur limite en endotoxines par unité de masse ou par Unité Internationale (UI) de produit doit être convertie en concentration par millilitre de solution à examiner, puisque l'essai ne peut être effectué que sur une solution. Le cas des produits existant déjà à l'état liquide (par exemple les préparations liquides pour perfusion) est envisagé plus loin.

*Limite en endotoxines* : la limite en endotoxines d'une substance active administrée par voie parentérale, définie sur une base posologique, est égale à :

$$\frac{K}{M}$$

$K$ = dose seuil d'endotoxines ayant un effet pyrogène, par kilogramme de masse corporelle,

$M$ = dose maximale recommandée pour le produit, en bolus, par kilogramme de masse corporelle.

Lorsque le produit est destiné à être administré par injections rapprochées ou en perfusion continue, $M$ est la dose maximale totale par heure.

La limite en endotoxines est fonction du produit et de sa voie d'administration. Elle est indiquée dans la monographie. Des valeurs de $K$ sont proposées dans le tableau 5.1.10.-1.

Tableau 5.1.10.-1

| Voie d'administration | *K* (UI d'endotoxines par kilogramme de masse corporelle) |
|---|---|
| Intraveineuse | 5,0 |
| Intraveineuse, produits radiopharmaceutiques | 2,5 |
| Intrarachidienne | 0,2 |

Pour les autres voies, le critère d'acceptation pour la teneur en endotoxines bactériennes est généralement établi à partir des résultats obtenus durant le développement de la préparation.

Quelle dilution du produit utiliser dans l'essai pour pouvoir établir, avec un niveau d'assurance maximal, qu'un résultat négatif signifie que la teneur en endotoxines du produit est inférieure à la limite en endotoxines, et qu'un résultat positif signifie que le lysat a réagi à une concentration d'endotoxines au moins égale à la limite en endotoxines ? Cette dilution dépend à la fois de la limite en endotoxines et de la sensibilité du lysat : elle est appelée dilution maximale significative (DMS) et peut être calculée d'après l'expression suivante :

$$\frac{\text{limite en endotoxines} \times \text{concentration de la solution à examiner}}{\lambda}$$

*Concentration de la solution à examiner* :

- mg/mL si la limite en endotoxines est spécifiée par rapport à la masse (UI/mg),
- Unités/mL si la limite en endotoxines est spécifiée par rapport à l'unité d'activité biologique (UI/Unité),
- ml/mL si la limite en endotoxines est spécifiée par rapport au volume (UI/mL).

$\lambda$ = pour la technique de gélification, sensibilité déclarée du lysat (UI/mL) ; pour les techniques turbidimétrique et colorimétrique, concentration la plus basse utilisée sur la courbe d'étalonnage.

Lorsque la dilution maximale significative ne correspond pas à un nombre entier, il est admis, pour les contrôles de routine, d'utiliser un nombre entier commode inférieur à la DMS (autrement dit, de préparer une solution du produit moins diluée que ne l'indique la DMS). Dans ce cas, un résultat d'essai négatif indique que la teneur en endotoxines du produit est inférieure à la limite spécifiée. En revanche, le résultat de l'essai peut être positif si la concentration en endotoxines du produit, bien qu'inférieure à la limite en endotoxines, est suffisamment élevée pour que la réaction avec le lysat entraîne la gélification. Il convient donc, lorsqu'un essai ainsi conduit avec un facteur de dilution « commode » a donné un résultat positif, de diluer le produit à la DMS et de répéter l'essai. En cas de doute ou de litige, il faut également utiliser la DMS.

Ceci souligne l'importance de la confirmation de la sensibilité du lysat.

**Exemple**

Soit un essai portant sur une solution de phénytoïne sodique à 50 mg/mL, à injecter par voie intraveineuse. Il s'agit de déterminer la DMS, étant donné la valeur prise par les variables suivantes :

$M$ = dose humaine maximale = 15 mg par kilogramme de masse corporelle,

$c$ = 50 mg/mL,

$K$ = 5 UI d'endotoxines par kilogramme de masse corporelle,

$\lambda$ = 0,4 UI d'endotoxines par millilitre.

$$\text{DMS} = \frac{5 \times 50}{15} \times \frac{1}{0,4} = 41,67$$

Pour les analyses de routine de ce produit, il peut être plus pratique de prélever 1 mL de solution à examiner et de compléter à 20 mL (DMS/2 arrondie au nombre entier immédiatement inférieur). Toutefois, si l'essai donne un résultat positif, il faudra compléter 1 mL de solution à 41,67 mL et répéter l'essai. Il faudra également préparer une dilution au 1/41,67 si l'essai est effectué pour régler un litige.

## 3. PRÉPARATION DE RÉFÉRENCE

L'*étalon d'endotoxine PBR* a été établi comme préparation de référence. Il a été titré par rapport à l'étalon international d'endotoxine de l'OMS, et son activité est exprimée en Unités Internationales d'endotoxine par ampoule. L'Unité Internationale d'endotoxine est définie comme l'activité spécifique d'une masse donnée de l'étalon international.

Pour les essais de routine, il est admis d'utiliser une autre préparation d'endotoxines, à condition qu'elle ait été étalonnée par rapport à l'étalon international d'endotoxine ou à la PBR, et que son activité soit exprimée en Unités Internationales d'endotoxine.

*NOTE : 1 Unité Internationale (UI) d'endotoxine équivaut à 1 Unité d'Endotoxine (U.E.).*

4. EAU EEB

La vérification de l'absence d'endotoxines bactériennes dans ce réactif par une technique dérivée de l'essai des pyrogènes sur lapin a été rejetée pour des raisons pratiques et théoriques :

- l'essai sur lapin n'est pas suffisamment sensible pour permettre la détection des endotoxines dans de l'eau EEB destinée aux essais sur des produits pour lesquels la limite en endotoxines est très faible,
- la fidélité relativement médiocre de la réponse (élévation de température) chez le lapin rendrait nécessaire la réalisation de nombreuses répétitions de l'essai,
- les termes « pyrogènes » et « endotoxines » se rapportent à des groupes d'entités qui ne coïncident pas exactement.

Il est indiqué dans le texte *2.6.14. Essai des endotoxines bactériennes* que des méthodes autres que la triple distillation peuvent être utilisées pour préparer l'eau EEB. L'osmose inverse a été employée avec de bons résultats. Certains analystes peuvent préférer procéder à plus de 3 distillations. Toutefois, quelle que soit la méthode utilisée, le produit résultant doit être exempt d'endotoxines détectables.

5. pH DU MÉLANGE

Dans l'essai des endotoxines bactériennes, la gélification est optimale lorsque le mélange a un pH de 6,0-8,0. Toutefois, l'addition du lysat à l'échantillon peut conduire à une baisse du pH.

6. VALIDATION DU LYSAT

Il est important de préparer les solutions du lysat suivant les instructions du fabricant.

Pour les méthodes de gélification A et B, les facteurs de dilution extrêmes donnant un résultat positif sont convertis en logarithmes. En effet, si l'on trace la courbe de distribution de fréquence des valeurs logarithmiques, elle est beaucoup plus proche d'une courbe normale que la distribution de fréquence des facteurs de dilution eux-mêmes, et même si proche qu'il est acceptable d'utiliser une loi normale comme modèle mathématique et de calculer les limites de confiance à l'aide du test $t$ de Student.

7. RECHERCHE PRÉLIMINAIRE DES FACTEURS D'INTERFÉRENCE

Certains produits ne peuvent pas être directement soumis à l'essai des endotoxines parce qu'ils ne sont pas miscibles avec les réactifs, que leur pH ne peut pas être ajusté à 6,0-8,0, ou qu'ils inhibent ou activent la gélification. Dans ce cas, il est nécessaire d'effectuer une recherche préliminaire des facteurs d'interférence. Une fois ceux-ci mis en évidence, il faut démontrer l'efficacité de la méthode employée pour les éliminer.

L'objectif de cette recherche préliminaire est de tester l'hypothèse nulle, qui est que la sensibilité du lysat en présence du produit à examiner ne diffère pas significativement de la sensibilité du lysat en l'absence du produit. Les méthodes A et B utilisent à cet effet un critère simple : l'hypothèse nulle est acceptée lorsque la sensibilité du lysat en présence du produit n'est pas inférieure à 0,5 fois ni supérieure à 2 fois la sensibilité du lysat seul.

L'approche classique aurait été de déterminer la sensibilité du lysat en présence et en l'absence du produit, en calculant dans chaque cas la moyenne des logarithmes du facteur de dilution, et d'appliquer le test $t$ de Student à la différence entre les 2 moyennes.

La recherche des facteurs d'interférence, dans les essais de gélification A et B, exige l'emploi d'un échantillon ne contenant pas d'endotoxines détectables. Ceci pose un problème théorique lorsqu'il s'agit de contrôler un produit entièrement nouveau. Une approche différente a donc été adoptée pour les méthodes quantitatives C, D, E et F.

8. ÉLIMINATION DES FACTEURS D'INTERFÉRENCE

Les procédés employés pour éliminer les facteurs d'interférence ne doivent entraîner ni augmentation ni diminution (par exemple par adsorption) de la teneur en endotoxines du produit à examiner. Le meilleur moyen de vérifier que cette condition est satisfaite est d'appliquer ces procédés à un échantillon « dopé », c'est-à-dire auquel a été ajoutée une quantité connue d'endotoxines, puis de mesurer le recouvrement des endotoxines.

*Méthodes C et D.* Si la nature du produit à analyser présente une interférence ne pouvant être éliminée par les moyens classiques, il est possible d'établir la courbe d'étalonnage avec le même type de produit rendu exempt d'endotoxines par un traitement approprié ou par dilution du produit. L'essai des endotoxines bactériennes est alors réalisé par rapport à cette courbe d'étalonnage.

L'ultrafiltration sur membrane filtrante asymétrique en triacétate de cellulose s'est avérée appropriée dans la plupart des cas. Elle nécessite toutefois une validation convenable des filtres, car la présence de dérivés de la cellulose (β-D-glucanes) peut dans certaines circonstances conduire à l'obtention de résultats faussement positifs.

Les filtres en polysulfone se sont avérés inadéquats, certains utilisateurs ayant obtenu des résultats faussement positifs.

9. RÔLE DES TÉMOINS

Le rôle du témoin composé d'eau EEB et de la préparation de référence d'endotoxine à concentration double de la sensibilité déclarée du lysat est de permettre de vérifier l'activité du lysat au moment et dans les conditions de l'essai. Le rôle du témoin négatif est de permettre de vérifier l'absence d'endotoxines à concentration détectable dans l'eau EEB.

Le témoin positif qui contient le produit à examiner à la concentration utilisée dans l'essai sert à démontrer l'absence de facteurs d'inhibition au moment et dans les conditions de l'essai.

10. LECTURE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Il peut arriver que de très faibles quantités d'endotoxines, présentes dans l'eau EEB ou dans tout autre réactif ou matériel auquel le lysat est exposé au cours de l'essai, ne soient pas détectées si elles sont inférieures à la limite de sensibilité du lysat. Elles peuvent cependant s'ajouter aux endotoxines présentes dans la solution du produit à examiner de sorte que la quantité totale d'endotoxines présentes devient juste supérieure à la limite de sensibilité et que l'essai donne un résultat positif.

Il est possible de réduire ce risque en contrôlant l'eau EEB et les autres réactifs et matériels utilisés avec le lysat le plus sensible dont on dispose, ou tout au moins avec un lysat plus sensible que celui utilisé pour l'essai du produit. Même ainsi, toutefois, le risque d'obtenir un résultat « faussement positif » n'est pas totalement éliminé. Il faut cependant souligner que le plan d'essai donne toutes garanties de sécurité, à l'inverse d'un plan d'essai qui permettrait l'obtention d'un résultat faussement négatif et conduirait ainsi à la libération d'un produit présentant un risque pour la santé des patients.

11. REMPLACEMENT DE L'ESSAI DES PYROGÈNES SUR LAPIN PAR L'ESSAI DES ENDOTOXINES BACTÉRIENNES

Les monographies des produits pharmaceutiques pour administration parentérale susceptibles de contenir des endotoxines bactériennes à doses toxiques doivent subir soit l'essai des pyrogènes sur lapin soit l'essai des endotoxines bactériennes. D'une manière générale :

- lorsqu'une monographie prescrit la réalisation d'un essai, elle n'en spécifie qu'un seul, celui des endotoxines bactériennes ou celui des pyrogènes ;
- sauf preuve du contraire, l'essai des endotoxines bactériennes est à utiliser de préférence à celui des pyrogènes, car il est en règle générale considéré comme garant pour le patient d'une protection équivalente ou supérieure ;
- pour introduire un essai des endotoxines bactériennes dans une monographie, il faut avoir la preuve qu'un des essais décrits dans le chapitre *2.6.14* peut être appliqué, avec des résultats satisfaisants, au produit considéré ;
- les informations requises sont à rechercher auprès des fabricants ; les firmes sont invitées à fournir toutes les données de validation dont elles disposent concernant l'applicabilité de l'essai des endotoxines bactériennes aux substances et formulations considérées ; ces données comprennent notamment la description détaillée du mode de préparation des échantillons et de toute procédure nécessaire pour éliminer les facteurs d'interférence ; de plus, il convient de fournir les données parallèles éventuellement disponibles sur l'essai des pyrogènes qui peuvent contribuer à établir que le remplacement de l'essai des pyrogènes sur lapin par celui des endotoxines bactériennes est approprié.

Des exigences complémentaires sont définies dans les sections qui suivent.

## 12. UTILISATION D'UN ESSAI DES ENDOTOXINES BACTÉRIENNES AUTRE QUE CELUI PRESCRIT DANS LA MONOGRAPHIE

Lorsqu'un essai des endotoxines bactériennes est prescrit mais que la monographie ne spécifie pas laquelle des 6 méthodes (A à F) décrites dans le chapitre *2.6.14* est à utiliser, ceci signifie que la méthode A (essai limite de gélification) a été validée pour le produit considéré. Si l'emploi de l'une des autres méthodes (B à F) est prescrit, c'est cette méthode qui a été validée pour le produit en question.

## 13. VALIDATION DE MÉTHODES ALTERNATIVES

Le remplacement de l'essai des pyrogènes sur lapin par un essai des endotoxines bactériennes ou le remplacement de la méthode prescrite (explicitement ou implicitement) pour l'essai des endotoxines bactériennes par une autre méthode, est à considérer comme une méthode alternative pouvant se substituer à un essai de pharmacopée sous les conditions décrites dans les Prescriptions générales :

> « Les essais et dosages décrits sont les méthodes officielles à partir desquelles sont établies les normes de la Pharmacopée Européenne. D'autres méthodes d'analyse peuvent être utilisées à des fins de contrôle avec l'accord de l'Autorité compétente, à condition que les méthodes permettent de juger, sans équivoque, que les normes des monographies seraient satisfaites si les méthodes officielles étaient appliquées. En cas de doute ou de litige, seules font autorité les méthodes d'analyse de la Pharmacopée Européenne »

Pour valider une autre méthode de recherche des endotoxines que celle explicitement ou implicitement spécifiée dans la monographie, il est proposé d'appliquer les procédures suivantes.

13-1. Validation de la méthode d'essai et des matériels et réactifs utilisés, comme décrit pour l'essai concerné.

13-2. Mise en évidence des facteurs d'interférence éventuels (et si nécessaire validation du procédé d'élimination employé) sur des échantillons provenant de 3 lots de fabrication au moins. Il est à noter que les méthodes D et E, qui utilisent un peptide chromogène, nécessitent l'emploi de réactifs absents des méthodes A, B, C et F ; l'extrapolation à la méthode D ou E des résultats obtenus pour les méthodes A, B, C ou F quant à l'absence de facteurs d'interférence n'est donc pas admissible sans la réalisation d'essais supplémentaires.

## 14. VALIDATION DE L'ESSAI POUR DE NOUVEAUX PRODUITS

Il convient d'appliquer les procédures décrites sous 13-1 et 13-2 à tout nouveau produit pour administration parentérale qui doit faire l'objet d'un essai de détection des endotoxines bactériennes comme prescrit dans la Pharmacopée.

# 5.2. TEXTES GÉNÉRAUX SUR LES PRODUITS BIOLOGIQUES

# 5.2. TEXTES GÉNÉRAUX SUR LES PRODUITS BIOLOGIQUES

**01/2008:50201**
**corrigé 6.0**

## 5.2.1. TERMINOLOGIE UTILISÉE DANS LES MONOGRAPHIES SUR LES PRODUITS BIOLOGIQUES

**Système de lot de semence**. Dans un système de lot de semence, les lots successifs d'un produit sont dérivés du même lot de semence primaire. Un lot de semence de travail est préparé à partir du lot de semence primaire en vue de la production de routine. L'origine et l'historique des passages du lot de semence primaire et du lot de semence de travail sont enregistrés.

**Lot de semence primaire**. Une culture d'un microorganisme répartie à partir d'un vrac unique en récipients traités ensemble en une seule opération et de manière à assurer l'uniformité et la stabilité et à prévenir la contamination. Un lot de semence primaire sous forme liquide est normalement conservé à une température égale ou inférieure à – 70 °C. Un lot de semence primaire cryodesséché est conservé à une température reconnue pour assurer sa stabilité.

**Lot de semence de travail**. Une culture d'un microorganisme dérivée du lot de semence primaire et destinée à être utilisée dans la production. Les lots de semence de travail sont répartis en récipients et conservés de la même manière que celle décrite pour les lots de semence primaires.

**Système de banque de cellules**. Dans un système de banque de cellules, les lots successifs d'un produit sont fabriqués par culture dans des cellules dérivées de la même banque de cellules primaire. Un certain nombre de récipients de la banque de cellules primaire est utilisé pour préparer une banque de cellules de travail. Le système de banque de cellules est validé au niveau de passage le plus élevé qui est atteint pendant la production de routine.

**Banque de cellules primaire**. Une culture de cellules répartie en récipients en une seule opération, traitée et conservée de manière à prévenir la contamination et à assurer l'uniformité et la stabilité. Une banque de cellules primaire est habituellement conservée à une température égale ou inférieure à – 70 °C.

**Banque de cellules de travail**. Une culture de cellules dérivée de la banque de cellules primaire et destinée à être utilisée dans la préparation de cultures cellulaires de production. La banque de cellules de travail est répartie en récipients, traitée et conservée comme il est décrit ci-dessus pour la banque de cellules primaire.

**Cultures de cellules primaires**. Cultures de cellules obtenues par trypsination d'un organe ou tissu approprié. Les cellules sont essentiellement identiques à celles du tissu animal d'origine et sont à un stade de production inférieur à 5 passages *in vitro* depuis la préparation initiale obtenue à partir du tissu animal.

**Lignées cellulaires**. Cultures de cellules ayant une capacité élevée de multiplication *in vitro*. Dans les lignées de cellules diploïdes, les cellules ont essentiellement les mêmes caractéristiques que les cellules du tissu animal d'origine. Dans les lignées cellulaires continues, les cellules peuvent se multiplier en culture de façon illimitée. Elles peuvent avoir pour origine un tissu sain ou un tissu tumoral. Certaines lignées cellulaires continues peuvent présenter une activité tumorigène potentielle dans certaines conditions.

**Culture cellulaire de production**. Une culture de cellules dérivée d'un ou de plusieurs récipients de la banque de cellules de travail ou une culture de cellules primaires et destinée à être utilisée dans la production.

**Cellules témoins**. Une quantité de cellules réservées, au moment de l'inoculation du virus, comme cultures cellulaires témoins non inoculées. Les cultures sont mises en incubation dans des conditions comparables à celles employées pour les cultures cellulaires de production.

**Récolte unique**. Le produit dérivé en une ou plusieurs occasions d'une seule culture cellulaire de production inoculée avec le même lot de semence de travail ou avec une suspension dérivée de ce lot, mise en incubation, et récoltée en une seule opération de production.

**Mélange de récoltes monovalent**. Un mélange de récoltes contenant une seule souche ou type de microorganisme ou d'antigène et dérivée d'oeufs, de récipients de cultures cellulaires etc. traités en même temps.

**Vrac final**. Produit qui a subi toutes les étapes de fabrication à l'exclusion du conditionnement final. Il est constitué par un ou plusieurs mélanges de récoltes monovalents, provenant de cultures d'une ou de plusieurs espèces ou types de microorganismes, après éventuellement clarification, dilution ou addition d'adjuvant ou d'autre substance auxiliaire ou autres opérations. Il est traité de façon à assurer son homogénéité et est utilisé pour le remplissage des récipients d'un ou de plusieurs lot finals.

**Lot final**. Un ensemble de récipients définitifs, fermés, ou d'autres unités posologiques, dont on peut s'attendre qu'il soit homogène notamment vis-à-vis du risque de contamination pendant le remplissage ou la préparation du produit fini. Les unités posologiques sont remplies, ou préparées de toute autre manière, à partir du même vrac final, cryodesséchées ensemble, le cas échéant, et fermées dans une seule session continue de travail. Elles portent un nombre ou un code distinctif qui identifie le lot final. Si le vrac final est réparti ou cryodesséché en plusieurs sessions de travail distinctes, il en résulte plusieurs lots finals (parfois appelés sous-lots ou lots de répartition) dont la parenté est habituellement indiquée par une partie commune dans le nombre ou le code distinctif.

**Vaccin combiné**. Une préparation ayant plusieurs composants et formulée de telle façon que plusieurs antigènes sont administrés simultanément. Les différents composants antigéniques sont destinés à protéger contre différents types ou souches d'un même organisme ou contre différentes espèces d'organismes. Un vaccin combiné peut être présenté par le fabricant soit sous forme d'une préparation unique liquide ou cryodesséchée soit sous la forme de plusieurs constituants accompagnés des indications nécessaires pour le mélange avant emploi.

**07/2010:50202**

## 5.2.2. ÉLEVAGES DE POULETS EXEMPTS DE MICROORGANISMES PATHOGÈNES SPÉCIFIÉS POUR LA PRODUCTION ET LE CONTRÔLE DE QUALITÉ DES VACCINS

Dans certains cas spécifiés, les poulets, embryons ou cultures cellulaires utilisés pour la production ou le contrôle de qualité des vaccins doivent être obtenus à partir d'oeufs produits dans un élevage de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS). Le statut EOPS d'un élevage est assuré au moyen du système décrit ci-après. La liste des microorganismes spécifiés repose sur les connaissances actuelles, et sera si nécessaire mise à jour.

Un élevage est défini comme un groupe d'oiseaux partageant un environnement commun et ayant son propre éleveur qui n'a aucun contact avec des élevages non EOPS. Une fois l'élevage défini, aucun oiseau non EOPS n'y est introduit.

Chaque élevage est placé dans des conditions permettant de réduire autant que possible les risques de contamination. Les locaux dans lesquels est installé l'élevage sont situés à

5. Textes généraux

distance de tout élevage d'oiseaux non EOPS à l'exception d'élevages engagés dans le processus de qualification comme EOPS et placés dans des locaux et des conditions adaptés aux élevages EOPS. L'élevage EOPS est installé soit dans un isolateur, soit dans un local ventilé en surpression avec de l'air filtré. Des mesures appropriées sont prises pour empêcher l'entrée de rongeurs, d'oiseaux sauvages et d'insectes et pour interdire l'accès au personnel non autorisé.

Le personnel autorisé à pénétrer dans les installations ne doit avoir aucun contact avec d'autres oiseaux ou avec des agents potentiellement capables d'infecter l'élevage. Il est recommandé au personnel de se doucher et de changer de vêtements ou de porter des vêtements protecteurs avant de pénétrer dans l'installation contrôlée.

Dans la mesure du possible, les produits introduits dans l'installation sont stérilisés. Il est notamment recommandé de faire subir aux aliments un traitement approprié afin d'éviter l'introduction de microorganismes indésirables, et d'utiliser de l'eau de qualité au moins équivalente à celle de l'eau potable, par exemple provenant d'un réservoir chloré. Aucun médicament susceptible d'interférer avec la détection des maladies n'est administré aux animaux de l'élevage.

Un registre permanent de la santé générale de l'élevage est tenu et toute anomalie fait l'objet d'une investigation. Les facteurs à surveiller comprennent la morbidité, la mortalité, l'état physique général, l'alimentation, la production quotidienne d'oeufs ainsi que la qualité, la fertilité et l'éclosabilité des oeufs. Les registres sont conservés pendant une durée d'au moins 5 ans. Tout écart constaté par rapport à la normale quant aux paramètres de performance cités ou toute infection détectée font l'objet d'un signalement détaillé aux utilisateurs des oeufs, dans les plus brefs délais.

Les essais ou combinaisons d'essais décrits ci-après doivent avoir une spécificité et une sensibilité convenables en ce qui concerne les sérotypes des virus appropriés. Les échantillons pour l'essai sont pris de façon aléatoire.

Un résultat positif dans l'essai du virus de l'anémie du poulet (CAV) ne disqualifie pas nécessairement l'élevage. Toutefois, les vaccins vivants préparés à l'aide de substrats provenant d'élevages EOPS et devant être administrés à des oiseaux de moins de 7 jours, seront préparés sur des substrats provenant d'élevages exempts du CAV. Les vaccins inactivés administrés à des oiseaux de moins de 7 jours peuvent être fabriqués à partir de matériel provenant d'élevages dont il n'a pas été prouvé qu'ils sont exempts du CAV, à condition qu'il ait été démontré que le procédé d'inactivation appliqué est efficace sur le CAV.

ÉTABLISSEMENT D'UN ÉLEVAGE EOPS

Un élevage qualifié comme EOPS provient de poulets dont on a démontré qu'ils sont exempts des agents pathogènes à transmission verticale dont la liste figure dans le tableau 5.2.2.-1. A cet effet, des essais sont effectués sur les 2 générations précédant celle dont provient l'élevage à qualifier. La procédure à suivre pour établir et maintenir un élevage EOPS est résumée dans le tableau 5.2.2.-2. Pour établir un élevage EOPS, une série d'essais sur 3 générations d'oiseaux doit être effectuée. Tous les oiseaux de la 1ère génération doivent subir au moins une fois avant l'âge de 20 semaines des essais établissant l'absence de l'antigène de groupe de la leucose aviaire ainsi que des essais

Tableau 5.2.2.-1

| Agent infectieux | Méthode à utiliser** | Transmission verticale | Diffusion rapide/lente |
|---|---|---|---|
| Adénovirus aviaires, groupe 1 | AGP, EIA | oui | lente |
| Virus de l'encéphalomyélite aviaire | AGP, EIA | oui | rapide |
| Virus de la bronchite infectieuse aviaire | HI, EIA | non | rapide |
| Virus de la laryngotrachéite infectieuse aviaire | SN, EIA | non | lente |
| Virus de la leucose aviaire | EIA pour le virus, SN, EIA pour les anticorps | oui | lente |
| Virus de la néphrite aviaire | IS | non | lente |
| Orthoréovirus aviaires | IS, EIA | oui | lente |
| Virus de la réticuloendothéliose aviaire | AGP, IS, EIA | oui | lente |
| Virus de l'anémie du poulet | IS, EIA, SN | oui | lente |
| Virus du syndrome de la chute de ponte | HI, EIA | oui | lente |
| Virus de la bursite infectieuse aviaire | Sérotype 1 : AGP, EIA, SN<br>Sérotype 2 : SN | non | rapide |
| Virus de la grippe de type A | AGP, EIA, HI | non | rapide |
| Virus de la maladie de Marek | AGP | non | rapide |
| Virus de la maladie de Newcastle | HI, EIA | non | rapide |
| Virus de la rhinotrachéite du dindon | EIA | non | lente |
| *Mycoplasma gallisepticum* | Agg et HI pour confirmer un résultat positif, EIA, HI | oui | lente |
| *Mycoplasma synoviae* | Agg et HI pour confirmer un résultat positif, EIA, HI | oui | rapide |
| *Salmonella pullorum* | Agg | oui | lente |

Agg : agglutination

AGP : précipitation sur gélose ; cette technique est appropriée si les essais sont effectués de façon hebdomadaire

EIA : dosage immunoenzymatique

HI : inhibition de l'hémagglutination

IS : immunomarquage

SN : séroneutralisation

**Sous réserve d'autorisation de l'Autorité compétente, on peut utiliser d'autres types d'essai à condition d'avoir démontré qu'ils possèdent une sensibilité au moins égale à celle des méthodes citées et une spécificité appropriée.

démontrant, par dosage immunoenzymatique (EIA) ou par séroneutralisation (SN), l'absence d'anticorps dirigés contre les virus des sous-types A, B et J de la leucose aviaire. De plus, l'absence d'anticorps dirigés contre les agents pathogènes à transmission verticale dont la liste figure dans le tableau 5.2.2-1 doit être établie. Les oiseaux de l'élevage sont contrôlés à partir de l'âge de 8 semaines pour l'absence de salmonelles. L'examen clinique des oiseaux de l'élevage à partir de l'âge de 8 semaines ne doit montrer aucun signe de maladie infectieuse. Les méthodes à utiliser pour ces essais sont fournies dans le tableau et des explications supplémentaires sont également données ci-après dans la section relative aux contrôles de routine des élevages classés EOPS. Quand les oiseaux atteignent l'âge de 20 semaines, l'élevage est contrôlé comme décrit sous Contrôles de routine des élevages classés EOPS. Toutes les étapes de ce régime de contrôle sont appliquées aux 2 générations suivantes, à l'exception des essais de recherche d'agents pathogènes à transmission verticale effectués sur chaque oiseau avant la ponte. Tous les résultats d'essais doivent indiquer une absence d'agents pathogènes dans les 3 générations pour que l'élevage constitué de la 3e génération puisse être qualifié comme EOPS.

Il est admis d'introduire dans l'élevage des embryons EOPS issus d'un autre élevage classé EOPS et placés dans une installation séparée du même site. A partir de l'âge de 8 semaines, ces oiseaux de remplacement sont considérés comme un élevage et soumis aux contrôles décrits ci-dessus.

## CONTRÔLES INITIAUX À RÉALISER SUR LES NOUVELLES GÉNÉRATIONS ISSUES D'UN ÉLEVAGE CLASSÉ EOPS

Lorsqu'un élevage de remplacement est exclusivement issu d'un élevage EOPS complètement établi, la nouvelle génération est soumise à des essais avant d'être classée EOPS. En plus de la recherche des salmonelles et de la surveillance de l'état général de santé et des critères de performance de l'élevage, des essais spécifiques complémentaires sont requis à partir de l'âge de 8 semaines. Ces essais sont effectués sur 2 populations échantillons représentant chacune 5 pour cent de l'élevage (au minimum 10 et au maximum 200 oiseaux), respectivement prélevées avec un intervalle d'au moins 4 semaines entre les âges de 12-16 semaines et 16-20 semaines.

Tous les échantillons sont collectés et examinés individuellement. Des échantillons sanguins sont prélevés pour les recherches d'anticorps, ainsi que des échantillons appropriés pour la recherche de l'antigène de la leucose aviaire. Les méthodes d'essai à utiliser sont celles décrites sous Contrôles de routine des élevages classés EOPS. La nouvelle génération est classée EOPS si et seulement si tous les essais ont confirmé l'absence d'infection.

## CONTRÔLES DE ROUTINE DES ÉLEVAGES CLASSÉS EOPS

*Examen général et nécropsique.* Un examen clinique est effectué au moins 1 fois par semaine pendant toute la durée de vie de l'élevage, pour vérifier que les oiseaux sont indemnes du virus de la variole aviaire et exempts de tout autre signe d'infection. En cas de mortalité supérieure à 0,2 pour cent par semaine, un examen nécropsique est effectué sur toutes les carcasses disponibles pour vérifier l'absence de signes d'infection. Dans les cas appropriés, des analyses histopathologiques et/ou microbiologiques/virologiques sont réalisées pour confirmer le diagnostic. Une recherche spécifique des lésions de type tuberculeux est effectuée, et toute lésion suspectée donne lieu au prélèvement d'échantillons histologiques qui font l'objet de colorations spécifiques visant à vérifier l'absence de contamination par *Mycobacterium avium*. L'absence de *Salmonella* spp. dans le contenu cæcal de toutes les carcasses disponibles est vérifiée par examen microbiologique, à l'aide des techniques décrites ci-après. Dans les cas appropriés, les échantillons cæcaux de plusieurs oiseaux (au maximum 5) peuvent être mélangés.

*Recherche de Salmonella spp. en culture.* Une recherche de *Salmonella* spp. est effectuée soit à partir d'échantillons de fiente ou d'écouvillons cloacaux, soit à partir de prélèvements obtenus au moyen de chiffonnettes. Dans le cas d'essais effectués à partir de fiente ou d'écouvillons cloacaux, il convient d'examiner un total de 60 échantillons par période de 4 semaines pendant toute la durée de vie de l'élevage. Les essais peuvent être effectués sur des mélanges d'échantillons (au maximum 10). Dans le cas de prélèvements sur chiffonnettes, il convient d'examiner au minimum 2 chiffonnettes par période de 4 semaines pendant toute la durée de vie de l'élevage. La détection des salmonelles est effectuée par pré-enrichissement des échantillons, puis culture sur milieu sélectif.

*Recherche de l'antigène de la leucose aviaire.* Avant le début de la ponte, des examens sont effectués à partir d'écouvillons cloacaux, ou de prélèvements sanguins (par culture de la couche leucocytaire) pour détecter la présence de l'antigène spécifique de chaque groupe de la leucose. Ces examens portent sur 5 pour cent de l'élevage (au minimum 10 et au maximum 200 oiseaux) par période de 4 semaines. En cours de ponte, les examens sont réalisés sur des échantillons d'albumen de 5 pour cent (au minimum 10 et au maximum 200) des oeufs



Tableau 5.2.2.-2. – *Représentation schématique du processus d'établissement et de maintenance des élevages EOPS*

| | |
|---|---|
| NOUVEAU STOCK | Etablissement de l'absence d'agents à transmission verticale |
| | Recherche de l'antigène et des anticorps de la leucose aviaire sur tous les oiseaux avant l'âge de 20 semaines |
| | Recherche de *Salmonella* spp. et observation clinique générale à partir de l'âge de 8 semaines |
| | Essais de routine pour la recherche des agents spécifiés à partir de l'âge de 20 semaines |
| 2e GÉNÉRATION | Recherche de l'antigène et des anticorps de la leucose aviaire sur tous les oiseaux avant l'âge de 20 semaines |
| | Recherche de *Salmonella* spp. et observation clinique générale à partir de l'âge de 8 semaines |
| | Essais de routine pour la recherche des agents spécifiés à partir de l'âge de 20 semaines |
| 3e GÉNÉRATION | Recherche de l'antigène et des anticorps de la leucose aviaire sur tous les oiseaux avant l'âge de 20 semaines |
| | Recherche de *Salmonella* spp. et observation clinique générale à partir de l'âge de 8 semaines |
| ÉLEVAGE QUALIFIÉ COMME EOPS S'IL A SATISFAIT À TOUS LES ESSAIS | |
| 3e GÉNÉRATION | Essais de routine pour la recherche des agents spécifiés à partir de l'âge de 20 semaines |
| | Essais post-ponte pour établir l'absence d'agents à transmission verticale |
| GÉNÉRATIONS SUIVANTES | Recherche de l'antigène de la leucose aviaire et des anticorps dirigés contre les agents spécifiés sur 2 échantillons représentant chacun 5 pour cent de l'élevage, entre 12 et 20 semaines. |
| | Recherche de *Salmonella* spp. et observation clinique générale à partir de l'âge de 8 semaines |
| | Essais de routine pour la recherche des agents spécifiés à partir de l'âge de 20 semaines |
| | Essais post-ponte pour établir l'absence d'agents à transmission verticale |

par période de 4 semaines. Ils sont effectués par EIA pour l'antigène spécifique de chaque groupe, au moyen de techniques permettant la détection de l'antigène des sous-groupes A, B et J.

*Recherche d'anticorps dirigés contre d'autres agents.* Des recherches d'anticorps dirigés contre l'ensemble des agents cités dans le tableau 5.2.2.-1 sont effectuées sur toute la durée de la période de ponte de l'élevage. Elles portent sur 5 pour cent de l'élevage (au minimum 10 et au maximum 200 oiseaux) par période de 4 semaines. Il est recommandé d'effectuer ces prélèvements sur 1,25 pour cent de l'élevage chaque semaine, certaines méthodes de détection d'agents infectieux devant être mises en oeuvre de façon hebdomadaire. Le tableau 5.2.2.-1 classifie les agents selon leur rapidité de diffusion, en distinguant ceux qui se propagent rapidement au sein de l'élevage et ceux qui se propagent lentement ou ne sont pas susceptibles d'infecter la totalité de l'élevage. Pour les agents classés à diffusion lente, chaque échantillon est examiné individuellement. Pour les agents classés à diffusion rapide, au moins 20 pour cent des échantillons prélevés par période de 4 semaines sont examinés individuellement sauf si l'on procède par séroneutralisation ou par ELISA, auquel cas tous les échantillons peuvent être examinés individuellement ou sous forme de mélanges préparés à partir de 5 échantillons individuels prélevés au même moment.



Des méthodes de détection appropriées sont indiquées dans le tableau 5.2.2.-1. Sous réserve d'autorisation de l'Autorité compétente, d'autres types d'essai peuvent être utilisés à condition d'avoir démontré qu'ils possèdent une sensibilité au moins égale à celle des méthodes citées et une spécificité appropriée.

ESSAIS À EFFECTUER À LA FIN DE LA PÉRIODE DE PONTE

A la suite de la dernière collecte d'oeufs, un contrôle final est effectué pour confirmer l'absence des agents à transmission verticale cités dans le tableau 5.2.2.-1. A cet effet, au minimum 5 pour cent de l'effectif de l'élevage (au minimum 10 et au maximum 200) est retenu pendant au moins 4 semaines après la collecte d'oeufs finale. Des échantillons sanguins sont prélevés sur chaque oiseau de ce groupe au cours des 4 semaines, et 1,25 pour cent des oiseaux de l'élevage (25 pour cent du groupe retenu) sont saignés au plus tôt 4 semaines après la collecte d'oeufs finale. Une recherche des agents à transmission verticale (identifiés dans le tableau 5.2.2.-1) est effectuée par les méthodes indiquées sur les échantillons de sérum. Lorsque les échantillons sont prélevés de façon hebdomadaire, au moins 1,25 pour cent des oiseaux (25 pour cent du groupe retenu) sont examinés chaque semaine pendant la période considérée. L'autre option possible est de procéder, dans les 4 semaines suivant la collecte d'oeufs finale, à des collectes de sang et/ou d'autres échantillons appropriés sur au moins 5 pour cent de l'effectif de l'élevage et de rechercher la présence d'agents à transmission verticale dans ces échantillons au moyen de techniques validées d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*).

MESURES À PRENDRE EN CAS DE DÉTECTION D'UN AGENT SPÉCIFIÉ

Si les résultats montrent l'existence d'une contamination de l'élevage par un agent classé à diffusion lente dans le tableau 5.2.2.-1, tous les produits issus de l'élevage dans les 4 semaines précédant la date à laquelle a été prélevé l'échantillon positif sont considérés comme non conformes. De même, si les résultats montrent l'existence d'une contamination de l'élevage par un agent classé à diffusion rapide dans le tableau 5.2.2.-1, tous les produits issus de l'élevage dans les 2 semaines précédant la date à laquelle a été prélevé l'échantillon positif sont considérés comme non conformes. Si de tels produits ont déjà été utilisés à des fins de fabrication ou de contrôle, les produits pour lesquels l'emploi de produits EOPS est obligatoire sont considérés comme insatisfaisants et doivent être jetés, et les contrôles effectués ne sont pas valables.

Les producteurs doivent notifier l'existence d'une contamination aux utilisateurs de tous les oeufs dès que possible après sa découverte.

Un élevage dans lequel une contamination par un des agents spécifiés a été détectée et confirmée ne peut pas regagner son statut d'élevage EOPS. La totalité de la progéniture issue de cet élevage à compter des 4 semaines précédant le prélèvement du dernier échantillon négatif est exclue du statut EOPS.

**01/2011:50203**

# 5.2.3. SUBSTRATS CELLULAIRES UTILISÉS POUR LA PRODUCTION DE VACCINS POUR USAGE HUMAIN

Le présent chapitre général traite des lignées de cellules diploïdes et des lignées cellulaires continues servant de substrats cellulaires pour la production de vaccins pour usage humain ; certains points spécifiques aux vaccins préparés par la méthode dite de l'ADN recombinant sont traités dans la monographie *Produits obtenus par la méthode dite de l'ADN recombinant (0784).* Le tableau 5.2.3.-1 donne la liste des essais à effectuer aux différentes étapes (cellules de semence, banque de cellules primaire, banque de cellules de travail, cellules appartenant à un niveau de doublement de population au moins égal au niveau maximal qui sera utilisé pour la production). Les dispositions générales concernant l'utilisation des lignées cellulaires et l'application des méthodes d'essai figurent ci-après. Lorsqu'un vaccin est produit au moyen de cellules primaires ou de cellules n'ayant subi qu'un faible nombre de passages, sans constitution de banque cellulaire, les exigences applicables à ce vaccin figurent dans la monographie le concernant.

**Lignées cellulaires diploïdes**. Une lignée cellulaire diploïde possède une capacité élevée mais définie de multiplication *in vitro*.

**Lignées cellulaires continues**. Une lignée cellulaire continue possède une capacité illimitée de multiplication *in vitro* ; les cellules présentent souvent des différences de caryotype avec les cellules d'origine ; elles peuvent être obtenues à partir de tissus sains ou tumoraux de mammifères ou d'insectes.

Dans le cas de vaccins injectables préparés sur une lignée cellulaire continue, le procédé de purification est validé afin de démontrer la réduction du taux d'ADN provenant des cellules du substrat jusqu'à un niveau équivalent à 10 ng par dose humaine unitaire au maximum, sauf indication contraire.

**Système de banques de cellules**. La production de vaccins en lignées cellulaires continues ou en lignées cellulaires diploïdes est fondée sur un système de banques de cellules. L'âge *in vitro* des cellules est compté à partir du lot de semence primaire. Chaque banque de cellules de travail est préparée à partir d'un ou plusieurs récipients de la banque de cellules primaire. L'utilisation, l'identité et l'inventaire des récipients sont minutieusement notés.

**Milieux et substances d'origine humaine ou animale**. La composition des milieux utilisés pour l'isolement et l'ensemble des cultures ultérieures est minutieusement notée ; si des substances d'origine humaine ou animale sont utilisées, elles sont exemptes d'agents étrangers (*2.6.16*) et doivent être conformes au chapitre général *5.1.7. Sécurité virale.*

Si de l'albumine humaine est utilisée, elle est conforme à la monographie *Solution d'albumine humaine (0255).*

Si des sérums d'origine bovine sont utilisés, ils sont conformes à la monographie *Sérum bovin (2262).*

Des essais appropriés sont effectués sur la trypsine utilisée pour la préparation des cultures cellulaires pour démontrer la stérilité et l'absence de mycoplasmes et de virus, notamment les pestivirus, circovirus et parvovirus.

Tableau 5.2.3.-1. – *Essais effectués sur les lignées de cellules*

| Essai | Cellules de semence | Banque de cellules primaire (BCP) | Banque de cellules de travail (BCT) | Cellules à un niveau de doublement de population au moins égal au niveau maximal qui sera utilisé pour la production |
|---|---|---|---|---|
| 1. IDENTITÉ ET PURETÉ | | | | |
| Morphologie | + | + | + | + |
| Identification : empreinte génomique et sélection appropriée parmi les essais suivants : biochimique (par ex. isoenzymes), immunologique (par ex. histocompatibilité), marqueurs cytogénétiques | + | + | + | + |
| Caryotype (lignées diploïdes) | + | + | +(1) | +(1) |
| Durée de vie (lignées diploïdes) | − | + | + | − |
| 2. AGENTS ÉTRANGERS | | | | |
| Contamination bactérienne et fongique | − | + | + | − |
| Mycoplasmes | − | + | + | − |
| Spiroplasmes (lignées de cellules d'insecte) | − | + | + | − |
| Microscopie électronique (lignées de cellules d'insecte) | − | + (3) | − | + (3) |
| Essais des agents étrangers sur cultures cellulaires | − | − | + | − |
| Coculture | − | − | +(2) | +(2) |
| Essais sur animaux et sur oeufs | − | − | +(2) | +(2) |
| Recherche spécifique de contaminants potentiels selon l'origine des cellules | − | − | +(2) | +(2) |
| Rétrovirus | − | +(3) | − | +(3) |
| 3. TUMORIGÉNICITÉ | | | | |
| Tumorigénicité | +(5) | − | − | +(4) |

(1) Le caractère diploïde est démontré pour chaque banque de cellules de travail mais en utilisant des cellules à un niveau de doublement de population au moins égal au niveau maximal qui sera utilisé pour la production.

(2) Essai effectué pour chaque banque de cellules de travail mais en utilisant des cellules à un niveau de doublement de population au moins égal au niveau maximal qui sera utilisé pour la production.

(3) Essai effectué pour la banque de cellules primaire mais en utilisant des cellules à un niveau de doublement de population au moins égal au niveau maximal qui sera utilisé pour la production.

(4) Les lignées cellulaires MRC-5, WI-38 et FRhL-2 sont reconnues comme non tumorigènes et ne nécessitent pas d'essai de tumorigénicité. Les essais de tumorigénicité ne sont pas non plus réalisés sur les lignées cellulaires à tumorigénicité connue ou présumée (CHO et BHK-21, par exemple).

(5) Essai effectué sur les cellules de semence mais en utilisant des cellules à un niveau de doublement de population au moins égal au niveau maximal qui sera utilisé pour la production.

**Cellules de semence**. Les données sur la base desquelles est évaluée l'acceptabilité des cellules de semence comprennent, chaque fois qu'il est possible, des indications sur leur provenance, leur historique et leur caractérisation.

*Provenance des cellules de semence.* Pour les lignées cellulaires humaines, le dossier contient les informations suivantes concernant le donneur : origine ethnique et géographique, âge, sexe, état physiologique général, tissu ou organe utilisé, résultats des éventuelles recherches de pathogènes.

Pour les lignées cellulaires animales, le dossier contient les informations suivantes concernant la provenance des cellules : espèce, lignée, conditions d'élevage, origine géographique, âge, sexe, état physiologique général, tissu ou organe utilisé, résultats des éventuelles recherches de pathogènes.

Les cellules d'origine neurale (par exemple les neuroblastomes et les cellules P12) peuvent contenir des substances qui concentrent les agents des encéphalopathies spongiformes ; ces cellules ne sont pas utilisées pour la production de vaccins.

*Historique des cellules de semence.* Le dossier contient les informations suivantes : méthode utilisée pour isoler les cellules de semence, les méthodes de culture et toute autre procédure utilisée pour établir la banque de cellules primaire, notamment celles susceptibles d'entraîner une exposition des cellules à des agents étrangers.

Les informations disponibles sur les ingrédients des milieux antérieurement utilisés pour la culture des cellules, par exemple la provenance des substances d'origine animale, sont parfois incomplètes ; dans les cas justifiés et autorisés, des banques de cellules déjà établies à l'aide de tels milieux peuvent néanmoins être utilisées pour la production de vaccins.

*Caractérisation des cellules de semence.* La caractérisation des cellules porte sur les aspects suivants :

(1) identité (par exemple : isoenzymes, sérologie, empreinte génomique),

(2) caractéristiques de croissance et propriétés morphologiques (microscopie optique et électronique),

(3) caryotype des lignées cellulaires diploïdes,

(4) durée de vie *in vitro* des lignées cellulaires diploïdes, en termes de niveaux de doublement de population.

**Stabilité des substrats cellulaires**. Il doit être démontré que la lignée cellulaire a une viabilité appropriée dans les conditions prévues pour la conservation. Pour chaque produit préparé à l'aide de la lignée cellulaire, il est nécessaire de démontrer qu'une production reproductible peut être obtenue avec des cellules appartenant à des niveaux de passage situés au début et à la fin de la durée d'utilisation prévue.

**Agents contaminants infectieux**. Les lignées cellulaires utilisées pour la production de vaccins doivent être exemptes d'agents contaminants infectieux. Des recherches d'agents contaminants sont effectuées comme indiqué dans le tableau 5.2.3.-1, au moyen des méthodes décrites ci-après.

Pour les lignées cellulaires issues d'insectes, une recherche des virus spécifiques à l'espèce d'origine de l'insecte et des arbovirus (virus ayant comme vecteur des arthropodes) est effectuée. La gamme des virus recherchés est toutefois choisie en fonction de l'état des connaissances scientifiques du moment.

Si la présence de rétrovirus capables de réplication est détectée, la lignée cellulaire concernée n'est pas acceptable pour la production de vaccins.

**Tumorigénicité**. Pour la préparation de vaccins vivants, la lignée cellulaire ne doit pas être tumorigène aux niveaux de doublements de population utilisés pour la production. Si une lignée cellulaire tumorigène est utilisée pour la préparation d'autres types de vaccin, le procédé de purification est validé afin de démontrer que le taux d'ADN provenant des cellules du substrat est réduit à un niveau équivalent à 10 ng au maximum par dose humaine unitaire du vaccin, sauf indication contraire, et que le taux des protéines provenant des cellules du substrat est réduit à un niveau acceptable.

Si une lignée cellulaire possède un potentiel tumorigène reconnu, il n'est pas nécessaire de procéder à des essais de tumorigénicité. Si le potentiel tumorigène d'une lignée cellulaire est inconnu, cette lignée sera soit considérée comme tumorigène, soit soumise à un essai de tumorigénicité *in vivo* comme décrit plus loin et éventuellement un essai *in vitro* si des informations supplémentaires sont nécessaires. Les essais seront effectués sur des cellules appartenant à un niveau de doublement de population au moins égal au niveau maximal qui sera utilisé pour la production.

Les lignées de cellules diploïdes MRC-5, WI-38 et FRhL-2 sont reconnues comme non tumorigènes et ne nécessitent donc pas d'essai de tumorigénicité.

**Caractérisation chromosomique**. La diploïdie des lignées de cellules diploïdes doit être démontrée ; une caractérisation plus poussée par analyse du caryotype est nécessaire si l'élimination des cellules intactes pendant le traitement après la récolte n'a pas été validée. Des échantillons provenant de 4 niveaux de passage régulièrement distribués sur la durée de vie de la lignée cellulaire sont examinés. Chaque examen porte sur au moins 200 cellules en métaphase, pour vérification du nombre exact de chromosomes et évaluation de la fréquence d'hyperploïdie, d'hypoploïdie, de polyploïdie, de cassures et d'anomalies structurelles.

Les lignées de cellules MRC-5, WI-38 et FRhL-2 sont reconnues comme étant diploïdes, et bien caractérisées ; lorsqu'elles n'ont pas été génétiquement modifiées, une caractérisation plus poussée n'est pas nécessaire.

MÉTHODES D'ESSAI APPLICABLES AUX CULTURES CELLULAIRES

**Morphologie**. La morphologie des cellules est décrite de manière appropriée et documentée.

**Identification**. L'identité des cellules est établie sur la base de l'empreinte génomique et d'un choix approprié des aspects suivants :

(1) caractéristiques biochimiques (analyse des isoenzymes),

(2) caractéristiques immunologiques (antigènes d'histocompatibilité),

(3) marqueurs cytogénétiques.

**Cellules contaminantes**. L'empreinte génomique effectuée aux fins d'identification sert également à démontrer l'absence de cellules contaminantes.

**Contamination bactérienne et fongique**. La banque de cellules primaire et chaque banque de cellules de travail satisfont à l'essai de stérilité (*2.6.1*), effectué sur 10 mL du surnageant des cultures cellulaires pour chaque milieu et sur 1 pour cent des récipients, avec un minimum de 2 récipients.

**Mycoplasmes** (*2.6.7*). La banque de cellules primaire et chaque banque de cellules de travail satisfont à l'essai des mycoplasmes, effectué sur un ou plusieurs récipients.

**Spiroplasmes (lignées de cellules d'insecte)**. Pour la banque de cellules primaire et chacune des banques de cellules de travail, l'absence de spiroplasmes est démontrée par une méthode validée approuvée par l'Autorité compétente. Utilisez un ou plusieurs récipients.

**Microscopie électronique (lignées de cellules d'insecte)**. La banque de cellules primaire fait l'objet d'une recherche d'agents parasites par microscopie électronique. Maintenez les lignées de cellules à la température utilisée en routine pour la production et portez-les à un niveau de doublement de population au moins égal au niveau maximal qui sera utilisé pour la production. De plus, des lignées de cellules sont maintenues à des températures supérieures et inférieures à celles utilisées en routine pour la production et peuvent être soumises à d'autres traitements, comme une exposition à des agents chimiques stressants. Les températures de maintenance, les traitements utilisés et le nombre de cellules lysées à examiner sont approuvés par l'Autorité compétente.

**Recherche des agents étrangers sur cultures cellulaires**. Les cellules satisfont à l'essai des virus hémadsorbants et aux essais de recherche des agents étrangers sur culture cellulaire qui sont décrits dans le chapitre *2.6.16* sous « Culture cellulaire de production : cellules témoins ». Si les cellules sont d'origine simienne, elles sont également inoculées à des cultures de cellules rénales de lapin pour une recherche de l'herpèsvirus B (herpèsvirus cercopithécin 1).

**Coculture**. Si les lignées cellulaires sont d'origine mammifère ou aviaire, cocultivez séparément des cellules intactes et/ou des cellules lysées avec d'autres systèmes cellulaires comprenant des cellules humaines et des cellules simiennes. Pour les lignées de cellules d'insectes, placez des extraits de cellules lysées en incubation avec d'autres systèmes cellulaires comprenant des cellules humaines et simiennes ainsi qu'au moins une lignée cellulaire, différente de celle utilisée en production, sensible aux virus d'insecte et permettant la détection des arbovirus humains (par exemple BHK-21). Recherchez l'apparition d'éventuels changements morphologiques. Effectuez une recherche de virus hémagglutinants sur les liquides de culture ou une recherche de virus hémadsorbants sur les cellules. La recherche de virus hémagglutinants ne s'applique pas à la détection d'arbovirus sur les cellules d'insecte. Les cellules satisfont à l'essai s'il n'y a aucune indication de la présence d'un agent étranger.

**Rétrovirus**. Recherchez la présence éventuelle de rétrovirus :

(1) par une recherche de transcriptase inverse (essai PERT - product-enhanced reverse transcriptase) (*2.6.21*) effectuée sur les surnageants des banques cellulaires en utilisant les cellules à un niveau de doublement de population au moins égal au niveau maximal qui sera utilisé pour la production,

(2) par microscopie électronique de transmission.

Si l'essai (1) et/ou l'essai (2) donnent un résultat positif, effectuez l'essai (3) :

(3) des essais d'infectivité réalisés sur des cellules humaines avec un essai PERT en point final sur le surnageant.

Etant donné que la sensibilité des essais PERT est très grande, l'interprétation d'un signal positif peut être équivoque, et une décision relative à l'acceptabilité d'un substrat cellulaire devra être fondée sur toutes les données disponibles.

**Essais sur animaux**. A chacun des groupes d'animaux suivants, injectez par voie intramusculaire (ou, dans le cas des souriceaux, par voie sous-cutanée) $10^7$ cellules viables également réparties entre les animaux du groupe :

(1) 2 portées d'au moins 10 souriceaux à la mamelle âgés de moins de 24 h,

(2) 10 souris adultes.

Injectez également $10^6$ cellules viables à chacune des 10 souris adultes par voie intracérébrale, pour détecter la présence éventuelle du virus de la chorioméningite lymphocytaire.

Placez les animaux en observation pendant au moins 4 semaines. Examinez chaque animal qui présente des symptômes de maladie ou une anomalie pour en déterminer la cause. Les cellules satisfont à l'essai si aucun signe de présence d'agents étrangers n'est observé. L'essai n'est pas valable si moins de 80 pour cent des animaux de chaque groupe restent en bonne santé et survivent jusqu'à la fin de la période d'observation.

**Essais sur oeufs**. Injectez au moins $10^6$ cellules viables par oeuf dans la cavité allantoïdienne de 10 oeufs de poules EOPS embryonnés (*5.2.2*) âgés de 9-11 jours, et dans le sac vitellin de 10 oeufs de poules EOPS embryonnés âgés de 5-6 jours. Placez en incubation pendant au minimum 5 jours. Procédez à une recherche d'hémagglutinines sur les liquides allantoïdiens à l'aide d'érythrocytes mammaliens et aviaires ; effectuez l'essai à une température de 5 ± 3 °C et à une température de 20-25 °C et lisez les résultats après 30-60 min. Les cellules satisfont à l'essai si aucun signe de présence d'agents étrangers n'est observé. L'essai n'est pas valable si moins de 80 pour cent des embryons restent en bonne santé et survivent jusqu'à la fin de la période d'observation.

**Recherches spécifiques de contaminants possibles selon l'origine des cellules**. Effectuez une recherche d'agents pathogènes spécifiques au moyen de techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) avec ou sans amplification préalable dans les cellules. D'autres techniques sérologiques appropriées peuvent également être utilisées, comme l'immunoadsorption avec enzyme conjuguée, la séroneutralisation ou des essais de production d'anticorps sur des animaux sensibles appropriés. Dans le cas de cellules de rongeurs, pour déceler des virus spécifiques de l'espèce, effectuez des essais de production d'anticorps sur des souris, des rats et des hamsters, ou utilisez des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*). Tenez compte de l'origine et de l'historique de culture de la lignée cellulaire. Les essais visent à déceler des contaminants potentiels, notamment ceux réputés constituer des agents infectieux latents de l'espèce d'origine, comme par exemple le virus simien 40 pour le macaque rhésus ou le nodavirus d'insectes FHV (« Flock house virus »).

**Essais de tumorigénicité *in vivo***. L'essai consiste à établir une comparaison entre la lignée cellulaire continue et un témoin positif approprié (cellules HeLa ou Hep2, par exemple).

Les systèmes animaux suivants sont appropriés :

(1) souris athymiques (génotype Nu/Nu),

(2) souris, rats ou hamsters nouveau-nés ayant été traités par un sérum ou une globuline antithymocytaire,

(3) souris thymectomisées et irradiées ayant été restaurées ($T^-$, $B^+$) avec de la moelle osseuse de souris saine.

Quel que soit le système animal choisi, la lignée cellulaire et les cellules de référence sont injectées à des groupes distincts de 10 animaux chacun. Dans les 2 cas, l'inoculum par animal est de $10^7$ cellules en suspension dans un volume de 0,2 mL et l'injection peut être pratiquée par voie intramusculaire ou sous-cutanée. Si l'on emploie des animaux nouveau-nés, ils sont traités avec 0,1 mL de sérum ou globuline antithymocytaire aux jours 0, 2, 7 et 14 à compter de la naissance. Sont considérés comme actifs les sérums ou globulines aptes à supprimer les mécanismes immunitaires d'animaux en cours de croissance jusqu'au point où l'inoculation des $10^7$ cellules de référence positives produit régulièrement des tumeurs et des métastases. Si des animaux sont sévèrement affectés et présentent sans ambiguïté des tumeurs à croissance progressive, euthanasiez-les avant la fin de l'essai pour leur épargner des souffrances inutiles.

A la fin de la période d'observation, euthanasiez et examinez tous les animaux, y compris ceux des groupes témoins ; recherchez des signes macroscopiques et microscopiques de prolifération des cellules inoculées, au site d'injection et dans d'autres organes (par exemple, les ganglions lymphatiques, les poumons, les reins et le foie).

Dans tous les cas, examinez les animaux à intervalles réguliers en procédant à une palpation pour détecter la formation éventuelle de nodules aux sites d'injection. Mesurez les nodules selon 2 directions perpendiculaires et notez régulièrement les résultats des mesures, pour déterminer si le nodule est en croissance progressive. Si certains animaux présentent des nodules montrant des signes de régression au cours de la période d'observation, euthanasiez-les avant que les nodules ne soient plus détectables à la palpation, et procédez à un examen histologique. Observez les animaux présentant des nodules en croissance progressive pendant 1-2 semaines, et les animaux ne présentant pas de formation de nodules pendant 3 semaines, pour la moitié d'entre eux, et pendant 12 semaines pour l'autre moitié, avant de les euthanasier et de procéder à un examen histologique. Effectuez sur chaque animal une nécropsie comprenant notamment la recherche de signes macroscopiques de formation tumorale au site d'injection et dans d'autres organes (par exemple : ganglions lymphatiques, poumons, cerveau, rate, reins, foie). Procédez à un examen histologique de toutes les lésions d'apparence tumorale et du site d'injection. Par ailleurs, certaines lignées cellulaires pouvant donner des métastases sans manifestation de croissance tumorale locale, procédez systématiquement sur tous les animaux à un examen histologique des ganglions lymphatiques régionaux détectables et des poumons.

Si moins de 9 des 10 animaux auxquels ont été inoculées les cellules de référence positives présentent des tumeurs à croissance progressive, l'essai n'est pas valable.

**Essais de tumorigénicité *in vitro***. Les essais suivants peuvent être utilisés :

(1) formation de colonies en gélose molle,

(2) production d'une croissance cellulaire envahissante après inoculation à des cultures d'organes,

(3) étude du pouvoir transformant au moyen, par exemple, du système d'épreuve 3T3 qui met en évidence la présence d'oncogènes activés.

**01/2008:50204**

# 5.2.4. CULTURES CELLULAIRES UTILISÉES POUR LA PRÉPARATION DE VACCINS POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

Les cultures cellulaires utilisées pour la préparation de vaccins pour usage vétérinaire satisfont aux exigences décrites dans cette section. Il peut également être nécessaire que les cultures cellulaires utilisées dans le contrôle des vaccins satisfassent à tout ou partie de ces exigences.

Chaque fois qu'il est possible, les virus de mammifères sont cultivés dans des cultures dérivées de lignées cellulaires plutôt que dans des cultures de cellules primaires.

Les cellules infectées en permanence utilisées pour la préparation de vaccins pour usage vétérinaire satisfont aux exigences spécifiées ci-après qui leur sont applicables. Il sera démontré qu'elles sont uniquement infectées par l'agent indiqué.

## LIGNÉES CELLULAIRES

Les lignées cellulaires utilisées en production sont normalement obtenues par un système de banque de cellules. Un code spécifique d'identification est attribué à chaque banque de cellules primaire. Les banques de cellules primaires sont conservées par parties aliquotes à une température inférieure ou égale à − 70 °C. Normalement, les cellules utilisées pour la production du vaccin n'ont pas subi plus de 20 passages à partir de la banque de cellules primaire. Lorsque des cultures en suspension sont utilisées, un accroissement du nombre de cellules de l'ordre de trois doublements de population environ est considéré comme équivalent à un passage. Si les cellules utilisées pour la production ont subi un nombre de passages supérieur à 20, il est démontré, par validation ou par



5. Textes généraux

d'autres essais, que les cellules de production sont sensiblement identiques à celles de la banque de cellules primaire quant à leurs caractéristiques biologiques et à leur pureté, et que l'utilisation de ces cellules n'a pas d'incidence néfaste sur la production du vaccin.

L'historique de la lignée cellulaire (par exemple origine, nombre de passages et milieux utilisés pour la multiplication, conditions de conservation) sera connu dans le détail et enregistré par écrit.

Une description des méthodes de conservation et d'utilisation des cellules, et notamment des moyens employés pour s'assurer que le nombre maximal de passages admis n'est pas dépassé au cours de la production est consignée. Des quantités suffisantes de la banque de cellules primaire et de chaque banque de cellules de travail sont conservées à des fins d'analyse.

Les essais décrits ci-après sont effectués sur des cultures établies à partir de la banque de cellules primaire et de la banque de cellules de travail ou sur des cellules de la banque de cellules de travail au niveau de passage maximum utilisé en production (tableau 5.2.4.-1), dérivées d'un échantillon homogène et représentatif. La représentativité de l'échantillon sera démontrée.

Tableau 5.2.4.-1. – *Stades des cultures cellulaires auxquels les essais sont effectués*

| | **Banque de cellules primaire** | **Banque de cellules de travail** | **Cellules de la banque de cellules de travail au niveau de passage maximum** |
|---|---|---|---|
| Microscopie générale | + | + | + |
| Bactéries/Champignons | + | + | – |
| Mycoplasmes | + | + | – |
| Virus | + | + | – |
| Identification de l'espèce | + | – | + |
| Caryotype | + | – | + |
| Pouvoir tumorigène | + | – | – |

**Caractéristiques des cultures**. L'aspect des tapis cellulaires, avant et après coloration histologique, est décrit. Des informations sont enregistrées, si possible sous forme de données numériques, sur la vitesse et le taux de croissance notamment. De même, la présence ou l'absence d'une inhibition de contact, de cellules plurinucléées ou de toute autre anomalie cellulaire est notée.

**Caryotype**. Un examen chromosomique est effectué sur au moins 50 cellules en cours de mitose, au stade de la banque de cellules primaire et à un niveau de passage au moins égal au niveau maximum utilisé en production. Tout marqueur chromosomique présent dans les cellules au stade de la banque de cellules primaire devra être retrouvé au niveau de passage supérieur. Le nombre de chromosomes (valeur modale) obtenu au niveau de passage supérieur ne doit pas dépasser de plus de 15 pour cent la valeur obtenue au stade de la banque de cellules primaire. Les caryotypes seront identiques. Si le nombre de chromosomes est supérieur à la valeur déclarée, si certains marqueurs chromosomiques ne sont pas retrouvés au stade de la banque de cellules de travail au niveau le plus élevé utilisé pour la production, ou si les caryotypes présentent des différences, la lignée cellulaire n'est pas utilisée pour la fabrication de vaccins.

**Identification de l'espèce**. Il sera démontré, par une méthode validée, que les cellules de la banque de cellules primaire et de la banque de cellules de travail au niveau de passage le plus élevé utilisé en production appartiennent à l'espèce d'origine indiquée.

Lorsqu'un essai d'immunofluorescence est effectué avec le sérum spécifique de l'espèce dont proviennent les cellules, et qu'il s'avère que toutes les cellules examinées sont fluorescentes, il n'est pas nécessaire d'effectuer d'autres essais avec des réactifs permettant de détecter une contamination par des cellules d'autres espèces.

**Contamination bactérienne et fongique**. Les cellules satisfont à l'essai de stérilité (*2.6.1*). L'échantillon de cellules examiné comprend au minimum le nombre de cellules contenues dans un tapis de 70 $cm^2$ ou, pour les cellules cultivées en suspension, un nombre de cellules à peu près équivalent. Les cellules sont maintenues en culture pendant au moins 15 jours, sans antibiotiques, avant d'effectuer l'essai.

**Mycoplasmes** (*2.6.7*). Les cellules satisfont à l'essai des mycoplasmes. Les cellules sont maintenues en culture pendant au moins 15 jours, sans antibiotiques, avant d'effectuer l'essai.

**Absence de contamination virale**. L'absence de toute contamination virale des cellules est vérifiée par des techniques appropriées, et par les essais décrits ci-après.

Les tapis cellulaires examinés doivent avoir une surface d'au moins 70 $cm^2$, être préparés et maintenus en culture sur le même milieu (additifs compris) et dans les mêmes conditions que les cellules utilisées pour la fabrication du vaccin.

Les tapis cellulaires sont maintenus en culture pendant au moins 28 jours au total. Des subcultures sont effectuées à intervalles de 7 jours, à moins qu'il ne soit impossible de maintenir les cellules en vie pendant une durée aussi longue. Dans ce cas, il convient d'effectuer les subcultures à intervalles moindres, mais aussi longs que possible. Le nombre de cellules obtenu à la dernière subculture, dans des récipients appropriés, sera suffisant pour la réalisation des essais ci-après.

Les tapis cellulaires sont soumis pendant la période d'incubation à des examens réguliers pour détecter d'éventuels effets cytopathogènes et, à la fin de la période d'observation, à des essais de recherche de virus cytopathogènes, de virus hémadsorbants et de virus spécifiques, ces derniers étant effectués par immunofluorescence ou toute autre méthode appropriée (voir ci-après).

**Détection de virus cytopathogènes**. Colorez 2 tapis cellulaires de 6 $cm^2$ au moins chacun avec un colorant cytologique approprié. Examinez toute la surface des tapis cellulaires colorés pour rechercher la présence éventuelle de corps d'inclusion, de cellules géantes en nombre anormalement élevé ou de toute autre lésion indiquant l'existence d'anomalies cellulaires imputables à un agent contaminant.

**Détection de virus hémadsorbants**. Lavez plusieurs fois des tapis cellulaires, d'une surface totale de 70 $cm^2$ au moins, avec une solution tampon appropriée. Ajoutez une suspension d'hématies appropriées en volume suffisant pour recouvrir uniformément la surface des tapis cellulaires. Placez en incubation pendant des temps différents, puis examinez pour détecter une hémadsorption éventuelle.

**Détection de virus spécifiques**. L'absence de contaminants spécifiques de l'espèce dont provient la lignée cellulaire et de l'espèce à laquelle le produit est destiné est vérifiée par des essais appropriés. Sur des supports adéquats, préparez des cellules en nombre suffisant pour pouvoir effectuer les essais de détection des virus spécifiés. Chaque essai comprendra des témoins positifs appropriés. Les essais sont réalisés, par exemple, à l'aide d'anticorps conjugués à de la fluorescéine ou de réactifs comparables.

**Essais conduits sur d'autres cultures cellulaires**. Disposez de tapis cellulaires d'une surface totale de 140 $cm^2$ au moins. Les cellules sont congelées et décongelées au moins trois fois, puis les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation. Inoculez des parties aliquotes du liquide obtenu à des cellules des types suivants, présentant une confluence inférieure ou égale à 70 pour cent :

- cellules primaires de l'espèce d'origine,
- cellules sensibles aux virus pathogènes pour l'espèce à laquelle est destiné le vaccin,
- cellules sensibles aux pestivirus.

Ces cellules sont maintenues en culture pendant au moins 7 jours, puis des extraits sont préparés par congélation-décongélation comme indiqué ci-dessus et inoculés

à des cultures fraîches de cellules du même type en nombre suffisant pour permettre la réalisation des essais décrits ci-après. Les cellules sont placées en incubation pendant encore au moins 7 jours. Les cultures doivent faire l'objet d'examens réguliers en vue de la détection d'effets cytopathogènes imputables à des organismes vivants.

A la fin de la période de 14 jours, les cellules qui ont subi l'inoculation doivent faire l'objet des contrôles suivants :

– vérification de l'absence d'organismes cytopathogènes ou hémadsorbants par les méthodes spécifiées plus haut,
– vérification de l'absence de pestivirus ou autres contaminants spécifiques, par immunofluorescence ou d'autres méthodes validées (voir paragraphe « Détection de virus spécifiques »).

**Pouvoir tumorigène**. Le risque que représente une lignée cellulaire pour l'espèce cible sera évalué, et des essais effectués si nécessaire.

CELLULES PRIMAIRES

L'utilisation de cellules primaires comme substrat de fabrication de vaccins destinés à des mammifères est dans la plupart des cas inacceptable puisque des lignées cellulaires peuvent être employées. Si un vaccin est produit en culture de cellules primaires, celles-ci doivent provenir d'un élevage exempt de microorganismes pathogènes spécifiés totalement protégé contre l'introduction de maladies (barrières sanitaires, filtres sur les ouvertures d'aération, système approprié de quarantaine avant l'introduction d'animaux). S'il s'agit d'élevages de poulets, ils sont conformes aux exigences prescrites dans le chapitre général *5.2.2. Elevages de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés pour la production et le contrôle de qualité des vaccins*. S'il s'agit d'autres animaux, il sera démontré que l'élevage est exempt de microorganismes pathogènes spécifiés. L'ensemble des reproducteurs de l'élevage à partir duquel sont obtenues des cellules primaires destinées à la fabrication de vaccins est soumis à des contrôles comprenant par exemple des examens sérologiques de routine effectués deux fois par an au moins et, entre deux examens de routine, deux examens sérologiques supplémentaires effectués sur 15 pour cent des reproducteurs.

Il convient d'utiliser chaque fois que possible, en particulier pour les cellules de mammifères, un système de lot de semence comprenant, par exemple, des banques de cellules primaires ayant subi moins de 5 passages et des banques de cellules de travail n'ayant pas subi plus de 5 passages à partir de la préparation initiale de la suspension cellulaire obtenue à partir des tissus animaux.

Chaque banque de cellules primaire, chaque banque de cellules de travail et les cellules au niveau de passage maximum utilisé en production sont soumises aux essais indiqués dans le tableau 5.2.4.-2, selon les méthodes décrites ci-après. L'échantillon examiné couvrira toutes les sources de cellules utilisées pour la fabrication du lot. Aucun lot de vaccin fabriqué avec ces cellules ne sera libéré si l'un des essais a donné des résultats non satisfaisants.

Tableau 5.2.4.-2. – *Stades des cultures de cellules primaires auxquels les essais sont effectués*

| | Banque de cellules primaire | Banque de cellules de travail | Niveau de passage maximum |
|---|---|---|---|
| Microscopie générale | + | + | + |
| Bactéries/Champignons | + | + | – |
| Mycoplasmes | + | + | – |
| Virus | + | + | – |
| Identification de l'espèce | + | – | – |

**Caractéristiques des cultures**. L'aspect des tapis cellulaires, avant et après coloration histologique, est décrit. Des informations sont enregistrées, si possible sous forme de données numériques, sur la vitesse et le taux de croissance notamment. De même, la présence ou l'absence d'une inhibition de contact, de cellules plurinucléées ou de toute autre anomalie cellulaire est indiquée.

**Identification de l'espèce**. Il sera démontré, par une méthode validée, que les cellules de la banque de cellules primaire appartiennent à l'espèce d'origine déclarée.

Lorsqu'un essai d'immunofluorescence est effectué avec le sérum spécifique de l'espèce dont proviennent les cellules, et qu'il s'avère que toutes les cellules examinées sont fluorescentes, il n'est pas nécessaire d'effectuer d'autres essais avec des réactifs permettant de détecter une contamination par des cellules d'autres espèces.

**Stérilité bactérienne et fongique**. Les cellules satisfont à l'essai de stérilité (*2.6.1*). L'échantillon de cellules examiné comprend au minimum le nombre de cellules contenu dans un tapis de 70 $cm^2$ ou, pour les cellules cultivées en suspension, un nombre de cellules à peu près équivalent. Les cellules sont maintenues en culture pendant au moins 15 jours, sans antibiotiques, avant d'effectuer l'essai.

**Mycoplasmes** (*2.6.7*). Les cellules satisfont à l'essai des mycoplasmes. Les cellules sont maintenues en culture pendant au moins 15 jours, sans antibiotiques, avant d'effectuer l'essai.

**Absence de contamination virale**. L'absence de toute contamination virale des cellules est vérifiée de la manière suivante.

Les tapis cellulaires examinés doivent avoir une surface d'au moins 70 $cm^2$ et être préparés et maintenus en culture sur le même milieu (additifs compris) et dans les mêmes conditions que les cellules utilisées pour la fabrication du vaccin.

Les tapis cellulaires sont maintenus en culture pendant au moins 28 jours au total ou pendant la plus longue période possible si le maintien en culture pendant 28 jours est impossible. Des subcultures sont effectuées à intervalles de sept jours, à moins qu'il ne s'avère impossible de maintenir les cellules en vie pendant une durée aussi longue. Dans ce cas, il convient d'effectuer les subcultures à intervalles moindres, mais aussi longs que possible. Le nombre de cellules obtenu à la dernière subculture, dans des récipients appropriés, sera suffisant pour la réalisation des essais ci-après.

Les tapis cellulaires sont soumis pendant la période d'incubation à des examens réguliers pour la détection d'effets cytopathogènes éventuels et, à la fin de la période d'observation, à des essais de recherche de virus cytopathogènes, de virus hémadsorbants et de virus spécifiques, ces derniers étant détectés par immunofluorescence ou toute autre méthode appropriée (voir ci-après).

**Détection de virus cytopathogènes**. Colorez 2 tapis cellulaires de 6 $cm^2$ au moins chacun avec un colorant cytologique approprié. Examinez toute la surface des tapis cellulaires colorés pour rechercher la présence éventuelle de corps d'inclusion, de cellules géantes en nombre anormalement élevé ou de toute autre lésion indiquant l'existence d'anomalies cellulaires imputables à un contaminant.

**Détection de virus hémadsorbants**. Lavez plusieurs fois des tapis cellulaires, d'une surface totale de 70 $cm^2$ au moins, avec une solution tampon adéquate. Ajoutez une suspension d'hématies appropriées en volume suffisant pour recouvrir uniformément la surface des tapis cellulaires. Placez en incubation pendant des temps différents, puis examinez pour détecter une hémadsorption éventuelle.

**Détection de virus spécifiques**. L'absence de contaminants spécifiques de l'espèce dont proviennent les cellules et de l'espèce à laquelle le produit est destiné est vérifiée par des essais appropriés.

Sur des supports adéquats, préparez des cellules en nombre suffisant pour pouvoir effectuer les essais de détection des virus spécifiés. Chaque essai comprendra des témoins positifs appropriés. Les essais sont réalisés à l'aide d'anticorps conjugués à de la fluorescéine ou de réactifs semblables.

**Essais conduits sur d'autres cultures cellulaires**. Il faut disposer de tapis cellulaires d'une surface totale de 140 $cm^2$ au moins. Les cellules sont congelées et décongelées au moins trois fois, puis les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation. Inoculez des parties aliquotes du liquide obtenu à des cellules des types suivants, présentant une confluence inférieure ou égale à 70 pour cent :

- cellules primaires de l'espèce d'origine,
- cellules sensibles aux virus pathogènes pour l'espèce à laquelle est destiné le vaccin,
- cellules sensibles aux pestivirus.

Ces cellules sont maintenues en culture pendant au moins 7 jours, puis des extraits sont préparés par congélation-décongélation comme indiqué ci-dessus et inoculés à des cultures fraîches de cellules du même type en nombre suffisant pour permettre la réalisation des essais décrits ci-après. Les cellules sont placées en incubation pendant encore au moins 7 jours. Les cultures doivent faire l'objet d'examens réguliers en vue de la détection d'effets cytopathogènes imputables à des organismes vivants.

A la fin de la période de 14 jours, les cellules qui ont subi l'inoculation doivent faire l'objet des contrôles suivants :

- vérification de l'absence d'organismes cytopathogènes ou hémadsorbants par les méthodes spécifiées plus haut,
- vérification de l'absence de pestivirus ou autres contaminants spécifiques, par immunofluorescence ou d'autres méthodes validées (voir paragraphe « Détection de virus spécifiques »).

**07/2009:50205**

# 5.2.5. SUBSTANCES D'ORIGINE ANIMALE UTILISÉES POUR LA PRÉPARATION DE MÉDICAMENTS IMMUNOLOGIQUES À USAGE VÉTÉRINAIRE

## 1. CHAMP D'APPLICATION

Des substances d'origine animale (par exemple, sérum, trypsine et sérum-albumine) peuvent être utilisées durant la fabrication des médicaments immunologiques pour usage vétérinaire.

Les exigences énoncées dans le présent chapitre s'appliquent aux substances d'origine animale produites à partir de lots, destinées à être utilisées à toutes les étapes de fabrication, par exemple dans les milieux de culture ou comme constituants des produits ajoutés lors du mélange. Ces exigences ne sont pas destinées à contrôler les semences ou les substrats d'origine animale, qui sont couverts par les exigences d'autres textes de la Pharmacopée, comme la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)* et le chapitre *5.2.4. Cultures cellulaires utilisées pour la préparation de vaccins pour usage vétérinaire*.

## 2. PRINCIPES GÉNÉRAUX ET EXIGENCES

*Les substances d'origine animale satisfont aux exigences de la Pharmacopée Européenne (si une monographie les concernant existe).*

L'utilisation des substances d'origine animale fait l'objet de restrictions pour des raisons de sécurité liées à certains agents pathogènes pouvant être présents dans ces substances et pour des raisons épidémiologiques et/ou réglementaires liées à la présence d'antigènes particuliers (vivants ou inactivés).

Principes généraux :

- il est recommandé de réduire autant que possible l'emploi de substances d'origine animale ;
- sauf exception justifiée, l'emploi de substances d'origine animale comme composants dans la formulation de médicaments n'est pas acceptable, sauf si ces substances sont soumises à un traitement validé pour l'inactivation des agents étrangers vivants.

Exigences générales :

- tout lot de substance (après inactivation et/ou traitement, le cas échéant) dans lequel la présence d'un agent étranger vivant est connue ou suspectée doit être détruit ou n'être utilisé qu'en des circonstances exceptionnelles et justifiées ; pour que son utilisation soit acceptée, il doit lui être appliqué un traitement supplémentaire qui garantira l'élimination et/ou l'inactivation de l'agent étranger et il doit être démontré que l'élimination et/ou l'inactivation a été satisfaisante ;
- tout lot de substance qui, d'après les conclusions de l'évaluation du risque, est susceptible d'entraîner une réponse immunitaire décelable inacceptable chez l'espèce cible suite à une contamination par des agents étrangers inactivés, ne doit pas être utilisé pour la fabrication du médicament immunologique à usage vétérinaire considéré.

## 3. GESTION DES RISQUES

Aucune mesure ni aucune combinaison de mesures ne peut garantir la sécurité de l'utilisation de substances d'origine animale. Il est cependant possible de réduire le risque associé à une telle utilisation. Il est donc nécessaire pour le fabricant de médicaments immunologiques à usage vétérinaire d'en tenir compte au moment du choix d'une substance d'origine animale destinée à être utilisée en production et de mener une évaluation du risque, en prenant en considération l'origine de la substance et les étapes de fabrication qui lui sont appliquées. De plus, des procédures de gestion du risque doivent être appliquées. Tout risque résiduel doit être évalué par rapport aux bénéfices potentiels fournis par l'utilisation de la substance dans la fabrication du médicament immunologique à usage vétérinaire.

### 3-1. *ÉVALUATION DU RISQUE*

L'évaluation du risque doit tenir compte des maladies animales présentes dans le pays d'origine des animaux servant de source pour la substance, des maladies infectieuses potentielles chez l'espèce source et de l'infectiosité prévisible de l'organe ou tissu source. A partir de ces informations, dans le cadre de l'évaluation du risque, il est possible de préparer une liste des agents étrangers susceptibles d'être présents dans la substance. Le risque de contamination de la substance et, par conséquent du médicament immunologique à usage vétérinaire, par des agents étrangers vivants doit être évalué. Il pourra également être tenu compte du risque de contamination de la substance et du médicament immunologique à usage vétérinaire par des agents étrangers inactivés. Tel est le cas si, par exemple, le contaminant fait partie des contaminants dont un pays européen est officiellement indemne et/ou fait l'objet d'un programme spécifique de contrôle d'une maladie au sein d'un pays européen, et si la présence de l'agent inactivé est susceptible d'entraîner la stimulation d'une réponse immunitaire décelable chez les animaux receveurs.

Dans le cadre de l'évaluation du risque, la présence dans la substance d'anticorps pouvant interférer avec la détection et/ou l'inactivation d'agents étrangers vivants doit également être prise en considération.

Il peut être nécessaire de répéter l'évaluation du risque et de réévaluer et réviser les étapes de la gestion du risque décrites ci-après afin de tenir compte de changements :

- de la situation zoo-sanitaire dans le (les) pays d'origine des animaux utilisés comme source pour la substance, y compris pour les maladies émergentes (nouveaux agents pathogènes),
- de la situation zoo-sanitaire et des mesures de contrôle des maladies appliquées dans les pays européens utilisant les médicaments immunologiques à usage vétérinaire fabriqués avec la substance considérée.

3-2. *CONTRÔLE DU RISQUE*

Pour chacun des agents étrangers potentiels identifiés lors de l'évaluation du risque, et en tenant compte de l'usage proposé de la substance, le risque doit être contrôlé par l'utilisation d'une des mesures suivantes ou d'une combinaison de ces mesures :

– placement de restrictions vis-à-vis de la source de la matière, avec audit,
– utilisation de procédures validées d'inactivation,
– démonstration de la capacité d'une étape de production à éliminer ou inactiver des agents étrangers,
– recherche d'agents étrangers.

4. MESURES DE CONTRÔLE

4-1. *SOURCE*

Toutes les substances d'origine animale utilisées pour la fabrication (y compris l'étape du mélange) de médicaments immunologiques à usage vétérinaire doivent provenir d'une source connue et être accompagnées de pièces justificatives (établissant notamment l'espèce d'origine et le pays d'origine des animaux et tissus sources).

4-2. *PRÉPARATION*

Les substances d'origine animale sont préparées à partir d'un vrac homogène désigné par un numéro de lot. Un lot peut contenir des substances dérivées d'un nombre non limité d'animaux mais une fois le numéro de lot défini et attribué, le lot ne doit être contaminé en aucune manière et rien ne doit lui être ajouté.

La méthode de production utilisée pour préparer la substance d'origine animale à partir de la matière première peut contribuer à l'élimination et/ou à l'inactivation des agents étrangers (voir section 4-3).

4-3. *INACTIVATION ET/OU AUTRES ÉTAPES DE TRAITEMENT POUR L'ÉLIMINATION DES AGENTS ÉTRANGERS*

La procédure d'inactivation et/ou les autres étapes de traitement choisies doivent avoir été validées et leur capacité à réduire le titre des agents étrangers potentiels décrits ci-après dans la substance concernée par un facteur d'au moins $10^6$ doit être démontrée.

Si cette réduction du titre ne peut pas être démontrée expérimentalement, un titre de prétraitement maximal doit être fixé pour l'agent étranger, en tenant compte de la réduction du titre garantie par l'étape d'inactivation/traitement et en conservant une marge de sécurité d'un facteur 100 ; chaque lot de substance doit être contrôlé pour déterminer le titre de prétraitement de départ et confirmer qu'il ne dépasse pas la limite spécifiée sauf si une évaluation convenable du risque, basée sur des données recevables et appropriées, montre que les titres sont toujours au moins 100 fois inférieurs au titre pouvant réellement être inactivé.

La validation de la (des) procédure(s) est effectuée sur une gamme représentative appropriée de virus couvrant différent types et dimensions (avec et sans enveloppe, à ADN ou à ARN, brin simple ou double, résistants à la température et au pH), en incluant des virus possédant différents degrés de résistance et en tenant compte du (des) type(s) de procédure à appliquer ainsi que les virus pouvant être présents dans la matière. La mise en évidence de l'efficacité de la procédure peut prendre la forme de renvois à la littérature et/ou à des données expérimentales générées par le fabricant, mais ces renvois doivent être pertinents vis-à-vis des conditions qui seront présentes pendant la production et l'inactivation/traitement de la substance.

Dans le cas de médicaments immunologiques à usage vétérinaire inactivés, la méthode utilisée pour l'inactivation de l'ingrédient actif peut également faire l'objet d'une validation de l'inactivation des possibles contaminants issus des substances d'origine animale utilisées dans la fabrication de l'ingrédient actif considéré.

4-4. *ESSAIS*

En fonction des résultats de l'évaluation du risque et des données de validation disponibles pour chaque procédure appliquée, les essais de recherche d'agents étrangers peuvent être effectués sur chaque lot avant et/ou après l'application d'une étape d'inactivation/traitement. Pour le contrôle de l'absence d'agents étrangers dans la substance, les matières solides sont dissoutes ou mises en suspension dans un milieu approprié pour obtenir une préparation adéquate aux essais. Une quantité suffisante de la préparation est contrôlée pour obtenir un essai de sensibilité appropriée, comme établi dans les études de validation.

En plus du contrôle de l'absence d'agents étrangers vivants, il peut être nécessaire d'effectuer des essais pour rechercher des agents étrangers inactivés, selon les risques identifiés.

**Absence de virus étrangers vivants**. Une recherche de virus étrangers est effectuée sur un échantillon de chaque lot de substance par un essai général et des essais spécifiques. Ces essais sont validés en termes de sensibilité et de spécificité pour la détection d'une gamme appropriée de virus étrangers potentiels. Des cultures cellulaires de sensibilité appropriée sont utilisées pour les essais de recherche de virus étrangers, y compris des cellules primaires provenant de la même espèce que la substance à examiner.

*Essai général.* Les cultures cellulaires inoculées sont régulièrement observées pendant 21 jours en vue de la détection d'éventuels effets cytopathogènes. Tous les 7 jours pendant cette période d'observation, une partie des cultures d'origine est soumise à un examen de détection des effets cytopathogènes, après fixation et coloration, et une autre partie est soumise à un essai de détection des agents hémadsorbants.

*Essais spécifiques.* Une partie des cellules disponibles à la fin de l'essai général est soumise à une recherche de virus spécifiques. Les virus spécifiques à rechercher sont les virus étrangers potentiels identifiés par l'évaluation du risque et qui ne peuvent être décelés par l'essai général. Un essai des pestivirus est effectué si l'espèce source est réceptive aux pestivirus.

**Contamination bactérienne et fongique**. Avant utilisation, la substance est soumise à l'essai de stérilité (*2.6.1*), ou à un procédé de stérilisation assurant l'élimination de toute contamination bactérienne ou fongique.

**Mycoplasmes**. Avant utilisation, la substance est soumise à l'essai des mycoplasmes (*2.6.7*), ou à un procédé de stérilisation assurant l'élimination de toute contamination mycoplasmique.

**01/2008:50206**

## 5.2.6. ÉVALUATION DE L'INNOCUITÉ DES VACCINS ET IMMUNOSÉRUMS VÉTÉRINAIRES

Le terme « produit » utilisé dans le texte définit soit un vaccin soit un immunosérum.

Pendant le développement, des essais d'innocuité sont effectués sur l'espèce ou les espèces cibles, afin de mettre en évidence les risques potentiellement associés à l'administration du produit.

*Vaccins.* Dans les essais de laboratoire, le terme « dose » désigne la dose recommandée, pour un produit ayant le titre maximal ou l'activité maximale susceptibles d'être obtenus dans les lots de production. Les vaccins vivants sont préparés uniquement à partir de souches dont l'innocuité a été démontrée. Pour les vaccins vivants, utilisez un ou plusieurs lots d'un vaccin contenant le virus/la bactérie au niveau de passage le moins atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

Dans le cas de vaccins combinés, l'innocuité est démontrée ; la conformité aux exigences particulières s'appliquant aux vaccins vivants figurant ci-après doit être démontrée séparément pour chaque souche vaccinale pour les composants vivants des vaccins combinés.

Dans le cas de vaccins inactivés, les essais d'innocuité effectués sur le vaccin combiné peuvent être considérés comme suffisants pour démontrer l'innocuité de chaque composant individuel.

*Immunosérums.* Dans les essais, le terme « dose » désigne la dose maximale recommandée, pour un produit présentant l'activité maximale et la teneur maximale en protéines totales susceptibles d'être obtenues dans les lots de production. Par ailleurs, la dose utilisée pour l'essai doit également contenir, dans les cas appropriés, la quantité maximale d'immunoglobuline ou de gammaglobuline.

Les essais ci-après, avec les modifications ou essais supplémentaires indiqués dans la section Production des monographies, peuvent être effectués dans le cadre des essais de développement nécessaires à la démonstration de l'innocuité du produit.

## A. ESSAIS DE LABORATOIRE

**Innocuité de l'administration d'une dose unique**. Pour chacune des voies d'administration recommandées, administrez 1 dose de produit à un groupe d'animaux de chacune des espèces et catégories auxquelles le produit est destiné. Ce groupe comprend des animaux de l'âge minimal recommandé et, dans les cas appropriés, des femelles gestantes. Les animaux sont placés en observation et examinés au moins 1 fois par jour pour voir s'ils présentent des signes de réactions générales ou locales. Cette étude comprend, dans les cas appropriés, un examen nécropsique détaillé, macroscopique et microscopique, du site d'injection. D'autres critères objectifs doivent également être enregistrés, par exemple la température corporelle des mammifères et les indices de performance. La température corporelle est enregistrée au moins le jour précédant l'administration du produit, au moment de l'administration, 4 h plus tard et les 4 jours suivants. Les animaux sont maintenus en observation et examinés au moins 1 fois par jour aussi longtemps que des réactions peuvent être attendues et, dans tous les cas, pendant au moins 14 jours après l'administration.

**Etude de la fonction reproductrice**. Les études d'innocuité peuvent également comprendre un suivi des performances reproductives lorsqu'il apparaît que la matière première dont est issu le vaccin constitue un facteur de risque. Lorsque cela est prescrit dans une monographie, une étude des performances reproductives des mâles et des femelles gestantes et non gestantes est effectuée, y compris une recherche des effets nuisibles sur la descendance, par exemple de nature tératogène et abortive par chacune des voies d'administration recommandées.

**Innocuité de l'administration d'une surdose**. Une surdose du produit est administrée, par chacune des voies recommandées, à des animaux appartenant aux catégories de l'espèce cible présumées être les plus sensibles, par exemple, dans les cas appropriés, des animaux de l'âge minimal recommandé et des femelles gestantes. La surdose est généralement constituée par 10 doses normales pour les vaccins vivants ou par 2 doses pour les produits inactivés ou les immunosérums. Dans le cas des vaccins vivants cryodesséchés, les 10 doses seront reconstituées dans un volume approprié de diluant pour l'essai. Les animaux sont placés en observation et examinés au moins une fois par jour pour voir s'ils présentent des signes de réactions générales ou locales. D'autres critères objectifs doivent également être enregistrés, par exemple la température corporelle des mammifères et les indices de performance. Les animaux sont maintenus en observation et examinés pendant au moins 14 jours après l'administration. Si le vaccin est destiné à des animaux gestants, effectuez l'essai chez ces animaux aux stades auxquels l'administration du vaccin n'est pas contre-indiquée, et prolongez la période d'observation au moins jusqu'à la mise bas. Observez les animaux et enregistrez tout effet sur la gestation ou la progéniture. Dans des cas très particuliers, tels que les immunosérums, lorsqu'il est avéré que l'administration d'une surdose n'est pas indiquée et que l'essai n'est pas effectué, les dangers potentiels associés à un surdosage doivent être clairement signalés dans les documents accompagnant le produit.

**Innocuité de l'administration répétée d'une dose unique**. L'administration répétée d'une dose unique peut être nécessaire pour mettre en évidence les effets indésirables éventuellement associés à ce type de situation. Ces essais sont particulièrement importants lorsque le produit (notamment un immunosérum) est susceptible d'être administré à plusieurs reprises sur un laps de temps relativement court. Ils sont conduits sur les catégories d'animaux les plus sensibles de l'espèce cible, par chaque voie d'administration recommandée. Le nombre d'administrations doit être au moins égal au nombre maximal recommandé ; pour les vaccins, ceci tient compte du nombre d'administrations pour la primo-vaccination et le premier rappel ; pour les immunosérums, ceci tient compte du nombre d'administrations requis pour le traitement. L'intervalle de temps séparant les administrations doit être approprié (par exemple période à risque ou durée de traitement requise) et compatible avec le mode d'emploi recommandé du produit. Dans le cas des vaccins, pour des raisons de commodité, il est admis d'utiliser lors de l'étude des intervalles plus courts que ceux recommandés sur le terrain, mais un intervalle d'au moins 14 jours doit être maintenu entre les administrations pour permettre le développement d'éventuelles réactions d'hypersensibilité. En revanche, pour les immunosérums, l'administration suivra le schéma recommandé. Les animaux sont placés en observation et examinés au moins 1 fois par jour pendant au moins 14 jours après la dernière administration, pour voir s'ils présentent des signes de réactions générales ou locales. D'autres critères objectifs doivent également être enregistrés, par exemple la température corporelle des mammifères et les indices de performance.

**Résidus**. Dans le cas de vaccins vivants dirigés contre des zoonoses bien connues, il peut être nécessaire d'effectuer une recherche de l'organisme vaccinal résiduel au point d'injection, en plus des études de dissémination décrites ci-après.

**Effets indésirables sur les fonctions immunologiques**. Lorsque l'administration d'un produit peut affecter négativement le système immunologique de l'animal auquel le produit est administré ou de sa descendance, des essais appropriés portant sur les fonctions immunologiques sont effectués.

**Effets indésirables des interactions**. Des études doivent être effectuées pour démontrer l'absence d'effets indésirables des interactions sur l'innocuité du produit, lorsqu'il est recommandé d'administrer le produit simultanément ou dans le cadre d'un programme d'administration de plusieurs produits sur une courte période.

**Exigences particulières s'appliquant aux vaccins vivants**. Pour les vaccins vivants, les essais de laboratoire suivants doivent aussi être effectués.

*a) Diffusion de la souche vaccinale*. La possibilité d'une transmission de la souche vaccinale des animaux vaccinés à des animaux non vaccinés de l'espèce cible sera étudiée, en utilisant la voie d'administration recommandée la plus favorable à une diffusion. Il peut être nécessaire également d'étudier les risques de transmission de la souche à des espèces non cibles pouvant présenter une sensibilité élevée à un vaccin vivant. Il convient d'évaluer le nombre possible de transmissions d'animal à animal dans des circonstances normales, ainsi que leurs conséquences prévisibles.

*b) Dissémination dans l'organisme de l'animal vacciné.* La présence de la souche vaccinale est recherchée dans les fèces, l'urine, le lait, les oeufs, et les sécrétions orales, nasales et autres. Il peut également être nécessaire d'étudier la dissémination de la souche vaccinale dans l'organisme, en portant une attention particulière aux sites où s'effectue de préférence la multiplication. Cette étude est obligatoire dans le cas des vaccins vivants dirigés contre des zoonoses bien connues et administrés à des animaux destinés à l'alimentation.

*c) Augmentation de virulence.* Utilisez la souche au niveau de passage dont on peut s'attendre à ce qu'il soit le plus virulent pour l'espèce cible entre le lot de semence primaire et le produit fini. Les animaux utilisés sont d'un âge approprié pour la récupération du virus et les animaux de tous les groupes sont de cet âge au moment de l'inoculation. Une première vaccination est effectuée par la voie d'administration recommandée la plus favorable au retour à la virulence. Par la suite, au moins 5 passages supplémentaires sont entrepris en série, d'animal à animal, au sein de l'espèce cible. Les passages sont réalisés par la voie d'administration la plus favorable au retour à la virulence. Si les propriétés du virus permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon un passage tel que décrit dans chaque monographie est effectué et une recherche d'augmentation de la virulence est pratiquée sur le virus récupéré au niveau du passage le plus élevé. Chaque passage comprendra au moins 2 animaux. A chaque passage, la présence de microorganismes vivants dérivés du vaccin dans le substrat utilisé pour le passage sera démontrée. L'innocuité de la souche retrouvée au niveau de passage le plus élevé est comparée à celle de la souche d'origine.

Pour des virus particuliers, la monographie peut exiger un nombre de passages et, pour chaque passage, un nombre d'animaux plus élevés si les données disponibles en indiquent l'intérêt. Le dernier passage, au moins, est effectué avec des animaux de la catégorie la plus appropriée à l'évaluation du risque potentiel.

*d) Propriétés biologiques de la souche vaccinale.* Il peut être nécessaire de conduire d'autres essais pour déterminer aussi précisément que possible les propriétés biologiques intrinsèques de la souche vaccinale (neurotropisme, par exemple). Dans le cas de vaccins utilisant des vecteurs, une évaluation du risque de modification du tropisme ou de la virulence de la souche et, si nécessaire, des essais spécifiques sont effectués. De tels essais sont systématiquement effectués si le produit d'un gène étranger est incorporé dans la souche en tant que protéine structurelle.

*e) Recombinaison ou réassortiment génomique de la souche.* La probabilité de recombinaison ou de réassortiment génomique avec la souche sauvage ou d'autres souches est prise en considération.

B. ESSAIS SUR LE TERRAIN

Les résultats des essais de laboratoire doivent normalement être complétés et confirmés par des données obtenues lors d'études sur le terrain. Sous réserve que les essais de laboratoire aient évalué l'innocuité et l'efficacité d'un produit de façon adéquate, dans des conditions expérimentales utilisant des vaccins de titre ou d'activité respectivement maximal(e) ou minimal(e), un lot unique de produit peut être utilisé pour évaluer à la fois l'innocuité et l'efficacité sur le terrain. Dans ce cas, un lot de routine représentatif, de titre ou d'activité intermédiaire, peut être utilisé.

Dans le cas de mammifères destinés à l'alimentation, des mesures de température corporelle sont effectuées avant et après administration du produit sur un nombre suffisamment élevé d'animaux ; dans le cas d'autres espèces de mammifères, de telles mesures peuvent être effectuées si les essais de laboratoire en indiquent l'intérêt. L'ampleur et la persistance de toute réaction locale et la proportion d'animaux manifestant des réactions locales ou générales sont notées. Il convient également, dans les cas appropriés, d'effectuer des mesures de performances.

Dans le cas de poulets de chair, les indices de performance comprennent la mortalité hebdomadaire, les indices de consommation, l'âge d'abattage et le poids, ainsi que la dévalorisation et les rebuts sur le site de production. Pour les vaccins destinés à des oiseaux de ponte ou à des oiseaux pouvant servir pour la ponte, une étude des effets du vaccin sur les performances de ponte et sur l'éclosion est effectuée, suivant le cas.

C. ÉCOTOXICITÉ

Une évaluation des effets nocifs du produit sur l'environnement est effectuée et les précautions nécessaires pour réduire ces risques sont identifiées. L'étendue d'exposition de l'environnement au produit est estimée en tenant compte de l'espèce cible, du mode d'administration et de l'excrétion du produit. Si ces facteurs indiquent qu'il y aura une exposition significative de l'environnement au produit, l'écotoxicité potentielle est évaluée en tenant compte des propriétés du produit.

**04/2008:50207**

# 5.2.7. ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DES VACCINS ET IMMUNOSÉRUMS VÉTÉRINAIRES

Le terme « produit » utilisé dans le texte définit soit un vaccin soit un immunosérum.

Pendant le développement du produit, son efficacité est démontrée par des essais, pour chaque voie et mode d'administration recommandés, sur chacune des espèces et catégories auxquelles il est destiné, en utilisant le schéma proposé. La nature des essais d'efficacité est très variable suivant le type de produit considéré.

Les essais indiqués dans la rubrique Production des monographies peuvent être effectués dans le cadre des essais de développement nécessaires à la démonstration de l'efficacité. Il convient de tenir compte des considérations suivantes.

La dose à utiliser pour les essais est égale à la dose ou quantité recommandée, pour un produit ayant le titre minimal ou l'activité minimale admis à la fin de la période de validité.

Pour les vaccins vivants, utilisez un vaccin contenant le virus/la bactérie au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

Pour les immunosérums, dans les cas appropriés, la dose examinée doit également contenir des quantités minimales d'immunoglobuline ou de gammaglobuline et/ou de protéines totales.

Les essais d'efficacité doivent confirmer toutes les indications déclarées du produit. Par exemple, si celui-ci est censé conférer une protection contre les maladies respiratoires, il sera au moins démontré qu'une protection contre les signes cliniques de maladie respiratoire est assurée. Lorsque le produit est censé assurer une protection anti-infectieuse, ceci sera démontré par des techniques de réisolement. Si le produit a plusieurs indications, son efficacité sera démontrée pour chacune d'elles.

*Vaccins.* L'influence sur l'efficacité du vaccin de la présence d'anticorps acquis de façon passive ou transmis par la mère sera évaluée de façon adéquate. Toute déclaration ou indication implicite concernant le délai d'action du vaccin et la durée de protection assurée sera corroborée par des résultats d'études.

La durée déclarée de l'immunité est étayée par des éléments prouvant la protection. Il n'est pas nécessaire d'utiliser le modèle d'essai décrit sous Pouvoir immunogène et/ou sous Activité pour étayer les déclarations liées à la durée de l'immunité que procure un vaccin.

Pour les vaccins combinés et multivalents, l'efficacité de chaque composant sera démontrée en utilisant le vaccin combiné.

*Immunosérums.* Une attention particulière doit être portée à l'apport de données étayant la démonstration de l'efficacité du schéma recommandé. Par exemple, s'il est recommandé de n'administrer l'immunosérum qu'une seule fois pour fournir un effet prophylactique ou thérapeutique, ceci devra être démontré. Toute indication, déclarée ou implicite, concernant le début et la durée de la protection ou de l'effet thérapeutique doit être appuyée par des données issues d'essais. Par exemple, la durée de la protection permise par une dose prophylactique d'un antisérum doit être étudiée afin de pouvoir fournir à l'utilisateur des indications appropriées sur l'étiquette.

Des études de compatibilité immunologique sont conduites lorsque l'administration simultanée de plusieurs produits est recommandée ou lorsqu'elle fait partie du schéma d'administration habituel. Lorsqu'un produit fait partie d'un schéma d'administration recommandé, son rôle en tant que primo-vaccin ou vaccin de rappel, ou sa contribution à l'efficacité du schéma dans son ensemble est démontrée.

ÉPREUVES DE LABORATOIRE

En principe, la démonstration de l'efficacité est conduite en laboratoire dans des conditions contrôlées, par épreuve sur l'animal cible dans les conditions d'emploi recommandées.

Dans la mesure du possible, les conditions de réalisation de l'épreuve reproduisent les conditions d'infection naturelles, par exemple pour ce qui est du nombre de microorganismes utilisés et de la voie d'administration employée.

*Vaccins.* Sauf exception justifiée, l'épreuve est effectuée au moyen d'une souche différente de celle utilisée pour la production du vaccin.

Il convient, si possible, de déterminer quel est le type de mécanisme immunitaire (cellulaire/humoral, local/général, classe d'immunoglobuline) qui résulte de l'administration du vaccin aux animaux cibles.

*Immunosérums.* Des données doivent être fournies en ce qui concerne les mesures des teneurs en anticorps atteintes chez l'espèce cible après administration du produit, selon les recommandations. Lorsque des données publiées appropriées existent, des renvois aux textes publiés pertinents, relatifs aux taux d'anticorps protecteurs, doivent être faits et les études d'épreuves doivent être évitées.

Si des épreuves sont nécessaires, elles peuvent être faites avant ou après l'administration du produit, en accord avec les indications et revendications spécifiques au produit.

ÉPREUVES SUR LE TERRAIN

De façon générale, les résultats des épreuves en laboratoire sont complétés par des données obtenues lors d'épreuves sur le terrain, effectuées, sauf exception justifiée, sur des animaux témoins non traités. Sous réserve que les essais de laboratoire aient évalué l'innocuité et l'efficacité d'un produit de façon adéquate, dans des conditions expérimentales utilisant des vaccins de titre ou d'activité respectivement maximal ou minimal, un lot unique de produit peut être utilisé pour évaluer à la fois l'innocuité et l'efficacité sur le terrain. Dans ce cas un lot de routine représentatif, de titre ou d'activité intermédiaire, peut être utilisé. Lorsque les épreuves en laboratoire ne permettent pas de démontrer l'efficacité, il peut être admis d'effectuer seulement des épreuves sur le terrain.

**01/2008:50208**

# 5.2.8. RÉDUCTION DU RISQUE DE TRANSMISSION DES AGENTS DES ENCÉPHALOPATHIES SPONGIFORMES ANIMALES PAR LES MÉDICAMENTS À USAGE HUMAIN ET VÉTÉRINAIRE

*Ce chapitre est identique à la « Note explicative concernant la réduction du risque de transmission des agents des encéphalopathies spongiformes animales par les médicaments à usage humain et vétérinaire » - Révision 2, octobre 2003 [Comité des spécialités pharmaceutiques (CSP), Comité des médicaments vétérinaires (CMV), Agence européenne pour l'évaluation des médicaments].*

## Contenu



## 1. INTRODUCTION

### 1-1. *CONTEXTE SPÉCIFIQUE*

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) sont des maladies neurodégénératives chroniques caractérisées par l'accumulation d'une isoforme anormale d'une glycoprotéine cellulaire baptisée PrP (ou protéine du prion). L'isoforme anormale de la PrP ($PrP^{Sc}$) diffère de la PrP normale ($PrP^{c}$) par sa résistance élevée aux traitements dénaturants par les protéases ou la chaleur. La $PrP^{Sc}$ est considérée comme étant l'agent infectieux responsable de la transmission des maladies de l'EST.

Les maladies de l'EST chez les animaux comprennent :

- l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) chez les bovins,
- la tremblante chez les moutons et les chèvres,
- la maladie du dépérissement chronique des cervidés (cerfs et wapitis),
- l'encéphalopathie transmissible du vison d'élevage,
- l'encéphalopathie spongiforme féline (ESF) chez les félidés (notamment les chats domestiques et les grands félidés en captivité), et
- l'encéphalopathie spongiforme des ongulés exotiques dans les parcs zoologiques.

Chez les humains, les encéphalopathies spongiformes comprennent différentes formes de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), le Kuru, le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) et l'Insomnie Fatale Familiale (IFF).

Des cas de transmission iatrogène des encéphalopathies spongiformes ont été signalés. Chez le mouton, la tremblante a été transmise accidentellement suite à l'utilisation d'un vaccin contre le virus Louping Ill préparé à partir d'un mélange de cerveaux et de rates ovins traités au formol dans lequel avait été incorporé par inadvertance du tissu provenant d'un mouton infecté par la tremblante. Chez l'homme, des cas de transmission de la MCJ ont été rapportés. Ces derniers ont été attribués à l'administration parentérale répétée d'hormones de croissance et de gonadotrophine provenant d'hypophyses de cadavres humains. Des cas de MCJ ont également été attribués à l'utilisation d'instruments contaminés en chirurgie cérébrale et à la transplantation de méninges et de cornées humaines.

La transmission des EST entre les espèces est restreinte par un certain nombre de barrières naturelles, la transmissibilité étant affectée par l'espèce d'origine, la souche et la dose du prion, la voie d'exposition et, chez certaines espèces, par l'allèle hôte du gène PrP. Les barrières entre espèces peuvent être franchies dans des circonstances appropriées.

L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) a été notifiée pour la première fois au Royaume-Uni en 1986. Un grand nombre de bovins et de troupeaux individuels ont été affectés. Il est clair que l'ESB est une maladie transmise par la nourriture et qu'elle est associée à une alimentation à base de viande et d'os provenant d'animaux affectés par une EST. Des cas d'ESB ont été rencontrés dans d'autres pays, soit chez des animaux importés du Royaume-Uni, soit chez des animaux indigènes. Il existe des indices probants démontrant que la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJv) est due à l'agent responsable de l'ESB chez les bovins. Une démarche prudente demeure donc justifiée dans le cas où des matières biologiques issues d'espèces naturellement affectées par les maladies de l'EST, notamment l'espèce bovine, sont utilisées pour la fabrication de médicaments.

La tremblante du mouton est répandue à travers le monde et des cas sont apparus dans la plupart des pays d'Europe. L'incidence la plus élevée se rencontre au Royaume-Uni. Bien que les humains aient été exposés à la tremblante naturelle depuis plus de 200 ans, aucune donnée épidémiologique ne permet d'établir un lien direct entre la tremblante et les formes humaines d'encéphalopathies spongiformes. Il subsiste cependant le risque théorique et à présent non quantifiable que des moutons aient été nourris avec des suppléments alimentaires protéiques contaminés par l'ESB. Si une telle alimentation cause une infection récidivante chez les moutons, cette dernière peut entraîner un diagnostic de tremblante et constituer en tant que telle un risque d'EST humaine. En outre, il doit être admis que tout agent de l'ESB introduit dans la population des petits ruminants via une alimentation contaminée est susceptible d'être recyclé et amplifié.

1-2. *CONFORMITÉ RÉGLEMENTAIRE*

**Evaluation du risque**. Etant donné que l'utilisation de matières d'origine animale est inévitable pour la production de certains médicaments et que l'élimination complète de tout risque à la source est rarement possible, les mesures prises pour gérer le risque de transmission des EST animales via les médicaments visent à réduire le risque au minimum plutôt qu'à l'éliminer. En conséquence, la conformité réglementaire devrait être fondée sur une évaluation du risque, prenant en considération tous les facteurs pertinents identifiés du présent chapitre (voir plus bas).

**Aspects juridiques**. La note explicative a pris force de loi en vertu de l'annexe I des directives 2001/82/CE et 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil [modifiées par la directive 2003/65/CE[(1)]] relatives aux médicaments à usage vétérinaire et humain respectivement. Ces directives disposent que les demandeurs d'autorisation de mise sur le marché de médicaments à usage humain et vétérinaire démontrent que les médicaments sont fabriqués conformément à la version la plus récente de la présente note explicative publiée au *Journal officiel de l'Union européenne*. Cette obligation persiste après l'octroi de l'autorisation de mise sur le marché.

Par définition, le principe de matériels à risque spécifiés défini dans le règlement (CE) nº 999/2001 du Parlement européen et du Conseil[(2)] ne s'applique pas aux médicaments. L'utilisation de substances dérivées de tissus à infectiosité élevée doit être pleinement justifiée après une évaluation des risques/avantages appropriée (voir plus loin).

La note explicative est à lire en conjonction avec les différents actes juridiques communautaires, notamment les décisions de la Commission progressivement mises en oeuvre depuis 1991. Le cas échéant, des renvois à ces décisions sont fournis dans le texte. Les avis écrits et les notes explicatives du Comité des spécialités pharmaceutiques (CSP) et du Comité des médicaments vétérinaires (CMV) restent d'application pour des besoins de conformité réglementaire, sauf indication contraire de la note explicative.

La monographie générale *Produits comportant un risque de transmission d'agents d'encéphalopathies spongiformes animales* de la Pharmacopée Européenne renvoie au présent chapitre qui est identique à la note explicative. Cette monographie constitue la base permettant la délivrance des certificats de conformité, en tant que procédure visant à démontrer la conformité EST pour les substances et matières utilisées dans la fabrication de médicaments à usage humain et vétérinaire.

**Clarification de la note explicative**. Comme la compréhension scientifique des EST, et en particulier de la pathogenèse des maladies, est en cours d'évolution, le CSP et son groupe de travail Biotechnologie, en collaboration avec le CMV et son groupe de travail Immunologie pourront être tenus à l'avenir de mettre au point des orientations supplémentaires sous forme d'avis écrits ou de notes explicatives aux fins de clarifier la note explicative. Ces orientations supplémentaires seront publiées par la Commission et sur le site Web de l'Agence européenne pour l'évaluation des médicaments (AEEM) et prises de ce fait en considération dans le cadre de la certification de la Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé (DEQM).

**Mise en application de la note explicative révisée**. La conformité de tous les médicaments autorisés dans l'Union Européenne à la présente note explicative concernant la réduction du risque de transmission des agents des encéphalopathies spongiformes animales par les médicaments à usage humain et vétérinaire (EMEA/410/01 Rév. 1) a été établie conformément à l'exigence juridique figurant à l'annexe I des directives 2001/82/CE (médicaments à usage vétérinaire) ou 2001/83/CE modifiées par la directive 2003/63/CE (médicaments à usage humain). La note explicative révisée doit être appliquée de façon dynamique, c'est-à-dire pour tous les médicaments qui seront autorisés ou dont l'autorisation de mise sur le marché sera renouvelée après la date d'entrée en vigueur de la note explicative révisée.

## 2. PORTÉE DU CHAPITRE

*ESPÈCES ANIMALES CONCERNÉES PAR LES EST*

Les bovins, les moutons, les chèvres et les animaux qui sont naturellement susceptibles d'être infectés par les agents des encéphalopathies spongiformes transmissibles ou susceptibles d'être infectés par la voie orale autres que les primates humains[(3)] ou non humains sont définis comme des « espèces animales concernées par les EST »[(4)].

*MATIÈRES*

Le présent chapitre concerne les matières dérivées d'« espèces animales concernées par les EST » utilisées pour la préparation de :

- substances actives,
- excipients et adjuvants,
- matières premières et réactifs entrant dans le processus de fabrication (par exemple sérum-albumine bovine, enzymes, milieux de culture y compris ceux utilisés pour préparer

(1) JO L 159 du 27.6.2003, p. 46.
(2) JO L 147 du 31.5.2001, p.1.
(3) Des explications réglementaires et des avis écrits ont été publiés par le Comité des spécialités pharmaceutiques et son groupe de travail Biotechnologie sur les médicaments dérivés de tissus humains au regard de la MCJ et de la MCJv. Ces explications figurent sur le site http://www.emea.eu.int
(4) Les porcs et les oiseaux, espèces animales d'un intérêt particulier pour la production de médicaments, ne sont pas sensibles à une infection naturelle par voie orale. En conséquence, ce ne sont pas des espèces animales concernées par les EST au sens du présent chapitre. De même, les chiens, les lapins et les poissons ne sont pas non plus des espèces animales concernées par les EST au sens du présent chapitre.

les banques de cellules de travail ou de nouvelles banques de cellules primaires pour des médicaments soumis à une nouvelle autorisation de mise sur le marché).

Le présent chapitre s'applique également à des matières qui entrent en contact direct avec les appareils utilisés lors de la fabrication du médicament ou qui entrent en contact avec le médicament et qui disposent donc d'un potentiel de contamination.

Les matières utilisées lors de la validation des usines et des équipements, comme les milieux de culture utilisés dans les essais de répartition simulée pour valider le procédé de remplissage aseptique, doivent être considérées comme conformes au présent chapitre pour autant que le ou les constituants proviennent de tissus dépourvus d'infectiosité décelable (tissus de catégorie C), pour lesquels le risque de contamination croisée avec des tissus potentiellement infectieux a été considéré (voir la section 3-3) et qui proviennent d'un pays de RGE I/II (voir la section 3-2). Ces informations doivent figurer dans le dossier d'autorisation de mise sur le marché et être vérifiées lors des inspections de routine relatives à la conformité aux bonnes pratiques de fabrication (BPF).

D'autres matières, comme les agents de nettoyage, les adoucissants et les lubrifiants qui entrent en contact avec le médicament lors de sa fabrication de routine ou au stade de la finition ou de l'emballage primaire sont considérées comme conformes au présent chapitre si elles sont dérivées du suif dans les conditions décrites dans la section 6.

*LOTS DE SEMENCE, BANQUES DE CELLULES ET FERMENTATION/PRODUCTION DE ROUTINE*[(5)]

Aux fins de la conformité réglementaire, les semences primaires ou les banques de cellules primaires figurant dans les demandes d'autorisation de mise sur le marché présentées après le 1er juillet 2000 (pour les médicaments à usage humain) ou après le 1er octobre 2000 (pour les médicaments à usage vétérinaire) sont couvertes par la note explicative.

Les semences primaires et les banques de cellules primaires,

- pour les antigènes de vaccins,
- pour un médicament issu d'un procédé biotechnologique au sens de la partie A de l'annexe du règlement (CEE) nº 2309/93 du Conseil, et
- pour d'autres médicaments utilisant des lots de semences et des systèmes de banques de cellules lors de leur fabrication,

qui ont déjà fait l'objet d'une approbation pour la fabrication d'un constituant d'un médicament autorisé seront considérées comme conformes à la note explicative, même si elles sont incorporées dans des demandes d'autorisation de mise sur le marché présentées après le 1er juillet 2000 (pour des médicaments à usage humain) ou après le 1er octobre 2000 (pour des médicaments à usage vétérinaire).

Il doit être établi que les banques de cellules primaires et les semences primaires établies avant le 1er juillet 2000 (pour les médicaments à usage humain) ou après le 1er octobre 2000 (pour les médicaments à usage vétérinaire), mais pas approuvées comme constituants d'un médicament autorisé, satisfont aux exigences de la note explicative. Si les preuves documentées complètes relatives à une matière première ou à des réactifs utilisés pour la mise au point de ces banques de cellules où ces semences ne sont pas/plus disponibles, le demandeur doit présenter une évaluation du risque décrite dans la section 4 de la note explicative.

Les semences de travail ou les banques de cellules établies utilisées pour la fabrication de médicaments autorisés avant le 1er juillet 2000 (pour les médicaments à usage humain) ou avant le 1er octobre 2000 (pour les médicaments à usage vétérinaire), qui ont fait l'objet d'une évaluation du risque menée de façon appropriée par une autorité compétente des Etats membres ou par l'AEEM et déclarée acceptable, doivent également être considérées comme conformes.

Cependant, si des matières dérivées d'« espèces animales concernées par les EST » sont utilisées dans des procédés de fermentation/production de routine ou dans l'établissement de semences de travail ou de banques de cellules de travail, le demandeur doit démontrer qu'elles satisfont aux exigences de la note explicative.

3. CONSIDÉRATIONS D'ORDRE GÉNÉRAL

3-1. *PRINCIPES SCIENTIFIQUES RELATIFS À LA RÉDUCTION DU RISQUE*

Lorsque les fabricants ont le choix, l'utilisation de matières provenant d'« espèces animales non concernées par les EST » sera préférée. La justification de l'utilisation de matières dérivées d'« espèces animales concernées par les EST » plutôt que de matières provenant d'« espèces non concernées par les EST » ou d'origine non animale devra être fournie. Si des matières d'« espèces animales concernées par les EST » doivent être utilisées, toutes les mesures nécessaires pour réduire le risque de transmission des EST devront être prises en considération.

Des tests diagnostiques facilement applicables pour déterminer l'infectiosité EST *in vivo* ne sont pas encore disponibles. Le diagnostic se base sur une confirmation post-mortem de lésions cérébrales caractéristiques par histopathologie et/ou détection de la $PrP^{Sc}$ par Western blot ou immunodosage. La démonstration de l'infectiosité par l'inoculation de tissus suspects à une espèce cible ou à des animaux de laboratoire est également utilisée pour confirmation. Cependant, du fait des longues périodes d'incubation de toutes les EST, les résultats d'essais *in vivo* ne sont disponibles qu'après plusieurs mois ou plusieurs années.

L'utilisation de plusieurs tests diagnostiques *in vitro* pouvant déceler la $PrP^{Sc}$ dans des échantillons de cerveaux provenant d'animaux infectés a été approuvée, mais ces tests sont pour la plupart moins sensibles que les dosages d'infectiosité *in vivo*. Néanmoins, le dépistage des animaux sources par des essais *in vitro* peut empêcher l'utilisation d'animaux aux derniers stades d'incubation de la maladie et peut fournir des informations sur le statut épidémiologique d'un pays ou d'une région donnés.

La réduction des risques de transmission des EST se fonde sur trois paramètres complémentaires :

- les animaux sources et leur origine géographique,
- la nature de la matière animale utilisée lors de la fabrication et toutes les procédures en place pour éviter une contamination croisée avec des matières à plus haut risque,
- le/les procédés de production, y compris le système d'assurance de la qualité en place pour garantir la reproductibilité et la traçabilité du produit.

3-2. *ANIMAUX SOURCES*

Les matières sources utilisées pour la reproduction de matières destinées à la fabrication de médicaments doivent être dérivées d'animaux aptes à la consommation humaine après inspection *ante* et post-mortem conformément aux conditions de la Communauté ou à des conditions équivalentes (pays tiers), à l'exception des matières provenant d'animaux vivants dont la bonne santé doit être établie par un examen clinique.

3-2-1. **Origine géographique**

3-2-1-1. *Matières bovines.* Deux organisations sont actuellement impliquées dans l'évaluation du statut ESB d'un pays ou d'une zone spécifiés. Premièrement, l'organisation internationale des épizooties (OIE)[(6)] établit les critères relatifs à l'évaluation du statut des pays dans le chapitre du code sanitaire international pour les animaux concernant l'encéphalopathie spongiforme

(5) Voir aussi : Avis écrit concernant l'évaluation des risques de transmission des agents des encéphalopathies spongiformes animales par les semences mères utilisées pour la production de vaccins vétérinaires (EMEA/CMV/019/01 - février 2001) adopté par le Comité des médicaments vétérinaires (CMV) en juillet 2001, *Journal officiel des Communautés européennes* C 286 du 12.10.2001, p. 12.
(6) http://www.oie.int

bovine. L'OIE fournit également une liste des cas signalés d'ESB dans le monde. Deuxièmement, le comité scientifique directeur de la Commission européenne (CSD)*(7)* a établi un système de classification des pays en fonction de leurs risques géographiques d'ESB (RGE).

Le règlement (CE) nº 999/2001 du Parlement européen et du Conseil fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies spongiformes transmissibles (règlement EST)*(2)* est entré en vigueur le 1er juillet 2001. Bien que les médicaments, les dispositifs médicaux et les cosmétiques soient exclus du champ d'application de ce règlement, les principes liés à la détermination du statut ESB doivent être pris en compte lors de la répartition du statut ESB d'un pays ou d'une région donnés en différentes catégories.

Pour les besoins du présent chapitre, la classification RGE du CSD doit être utilisée comme indicateur du statut d'un pays donné. Cependant, si des pays sont classés selon le règlement (CE) nº 999/2001, cette catégorisation doit être utilisée.

*Classification du comité scientifique directeur de la Commission européenne*

La classification du comité scientifique directeur européen relative au risque géographique d'ESB (RGE) fournit une indication du niveau de probabilité de la présence d'un ou de plusieurs bovins atteints d'une infection clinique ou préclinique par l'ESB dans un pays ou une région donnés. Une définition des quatre catégories est fournie dans le tableau suivant.

| Niveau du RGE | Présence d'un ou de plusieurs bovins cliniquement ou précliniquement infectés par l'ESB dans une région géographique/un pays |
|---|---|
| I | Très peu probable |
| II | Peu probable mais pas exclue |
| III | Possible mais non confirmée ou confirmée à un niveau peu élevé |
| IV | Confirmée à un niveau élevé*(1)* |

*(1)* ≥ 100 cas / 1 million de bovins adultes par an.

Les rapports d'évaluation des RGE des pays sont disponibles sur le site Internet du CSD*(8)*. Si le statut ESB d'un pays n'a pas été classifié par le CSD, une évaluation du risque sera soumise en tenant compte des critères utilisés par le CSD pour la classification RGE.

Si un choix existe, les animaux devraient provenir de pays ayant un RGE le plus bas possible, à moins que l'utilisation de matière provenant de pays à RGE plus élevé ne soit justifiée. L'approvisionnement en certaines matières parmi celles identifiées dans la section 6, « Conditions spécifiques », peut se faire auprès de pays à RGE de niveau III ou, dans certains cas, de niveau IV, sous réserve que les contrôles et exigences spécifiés ci-après dans les sections concernées soient appliqués. Mis à part ces exceptions, les animaux ne doivent pas provenir de pays à RGE de niveau IV, et en cas d'utilisation d'animaux issus de pays à RGE de niveau III, les justifications doivent systématiquement être fournies.

3-2-1-2. *Moutons et chèvres (petits ruminants).* Des cas cliniques de tremblante naturelle ont été signalés dans un certain nombre de pays à travers le monde. Un diagnostic erroné de tremblante chez le mouton atteint d'ESB pouvant aisément se produire, et par mesure de précaution, l'approvisionnement en matières dérivées de petits ruminants devra tenir compte de la prévalence dans le pays des deux maladies - ESB et tremblante - et des tissus desquels les matières sont dérivées.

Les principes liés aux « troupeaux de bovins à risque d'ESB négligeable (fermés) » (voir section 3-2-2) peuvent également s'appliquer dans le contexte des petits ruminants afin de mettre au point un cadre de travail permettant de définir le statut EST d'un élevage de petits ruminants. En ce qui concerne les moutons, du fait des inquiétudes liées à la possibilité d'ESB chez le mouton, l'utilisation d'un ou de plusieurs génotypes dont la résistance à une infection par l'ESB/la tremblante a été établie devra être prise en considération lors de l'établissement d'élevages exempts d'EST. Cependant, la sensibilité spécifique d'un génotype n'a pas suffisamment été étudiée chez les chèvres.

Les matières issues de petits ruminants devront de préférence provenir de pays ayant de longs antécédents d'absence de tremblante comme la Nouvelle-Zélande ou l'Australie, ou d'élevages dont il est établi qu'ils sont exempts d'EST. Une justification sera exigée en cas de matière d'origine différente.

3-2-2. **Troupeaux de bovins à risque d'ESB négligeable (fermés)**. L'approvisionnement le plus sûr se fait auprès de pays où la présence d'ESB est très improbable, c'est-à-dire auprès de pays à RGE de niveau I. D'autres pays peuvent présenter ou avoir présenté des cas d'ESB à un certain moment, aussi le concept pratique de « troupeaux de bovins à risque d'ESB négligeable (fermés) » a-t-il été mis au point par le CSD et approuvé par le CSP et le CMV. Les critères relatifs à l'établissement et au maintien d'un « troupeau de bovins à risque d'ESB négligeable (fermés) » sont spécifiés dans l'avis du CSD des 22-23 juillet 1999*(9)*.

Il n'est pas possible pour le moment de quantifier la réduction du risque géographique d'ESB chez les bovins issus de troupeaux de bovins à risque d'ESB négligeable (fermés). Cette réduction du risque est cependant supposée importante. L'approvisionnement auprès de tels troupeaux fermés de bovins devra donc être pris en considération pour l'évaluation du risque, en conjonction avec la classification RGE du pays.

3-3. *PARTIES D'ANIMAUX, LIQUIDES CORPORELS ET SECRÉTIONS UTILISÉS COMME MATIÈRES PREMIÈRES*

Chez un animal infecté par une EST, les niveaux d'infectiosité varient selon les organes*(10)*. Les tableaux présentés en annexe au présent chapitre*(11)* résument les données actuelles concernant la répartition de l'infectiosité et de la $PrP^{Sc}$ chez les bovins atteints d'ESB, et chez les moutons ou les chèvres atteints de tremblante.

Les informations figurant dans les tableaux se fondent exclusivement sur les observations de maladies survenues naturellement ou par infection expérimentale primaire par voie orale (chez les bovins) mais n'incluent pas de données liées à des modèles utilisant des souches d'EST adaptées aux animaux d'expérimentation car les phénotypes de souches ayant subi plusieurs passages peuvent différer de façon significative et imprévisible des phénotypes de la maladie naturelle. Etant donné qu'il a été prouvé que la détection immunohistochimique et/ou par Western blot de protéines hôtes mal repliées ($PrP^{Sc}$) constituait un critère de substitution de l'infectiosité, les résultats d'essais de la $PrP^{Sc}$ ont été présentés parallèlement aux données du biodosage. Les tissus sont groupés en trois catégories majeures d'infectiosité, sans lien avec l'avancement de la maladie :

(7) Le comité scientifique directeur établi par la décision 97/404/CE de la Commission doit assister la Commission afin d'obtenir le meilleur avis scientifique possible sur les questions liées à la santé des consommateurs. Depuis mai 2003, l'Agence européenne de sécurité alimentaire (AESA) l'a remplacé dans ses fonctions : http://www.efsa.eu.int
(8) http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html
(9) Avis scientifique du CSD sur les conditions liées aux « troupeaux de bovins à risque d'ESB négligeable (fermés) » adopté lors de la réunion des 22 et 23 juillet 1999. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out56_en.html
(10) Si des matières provenant d'« espèces animales concernées par les EST » doivent être utilisées, l'utilisation de matières appartenant à une catégorie de risque faible devra être prise en considération.
(11) Les tableaux de classification des tissus se basent sur l'orientation de l'OMS *WHO guidelines on transmissible spongiform encephalopathies in relation to biological and pharmaceutical product* la plus récente (février 2003) WHO/BCT/QSD/03.01.

5. Textes généraux

| | |
|---|---|
| **Catégorie A** | **Tissus à infectiosité élevée**<br><br>Tissus du système nerveux central (SNC) qui atteignent un titre infectieux élevé dans les derniers stades de toutes les EST, et certains tissus anatomiquement associés au SNC |
| **Catégorie B** | **Tissus à infectiosité faible**<br><br>Tissus périphériques à infectiosité positive et/ou $PrP^{Sc}$ positifs dans au moins une des formes d'EST |
| **Catégorie C** | **Tissus sans infectiosité décelable**<br><br>Tissus dont l'examen n'a révélé aucune infectiosité, et/ou dont la recherche de $PrP^{Sc}$ a donné des résultats négatifs |

Les tissus de catégorie A et les substances qui en dérivent ne doivent pas être utilisés pour la fabrication de médicaments, sauf justification contraire (voir section 5).

Bien qu'il soit quasiment certain que la catégorie des tissus à risque faible (tissus de catégorie B) inclue des tissus (par exemple le sang) présentant un risque plus faible que d'autres (par exemple les tissus lymphoréticulaires), les données relatives aux niveaux d'infectiosité de ces tissus sont trop limitées pour subdiviser la catégorie en différents niveaux de risque. Il est en outre évident que le placement d'un tissu donné dans une catégorie ou une autre peut être spécifique de la maladie ou de l'espèce, et sujet à révision au fur et à mesure de l'émergence de données nouvelles.

En ce qui concerne l'évaluation du risque (voir section 4), les fabricants et/ou les demandeurs/détenteurs d'autorisation de mise sur le marché doivent tenir compte des tableaux de classification des tissus en annexe au présent chapitre*(12)*.

Les catégories présentées dans les tableaux ne sont fournies qu'à titre indicatif et il est important de noter les points suivants.

– Dans certaines situations, il peut y avoir contamination croisée entre tissus de catégories d'infectiosité différentes. Le risque potentiel sera influencé par les circonstances dans lesquelles les tissus ont été prélevés, notamment en cas de contact entre des tissus à infectiosité faible ou indétectable (tissus de catégories B et C) et des tissus à infectiosité élevée (tissus de catégorie A). La contamination croisée de certains tissus peut ainsi augmenter si les animaux infectés sont abattus à l'aide d'un pistolet à tige perforante ou si le cerveau et/ou la moelle épinière sont débités à la scie. Le risque de contamination croisée sera réduit si les liquides corporels sont recueillis avec un minimum de lésions tissulaires, si les éléments cellulaires en sont retirés et si le sang foetal est recueilli en évitant toute contamination par des tissus de la mère ou du foetus comme le placenta ou les liquides amniotique et allantoïdien. Pour certains tissus, il est très difficile ou impossible d'éviter une contamination croisée avec des tissus de catégorie A (par exemple le crâne). Ceci doit être pris en considération dans l'évaluation du risque.

– Pour certaines classes de substances, les techniques utilisées pour assommer/abattre l'animal peuvent jouer un rôle dans la réduction du risque potentiel*(13)* du fait de la probabilité de dissémination des particules cérébrales dans les organes périphériques, notamment les poumons. De même que les procédures d'élimination des tissus à infectiosité élevée, les techniques utilisées pour assommer/abattre l'animal doivent être décrites. Les procédures de prélèvement des tissus/organes animaux à utiliser et les mesures instaurées pour éviter une contamination croisée avec une matière à risque élevé doit également faire l'objet d'une description détaillée.

– Le risque de contamination de tissus ou d'organes par les matières du système nerveux central, sièges potentiels d'une infectiosité ESB, résultant de la méthode utilisée pour assommer l'animal lors de l'abattage dépend des facteurs suivants :
  – le titre infectieux relatif à l'ESB dans le cerveau de l'animal abattu,
  – l'étendue des dommages cérébraux,
  – la dissémination de particules cérébrales dans le corps de l'animal.

  Ces facteurs doivent être pris en considération en conjonction avec la classification RGE des animaux sources, l'âge des animaux dans le cas des bovins et les essais post-mortem sur les bovins par une méthode validée.

  Les principes sous-jacents indiqués plus haut seraient pareillement applicables aux moutons et aux chèvres.

Le risque posé par la contamination croisée dépendra de plusieurs facteurs complémentaires comme :
– les mesures adoptées pour éviter la contamination lors du prélèvement des tissus (voir plus haut),
– le niveau de contamination (quantité de tissus contaminants),
– la quantité et le type de matières prélevées en même temps.

Les fabricants et les détenteurs/demandeurs d'autorisation de mise sur le marché devraient tenir compte du risque lié à la contamination croisée.

3-4. *ÂGE DES ANIMAUX*

Etant donné que l'infectiosité relative à l'EST s'accumule chez les bovins sur une période d'incubation de plusieurs années, il est prudent de s'approvisionner en matières provenant d'animaux jeunes.

3-5. *PROCÉDÉ DE FABRICATION*

L'évaluation de la réduction globale du risque d'EST d'un médicament doit tenir compte des mesures de contrôle instituées au regard :
– de la source d'approvisionnement en matières premières et,
– du procédé de fabrication.

Le contrôle de l'approvisionnement est un critère très important pour parvenir à une innocuité acceptable du produit, étant donné la résistance établie des agents des EST à la plupart des procédures d'inactivation.

Des systèmes d'assurance de la qualité tels que la certification ISO 9000, le HACCP*(14)* ou les BPF, doivent être mis en place pour la surveillance du procédé de production et de la production par lots (définition du lot, séparation des lots, nettoyage entre les lots). Des procédures doivent être mises en place pour assurer la traçabilité ainsi que l'autovérification et l'audit des fournisseurs des matières premières.

Certaines procédures de production peuvent contribuer considérablement à la réduction du risque de contamination par les agents des EST, par exemple les procédures utilisées dans la fabrication des dérivées du suif (voir la section 6). Des procédés aussi rigoureux ne pouvant être appliqués à de nombreux produits, des procédés impliquant une action physique, comme la précipitation ou l'infiltration, pour éliminer les matières riches en prions, sont probablement plus appropriés que des traitements chimiques. Une description du procédé de fabrication, y compris les contrôles appliqués en cours de fabrication, devra être présentée et les étapes pouvant contribuer à la réduction ou à l'élimination de la contamination par les agents des EST devront être examinées. Si des sites de fabrication différents sont impliqués, les étapes effectuées sur chaque site devront être clairement identifiées. Les mesures mises en place pour garantir la traçabilité de chaque lot de production jusqu'à la matière source devraient être décrites.

(12) L'introduction d'une classification des tissus en 3 catégories n'invalide pas les estimations du risque effectuées pour des médicaments autorisés et fondées sur la classification préalablement utilisée des tissus en 4 catégories.
(13) Avis du CSD sur les méthodes d'étourdissement et le risque d'ESB (le risque de dissémination des particules cérébrales vers le sang et la carcasse quand certaines méthodes d'étourdissement sont appliquées) adopté lors de la réunion des 10 et 11 janvier 2002. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out245_en.pdf
(14) Hazard Analysis Critical Control Point (analyse des risques et maîtrise des points critiques).

**Procédé de nettoyage**. Le nettoyage des appareils de traitement peut être difficile à valider en ce qui concerne l'élimination des agents des EST. Il a été signalé qu'après exposition à des préparations à titre élevé en agents des EST, une infectiosité décelable peut rester liée à la surface de l'acier inoxydable. Il est estimé que l'élimination de toute protéine absorbée par l'utilisation de désinfectant libérant de l'hydroxyde de sodium ou du chlore (par exemple, du chlore à 20 000 ppm pendant 1 h) constitue une approche acceptable dans le cas d'appareils qui ne peuvent être remplacés et ont été exposés à des matières potentiellement contaminées. Sauf justification contraire, des appareils dédiés doivent être utilisés si des matières de catégorie A sont utilisées dans la fabrication d'un produit.

Si des matières à risque sont utilisées dans la fabrication d'un produit, les procédures de nettoyage, y compris les mesures de contrôle, doivent être mises en place afin de réduire le risque de contamination croisée entre les lots de production. De telles procédures sont d'autant plus importantes si des matières appartenant à des catégories de risque différentes sont manipulées dans la même usine et avec les mêmes appareils.

**Validation de l'élimination/inactivation**. Les études de validation des procédures d'élimination/inactivation des agents infectieux des EST sont difficiles à interpréter car il est nécessaire de prendre en considération la nature du produit contaminé intentionnellement et sa pertinence vis-à-vis de la situation réelle, le protocole de l'étude (y compris la réduction d'échelle des procédés) et la méthode de détection de l'agent (dosage *in vitro* ou *in vivo*). Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour pouvoir parvenir à un accord concernant la « préparation contaminée intentionnellement » la plus appropriée pour les études de validation. Actuellement, les études de validation ne sont donc généralement pas exigées. Cependant, si une revendication liée à l'innocuité du produit vis-à-vis des EST est faite sur la base de la capacité du procédé de fabrication à éliminer ou inactiver les agents des EST, elle doit être justifiée par des études de validation appropriées.

Outre un approvisionnement approprié, les fabricants sont incités à poursuivre leurs travaux sur les méthodes d'élimination ou d'inactivation afin d'identifier les étapes/procédés qui favoriseraient l'élimination ou l'inactivation des agents infectieux des EST. Dans tous les cas, un procédé de production doit être élaboré, si possible en tenant compte des informations disponibles sur les méthodes présumées efficaces pour l'élimination ou l'inactivation des agents des EST.

## 4. ÉVALUATION DU RISQUE LIÉ AUX MATIÈRES OU SUBSTANCES UTILISÉES DANS LA FABRICATION ET LA PRÉPARATION D'UN MÉDICAMENT DANS LE CONTEXTE DE LA CONFORMITÉ RÉGLEMENTAIRE

L'estimation du risque associée aux EST nécessite une prise en considération minutieuse de tous les paramètres cités dans la section 3-1 (Principes scientifiques relatifs à la réduction du risque).

Comme indiqué en introduction au présent chapitre, la conformité réglementaire se fonde sur une conclusion favorable de l'estimation du risque. Les estimations du risque, menées par les fabricants et/ou les détenteurs ou demandeurs d'autorisation de mise sur le marché, pour les différentes matières ou substances issues d'« espèces animales concernées par les EST » et utilisées dans la fabrication d'un médicament doivent montrer qu'il a été tenu compte de tous les facteurs de risque liés aux EST et, si possible, que le risque a été réduit à un minimum par l'application des principes décrits dans le présent chapitre. Les certificats de conformité EST délivrés par la DEQM peuvent être utilisés par les détenteurs ou demandeurs d'autorisation de mise sur le marché comme base des estimations du risque.

Une estimation globale du risque concernant un médicament, menée par les détenteurs ou demandeurs d'autorisation de mise sur le marché, devra tenir compte des estimations du risque pour chacune des différentes matières provenant d'« espèces animales concernées par les EST » et, le cas échéant, de la réduction ou de l'élimination des agents des EST par des étapes de la fabrication de la substance active et/ou du produit fini.

La détermination finale de la conformité réglementaire demeure du ressort de l'autorité compétente.

Il incombe aux fabricants et/ou aux détenteurs ou demandeurs d'autorisation de mise sur le marché de médicaments à usage humain ou vétérinaire de choisir et de justifier les mesures de contrôle utilisées pour un dérivé donné d'« espèces animales concernées par les EST », en tenant compte de l'état de la science et des technologies.

## 5. ÉVALUATION DU RAPPORT RISQUE/AVANTAGE

Outre les paramètres cités dans les sections 3 et 4, l'acceptabilité d'un médicament particulier contenant des matières dérivées d'« une espèce animale concernée par les EST », ou pouvant en contenir du fait du procédé de fabrication, dépendra des facteurs suivants :

- la voie d'administration des médicaments,
- la quantité de matière animale utilisée dans le médicament,
- la posologie thérapeutique maximale (dose journalière et durée du traitement),
- l'utilisation prévue du médicament et son avantage clinique.

Sauf justification contraire, les tissus à infectiosité élevée (tissus de la catégorie A) et les substances qui en dérivent ne doivent pas être utilisés dans la fabrication de médicaments, de leurs matières premières ou de leurs produits intermédiaires (y compris les substances actives, les excipients et les réactifs). Le cas échéant, il devra être fourni une justification qu'aucune autre matière ne peut être utilisée. Dans ces circonstances exceptionnelles et justifiées, l'utilisation de tissus à infectiosité élevée pourra être envisagée pour la fabrication de substances actives si, après avoir effectué une estimation du risque comme décrit dans la section 4 du présent chapitre, et en tenant compte de l'utilisation clinique prévue, une analyse positive du rapport risque/avantage peut être présentée par le demandeur d'autorisation de mise sur le marché. Les substances issues de matières de catégorie A, si leur utilisation est justifiée, doivent être produites à partir d'animaux provenant de pays de RGE I.

## 6. CONSIDÉRATIONS SPÉCIFIQUES

Les matières suivantes préparées à partir d'« espèces animales concernées par les EST » sont considérées comme conformes au présent chapitre sous réserve qu'elles satisfont au moins aux conditions spécifiées ci-après. Des informations pertinentes ou un certificat de conformité décerné par la DEQM devront être fournis par le demandeur/détenteur d'autorisation de mise sur le marché.

### 6-1. *COLLAGÈNE*

Le collagène est un constituant protéique fibreux du tissu conjonctif des mammifères.

En ce qui concerne le collagène, les documents démontrant la conformité au présent chapitre devront être fournis en tenant compte des dispositions indiquées dans les sections 3 à 5. En outre, les points suivants devront être pris en considération.

- Pour le collagène produit à partir d'os, les conditions spécifiées pour la gélatine sont applicables (voir plus loin).
- Le collagène produit à partir de tissus comme les peaux ne présente généralement pas de risque mesurable d'EST sous réserve que la contamination par les matières potentiellement infectées, par exemple le déversement de sang et/ou de tissus du système nerveux central, soit évitée lors du prélèvement.

### 6-2. *GÉLATINE*

La gélatine est une protéine naturelle, soluble, gélifiante ou non, obtenue par l'hydrolyse partielle du collagène produit à partir d'os, de peaux, de tendons ou de muscles d'animaux.

En ce qui concerne la gélatine, les documents démontrant la conformité au présent chapitre devront être fournis en tenant compte des dispositions indiquées dans les sections 3 à 5. En outre, les points suivants devront être pris en considération.

**La matière source utilisée**

La gélatine utilisée dans les médicaments peut être fabriquée à partir d'os ou de peaux.

*Peaux comme matière première.* Sur la base des connaissances actuelles, les peaux utilisées pour la production de gélatine représentent une matière source bien plus sûre que les os. Cependant, il est hautement recommandé que soient mises en place des mesures permettant d'éviter la contamination croisée avec des matières potentiellement infectées lors du prélèvement.

*Os comme matière première.* Si des os sont utilisés pour fabriquer de la gélatine, des conditions de production plus strictes devront être appliquées (voir plus loin). Dans tous les cas, l'élimination des crânes et des moelles épinières de la matière première est considérée comme une première mesure de précaution qui affecte largement l'innocuité du produit. Autant que possible, les os devront provenir de pays de niveau RGE I ou II. Les os issus de pays RGE III peuvent être utilisés si la gélatine est fabriquée sous des conditions définies comme indiqué ci-après et si les vertèbres des bovins âgés de plus de 12 mois sont éliminées des matières premières[15].

**Méthodes de fabrication**

Concernant la gélatine produite à partir de peaux, il n'est exigée aucune mesure spécifique quant aux conditions de manipulation sous réserve que des mesures de contrôle sont mises en place pour éviter une contamination croisée, que ce soit pendant le prélèvement des peaux ou pendant le procédé de fabrication.

Cependant, il faudra tenir compte du mode de fabrication si des os sont utilisés comme matière première.

– Les os (y compris les vertèbres) destinés à la production de gélatine par traitement acide devront uniquement provenir de pays appartenant à la catégorie RGE I ou II. Un traitement alcalin supplémentaire (pH 13, 1 h) des os ou de l'osséine pourrait encore augmenter l'innocuité relative aux EST de la gélatine d'os obtenue par traitement acide.

  Les os provenant d'un pays de catégorie RGE III devront se voir appliquer le procédé alcalin. Cependant, cette méthode de fabrication est optionnelle pour les os issus de pays de catégorie RGE I et II.

– Un procédé typique de fabrication alcaline consiste à finement broyer les os, à les dégraisser à l'eau chaude et à les déminéraliser à l'acide chlorhydrique dilué (à une concentration minimale de 4 pour cent et un pH < 1,5) pendant une période d'au moins 2 jours pour produire l'osséine. Il s'ensuit un traitement alcalin par de la solution de chaux saturée (pH de 12,5 au minimum) pendant une période d'au moins 20 jours. La gélatine est extraite, rincée, filtrée et concentrée. Une étape de chauffage instantané (stérilisation) est appliquée à 138-140 °C pendant 4 s. La gélatine de peaux de bovins peut également être produite selon le procédé alcalin. Les os de bovins peuvent en outre être traités par un procédé acide. L'étape du traitement par la chaux est alors remplacée par un prétraitement acide durant lequel l'osséine est imbibée à pH < 4 pendant toute une nuit.

6-3. *DÉRIVÉS DE SANG BOVIN*

Le sérum foetal bovin est couramment utilisé pour les cultures cellulaires. Le sérum foetal bovin devra être obtenu à partir de foetus prélevés dans des abattoirs sur des vaches en bonne santé et aptes à la consommation humaine ; la totalité de l'utérus devra être prélevée et le sang foetal sera recueilli dans un espace ou une zone dédiés par ponction cardiaque vers un système de prélèvement fermé, dans des conditions d'asepsie.

Le sérum de veau nouveau-né est obtenu à partir de veaux âgés de moins de 20 jours et le sérum de veau à partir d'animaux âgés de moins de 12 mois. Dans le cas de sérum bovin issu d'un donneur, sous réserve qu'il provient d'animaux âgés de moins de 36 mois, le statut EST du troupeau donneur devra être bien défini et établi. Dans tous les cas, le sérum sera prélevé selon les protocoles spécifiés par du personnel formé à ces procédures afin d'éviter une contamination croisée avec des tissus à risque élevé.

En ce qui concerne les dérivés de sang bovin, les documents démontrant la conformité au présent chapitre devront être fournis, en tenant compte des dispositions spécifiées dans les sections 3 à 5. En outre, les points suivants devront être pris en considération.

**Traçabilité**

L'abattoir d'origine devra être traçable pour chaque lot de sérum ou de plasma. Les abattoirs devront disposer de listes disponibles des fermes d'où proviennent les animaux. Si le sérum est produit à partir d'animaux vivants, les documents de traçabilité garantissant la détermination des fermes d'origine devront être disponibles pour chaque lot de sérum.

**Origine géographique**

Bien que l'infectiosité des tissus liée à l'ESB chez les bovins soit plus restreinte que pour la tremblante des moutons et des chèvres, par mesure de précaution le sang bovin devra provenir de pays classés RGE I ou II, sauf justification contraire.

**Méthodes d'étourdissement**

Si la matière est prélevée sur des animaux abattus, la méthode d'abattage est importante pour la garantie de l'innocuité de la matière. Il a été démontré que l'étourdissement au moyen d'un pistolet à tige perforante, avec ou sans énuquage, ou au moyen d'un pistolet pneumatique, notamment s'il injecte de l'air, peut détruire le cerveau et disséminer de la matière cérébrale dans le courrant sanguin. Le risque peut être considéré comme négligeable en cas d'utilisation d'un assommoir non pénétrant ou en cas d'étourdissement par galvanonarcose[16]. Les méthodes d'étourdissement doivent donc être décrites pour le procédé de prélèvement du sang bovin.

Si l'approvisionnement auprès de pays dans lesquels ont été décelés des cas d'ESB (RGE III) est autorisé, un assommoir non pénétrant devra être utilisé pour l'abattage.

6-4. *DÉRIVÉS DU SUIF*

Le suif est de la graisse obtenue à partir de tissus incluant les zones sous-cutanées, abdominales et intermusculaires et les os. Le suif utilisé comme matière première dans la fabrication de dérivés du suif doit être issu de matières de catégorie 3 ou équivalente, comme défini dans le règlement (CE) n° 1774/2002[17] du Parlement européen et du Conseil du 3 octobre 2002 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux non destinés à la consommation humaine.

Les dérivés du suif, comme le glycérol et les acides gras qui sont fabriqués à partir du suif par des procédés rigoureux ont fait l'objet de considérations spécifiques par le CSP et le CMV et il est peu probable qu'ils soient infectieux. Pour cette raison, de telles matières fabriquées sous des conditions au moins aussi rigoureuses que celles qui sont mentionnées plus loin doivent être considérées comme conformes au présent chapitre, quelles que soient leur origine géographique ou la nature des tissus d'où proviennent les dérivés du suif. Des exemples de procédés rigoureux sont :

– la transestérification ou l'hydrolyse sous pression, à une température d'au moins 200 °C pendant au moins 20 min (pour la production de glycérol, d'acides gras et d'esters d'acides gras),

(15) Le règlement (CE) n° 1774/2002 du Parlement européen et du Conseil établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux non destinés à la consommation humaine sera appliqué, sauf justification contraire. En ce qui concerne la fabrication de gélatine ou de collagène destinés à la production de médicaments, ou l'importation des matières premières utilisées dans cette fabrication, seules des matières provenant d'animaux aptes à la consommation humaine seront utilisées. Si ces animaux proviennent de pays appartenant à la catégorie II, l'utilisation des vertèbres, qui est sûre d'après l'évaluation du risque, continuera à être autorisée.

(16) Avis du CSD sur les méthodes d'étourdissement et le risque d'ESB (le risque de dissémination des particules cérébrales vers le sang et la carcasse quand certaines méthodes d'étourdissement sont appliquées) adopté lors de la réunion des 10 et 11 janvier 2002. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out245_en.pdf

(17) JO L 273 du 10.10.2002, p. 1.

– la saponification par NaOH 12 M (pour la production de glycérol et de savon) :

  – production par lots : à une température d'au moins 95 °C pendant au moins 3 h,

  – production en continu : à une température d'au moins 140 °C, sous pression et pendant au moins 8 min, ou l'équivalent,

– la distillation à 200 °C.

Il est improbable que les dérivés du suif fabriqués sous ces conditions présentent un quelconque risque d'EST. Ils doivent donc être considérés comme conformes au présent chapitre.

Dans le cas de dérivés du suif produits sous d'autres conditions, la conformité au présent chapitre doit être démontrée.

6-5. *NOIR ANIMAL*

Le noir animal est préparé par carbonisation de tissus animaux, comme les os, à des températures élevées supérieures à 800 °C. Sauf justification contraire, la matière première dans la fabrication de noir animal devra être une matière de catégorie 3 ou équivalente, conformément à la définition du règlement (CE) nº 1774/2002 du Parlement européen et du Conseil du 3 octobre 2002 établissant les règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux non destinés à la consommation humaine. Quelle que soit l'origine géographique ou la nature du tissu, pour des besoins de conformité réglementaire, le noir animal devra être considéré comme conforme au présent chapitre.

Il est improbable que le noir animal fabriqué sous ces conditions présente un risque quelconque d'EST. Il doit donc être considéré comme conforme au présent chapitre. Dans le cas de noir animal produit sous d'autres conditions, la conformité au présent chapitre devra être démontrée.

6-6. *LAIT ET DÉRIVÉS DU LAIT*

A la lumière des connaissances scientifiques actuelles, le lait ne présente probablement aucun risque de contamination par les agents des EST, quelle que soit son origine géographique.

Certaines matières, dont le lactose, sont extraites du lactosérum, partie liquide issue de la coagulation du lait lors de la production de fromage. La coagulation peut impliquer l'utilisation de présure de veau, un extrait de la caillette de veau, ou de présure dérivée d'autres ruminants. Le CSP et le CMV ont effectué une estimation du risque associé au lactose et à d'autres dérivés du lactosérum produits en utilisant de la présure de veau et en ont conclu que le risque d'EST était négligeable si la présure de veau était produite conformément au procédé décrit dans le rapport d'estimation du risque[(18)]. La conclusion a été avalisée par le CSD[(19)], qui a également effectué une estimation du risque d'EST associé à la présure en général[(20)].

Il est improbable que les dérivés du lait fabriqués sous les conditions spécifiées ci-après présentent un risque quelconque d'EST. Ils doivent donc être considérés comme conformes au présent chapitre.

– Le lait provient d'animaux sains et l'approvisionnement est effectué sous les mêmes conditions que pour le lait recueilli pour la consommation humaine.

– Aucun autre produit issu de ruminants, à l'exception de la présure de veau, n'est utilisé dans la préparation de ces dérivés (hydrolysats pancréatiques de caséine, par exemple).

La conformité au présent chapitre des dérivés du lait obtenus par d'autres procédés ou en utilisant de la présure provenant d'autres espèces de ruminants devra être démontrée.

6-7. *DÉRIVÉS DE LA LAINE*

Les dérivés de la laine et les poils de ruminants, comme la lanoline et les alcools de laine dérivés de poils doivent être considérés comme conformes au présent chapitre, sous réserve que la laine ou les poils soient prélevés sur des animaux vivants.

Il est improbable que les dérivés de la laine produits à partir de la laine prélevée sur des animaux déclarés aptes à la consommation humaine et dont le procédé de fabrication (pH, température et durée du traitement) satisfait au moins à une des conditions de traitement stipulée ci-après présentent un risque quelconque d'EST. Ils doivent donc être considérés comme conformes au présent chapitre.

– Traitement à pH ≥ 13 (initial ; correspondant à une concentration en NaOH d'au moins 0,1 M), à une température ≥ 60 °C pendant au moins 1 h, effectué normalement durant la phase de reflux du traitement alcalin organique.

– Distillation moléculaire à une température ≥ 220 °C sous pression réduite.

La conformité au présent chapitre des dérivés de la laine produits sous d'autres conditions doit être démontrée.

6-8. *ACIDES AMINÉS*

Les acides aminés peuvent être obtenus par hydrolyse de matières provenant de sources variées.

Sauf justification contraire, la matière première dans la fabrication d'acides aminés devra être une matière de catégorie 3 ou équivalente, conformément à la définition du règlement (CE) Nº 1774/2002 du Parlement européen et du Conseil du 3 octobre 2002 établissant les règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux non destinés à la consommation humaine.

Il est improbable que les acides aminés préparés sous les conditions de traitement suivantes, conformément à la décision du Conseil 98/256/CE[(21)] et à la décision de la Commission 2001/376/CE[(22)], présentent un risque quelconque d'EST ; ils doivent donc être considérés comme conformes au présent chapitre :

– les acides aminés produits à partir de peaux sont obtenus par un procédé impliquant une exposition de la matière à un pH de 1 à 2, puis à un pH supérieur à 11, suivie d'un traitement thermique à une température de 140 °C pendant 30 min sous une pression de 3 bar,

– les acides aminés ou peptides qui en résultent doivent être filtrés après production, et

– une analyse est effectuée en utilisant une méthode sensible et validée pour contrôler l'absence de toute macromolécule intacte résiduelle, avec une limite fixée appropriée.

La conformité au présent chapitre des acides aminés préparés sous d'autres conditions doit être démontrée.

(18) Le comité des spécialités pharmaceutiques et son groupe de travail Biotechnologie ont effectué une estimation du risque et une évaluation réglementaire concernant le lactose préparé en utilisant de la présure de veau. L'estimation du risque a tenu compte de la source des animaux, de l'excision des abomasums et de la disponibilité de procédures bien définies d'assurance qualité. La qualité de tout substitut de lait utilisé pour nourrir les animaux à partir desquels sont obtenus les abomasums est particulièrement importante. Le rapport est disponible à l'adresse suivante : http://www.emea.eu.int
(19) Déclaration provisoire sur l'innocuité de la présure dérivée du veau pour la fabrication de lactose. Adoptée par le CSD lors de sa réunion des 4 et 5 avril 2002. (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out255_en.pdf)
(20) Le CSD a émis un avis sur l'innocuité de la présure animale vis-à-vis des risques d'EST animales et d'ESB en particulier, adopté lors de la réunion du 16 mai 2002. (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out265_en.pdf)
(21) JO L 113 du 15.4.1998, p. 32.
(22) JO L 132 du 15.5.2001, p. 17.

5. Textes généraux

## Annexe : catégories majeures d'infectiosité

Les tableaux ci-après sont adaptés de l'orientation de l'OMS *WHO Guideline on Transmissible Spongiform Encephalopathies in Relation to Biological and Pharmaceutical Products* (Février 2003).

Les données ont été saisies comme suit :

+ = présence d'infectiosité ou de $PrP^{EST}$(23),

− = absence d'infectiosité ou de $PrP^{EST}$ détectables,

NT = non testé,

? = résultats discutables ou incertains.

Catégorie A : tissus à infectiosité élevée

| Tissus | Bovins ESB | | Moutons et Chèvres Tremblante | |
|---|---|---|---|---|
| | Infectiosité[1] | $PrP^{EST}$ | Infectiosité[1] | $PrP^{EST}$ |
| Cerveau | + | + | + | + |
| Moelle épinière | + | + | + | + |
| Rétine, Nerf optique | + | NT | NT | + |
| Ganglions rachidiens | + | NT | NT | + |
| Ganglions trigéminés | + | NT | NT | + |
| Hypophyse[2] | − | NT | + | NT |
| Dure-mère[2] | NT | NT | NT | NT |

1. Des biodosages de l'infectiosité de tissus bovins ont été effectués soit sur des bovins, soit sur des souris (ou sur les deux) ; et la plupart des biodosages de l'infectiosité de tissus de moutons et/ou de chèvres n'ont été effectués que sur des souris. En ce qui concerne les moutons et les chèvres, les résultats ne sont pas tous compatibles pour les deux espèces.

2. Aucune donnée expérimentale concernant l'infectiosité de l'hypophyse ou de la dure-mère humaine n'a été rapportée, mais de la dure-mère de cadavre lyophilisée, et des hormones de croissance dérivées d'hypophyses de cadavres ont transmis la maladie à un grand nombre de personnes ; l'hypophyse et la dure-mère doivent donc figurer dans la catégorie des tissus à risque élevé.

Catégorie B : tissus à faible infectiosité

| Tissus | Bovins ESB | | Moutons et Chèvres Tremblante | |
|---|---|---|---|---|
| | Infectiosité | $PrP^{EST}$ | Infectiosité | $PrP^{EST}$ |
| **Système nerveux périphérique** | | | | |
| Nerfs périphériques | − | NT | + | NT |
| Plexus entériques[1] | NT | + | NT | + |
| **Tissus lymphoréticulaires** | | | | |
| Rate | − | − | + | + |
| Ganglions lymphatiques | − | − | + | + |
| Amygdales | + | NT | + | + |
| Membrane nictitante | NT | − | NT | + |
| Thymus | − | NT | + | NT |
| **Tube digestif** | | | | |
| Oesophage | − | NT | NT | + |
| Pré-estomac[2] (ruminants uniquement) | − | NT | NT | + |
| Estomac/abomasum[2] | − | NT | NT | + |
| Duodénum | − | NT | NT | + |
| Jéjunum | − | NT | NT | + |
| Iléon[3] | + | + | + | + |
| Gros intestin | − | NT | + | + |
| **Tissus reproductifs** | | | | |
| Placenta | − | NT | + | + |
| **Autres tissus** | | | | |
| Poumon* | − | NT | − | NT |
| Foie | − | NT | + | NT |
| Reins* | − | − | − | − |
| Glande surrénale | NT | NT | + | NT |
| Pancréas | − | NT | + | NT |
| Moelle osseuse | + | NT | + | NT |
| Vaisseaux sanguins | − | NT | NT | + |
| Muqueuse olfactive | − | NT | + | NT |
| Tissu gingival* | NT | NT | NT | NT |
| Glande salivaire | − | NT | + | NT |
| Cornée[4]* | NT | NT | NT | NT |
| **Liquides organiques** | | | | |
| Liquide cérébro-spinal | − | NT | + | NT |
| Sang[5] | − | NT | + | − |

1. Limité à l'iléon distal chez les bovins.

2. Le pré-estomac des ruminants (réticulum, rumen et omasum) est de consommation courante, tout comme le véritable estomac (abomasum). L'abomasum des bovins (et parfois des moutons) constitue également une source de présure.

3. Chez les bovins et les moutons, seul l'iléon distal a fait l'objet de biodosages de l'infectiosité.

4. Du fait que seulement un ou deux cas de MCJ ont pu être attribués de manière plausible à des transplantations cornéennes parmi des centaines de milliers de receveurs, la cornée est classée dans la catégorie des tissus à risque faible ; les essais effectués sur les autres tissus de la chambre antérieure (cristallin, humeur aqueuse, iris, conjonctive) ont donné des résultats négatifs pour la MCJv comme pour les autres EST, et aucune donnée épidémiologique n'a permis de les associer à une transmission iatrogène de la maladie.

5. Les premiers cas signalés de transmission de la maladie à des rongeurs par du sang de patients atteints de MCJ n'ont pas été confirmés, et l'évaluation de l'ensemble des données expérimentales et épidémiologiques liées à la transmission de l'EST par le sang, les composés du sang ou les produits plasmatiques thérapeutiques ne suggère aucune transmission par le sang de patients atteints d'une forme « classique » d'EST. Les données accumulées ne sont pas assez nombreuses pour faire le même constat en ce qui concerne le sang des patients atteints de la MCJv. Le sang foetal de veau ne contient aucune infectiosité détectable, mais chez les moutons génotypiquement sensibles à la tremblante naturelle ou à l'ESB induite expérimentalement, la transfusion de grands volumes de sang a permis de transmettre la maladie à des moutons en bonne santé. L'infectiosité a également été établie dans des études sur des souches d'EST adaptées aux rongeurs.

* Ces tissus ont été classés dans la Catégorie B : tissus de faible infectiosité, car l'infectiosité et/ou la $PrP^{EST}$ ont été décelées dans la MCJ humaine (MCJv ou autre).

(23) Dans le corps principal du texte du présent chapitre, l'isoforme anormale de la protéine de prion est appelée $PrP^{Sc}$. Toutefois, ces tableaux étant directement transcrits à partir de l'orientation de l'OMS mentionnée précédemment, la nomenclature de l'OMS pour la protéine de prion anormale ($PrP^{EST}$) a été maintenue.

Catégorie C : tissus sans infectiosité décelée

| Tissus | Bovins ESB | | Moutons et Chèvres Tremblante | |
|---|---|---|---|---|
| | **Infectiosité**[1] | **PrP**$^{EST}$ | **Infectiosité**[1] | **PrP**$^{EST}$ |
| **Tissus reproductifs** | | | | |
| Testicule | – | NT | – | NT |
| Prostate/Epididyme/ Vésicule séminale | – | NT | – | NT |
| Sperme | – | NT | NT | NT |
| Ovaire | – | NT | – | NT |
| Utérus (non gravide) | – | NT | – | NT |
| Liquides placentaires | – | NT | NT | NT |
| Foetus[1] | – | NT | – | NT |
| Embryon[1] | – | NT | ? | NT |
| **Tissus musculo-squelettiques** | | | | |
| Os | – | NT | NT | NT |
| Muscle squelettique[2] | – | NT | – | NT |
| Langue | – | NT | NT | NT |
| Coeur/péricarde | – | NT | – | NT |
| Tendon | – | NT | NT | NT |
| **Autres tissus** | | | | |
| Trachée | – | NT | NT | NT |
| Peau | – | NT | – | NT |
| Tissu adipeux | – | NT | NT | NT |
| Glande thyroïde | NT | NT | – | NT |
| Glande mammaire/pis | – | NT | – | NT |
| **Liquides organiques, sécrétions et excrétions** | | | | |
| Lait[3] | – | NT | – | NT |
| Colostrum[4] | NT | NT | – | NT |
| Sang du cordon[4] | – | NT | NT | NT |
| Salive | NT | NT | – | NT |
| Sueur | NT | NT | NT | NT |
| Larmes | NT | NT | NT | NT |
| Mucus nasal | NT | NT | NT | NT |
| Urine[4,5] | – | NT | NT | NT |
| Fèces | – | NT | – | NT |

1. Les embryons issus de bovins affectés par l'ESB n'ont pas transmis la maladie à la souris, mais aucune mesure de l'infectiosité n'a été effectuée sur les tissus foetaux de veau autres que le sang (biodosage sur souris négatif). Les veaux nés de vaches ayant reçu des embryons provenant de bovins affectés par l'ESB ont survécu pendant des périodes d'observation pouvant aller jusqu'à sept années, et l'examen des cerveaux des mères non affectées et de leurs veaux n'a pas révélé d'encéphalopathie spongiforme ni de PrP$^{EST}$.

2. L'inoculation par voie intracérébrale d'homogénats de muscle n'a transmis la maladie 1) ni à des primates à partir de muscles d'humains atteints de MCJ ; 2) ni à des souris ou des bovins à partir de muscles de bovins atteints d'ESB) ; 3) ni à des souris à partir de muscles de moutons et de chèvres atteints de tremblante naturelle ou transmise expérimentalement. Cependant, des rapports plus anciens décrivent des cas isolés de transmission par du tissu musculaire de chèvre et de hamster, et une étude plus récente décrit une transmission à partir de muscle de souris de type sauvage et de type transgénique, mais étant donné que chacune de ces études a été menée avec des souches d'EST ayant subi plusieurs passages, leur pertinence vis-à-vis de la maladie naturelle reste à déterminer. Une récente étude de cas humains décrit un patient atteint de la MCJ et présentant une myosite à inclusion avec présence abondante de PrP$^{EST}$ dans le muscle malade. Après de nombreuses délibérations, le comité a néanmoins décidé de maintenir le muscle dans la catégorie des tissus « sans infectiosité décelée » jusqu'à ce que de plus amples informations soient disponibles sur des infections naturelles sans complication.

3. Parmi les éléments établissant l'absence d'infectiosité dans le lait figurent les observations épidémiologiques temporo-spatiales qui n'ont pas permis de déceler de transmission maternelle ; les observations cliniques sur plus de cent veaux allaités par des vaches infectées et qui n'ont pas développé d'ESB ; et les observations expérimentales indiquant que l'administration intracérébrale ou orale de lait de vaches infectées à des souris n'a pas abouti à une transmission de la maladie. Des expériences en cours recherchent la présence de PrP$^{EST}$ dans des préparations concentrées de grands volumes de lait provenant de vaches infectées de façon expérimentale.

4. Des cas isolés de transmission de l'infectiosité MCJ à partir de sang cordonal, de colostrum et d'urine humaine n'ont jamais été confirmés et sont jugés improbables.

5. Un type de PrP jamais signalé précédemment, baptisé PrP$^{u}$, a été identifié dans l'urine de patients de la MCJ sporadique et familiale, mais sa signification concernant le risque de transmission reste à déterminer.

**01/2008:50209**

## 5.2.9. ÉVALUATION DE L'INNOCUITÉ DE CHAQUE LOT DES VACCINS ET IMMUNOSÉRUMS VÉTÉRINAIRES

Le terme « produit » utilisé dans le texte définit soit un vaccin soit un immunosérum.

**Définition des réactions anormales**. Au cours des études de développement, le type et l'ampleur des réactions attendues après l'administration du produit sont définis à la lumière des études d'innocuité. Cette définition des réactions locales et générales normales ou anormales est ensuite utilisée dans le cadre des essais d'innocuité effectués sur chaque lot, afin d'évaluer les réactions acceptables et non acceptables.

**Quantité administrée pendant l'essai**. Dans les essais, le terme « dose » désigne la dose recommandée, pour un produit présentant le titre ou l'activité voulus dans les limites spécifiées pour les lots de production. La quantité devant être administrée pour l'essai est généralement définie en nombre de doses. Dans le cas des vaccins vivants cryodesséchés, les 10 doses sont reconstituées dans un volume de solvant approprié pour l'essai. Dans le cas de produits présentés sous la forme de 2 récipients contenant respectivement un ou plusieurs composants vivants cryodesséchés et un ou plusieurs composants inactivés à utiliser comme diluant, il peut être nécessaire d'employer du liquide supplémentaire pour reconstituer le(s) composant(s) cryodesséché(s). Il convient d'injecter en un site le contenu de 2 récipients du composant inactivé mélangé au contenu d'un nombre maximum de récipients du composant vivant cryodesséché, et le reste des composants vivants cryodesséchés reconstitués dans un solvant approprié peut être administré en un site séparé, si nécessaire et justifié. Dans le cas de vaccins combinés, les essais effectués sur le vaccin combiné peuvent être considérés comme suffisants pour établir l'innocuité des composants individuels.

5. Textes généraux

**Voie d'administration**. Le produit est administré par l'une des voies recommandées. En principe, il convient d'utiliser de préférence la voie d'administration la plus apte à permettre la détection des réactions.

Lorsqu'il est connu qu'il y a un risque particulier, par exemple suite aux études de développement, une seconde administration est effectuée avec la dose appropriée et après le délai approprié tels que déterminés lors du développement.

**Espèces animales et catégories cibles**. Sauf exception justifiée et autorisée, il convient d'utiliser des animaux de l'âge minimal recommandé pour la vaccination ou l'administration du produit, et de l'espèce la plus sensible.

**Nombre d'animaux**. Le nombre d'animaux à utiliser pour l'essai est indiqué dans les monographies. En règle générale, il est de 2 pour les mammifères et 10 pour les oiseaux et poissons.

**Identification des animaux**. Sauf exception justifiée, tous les animaux font l'objet d'un marquage permettant un enregistrement individuel des données les concernant sur l'ensemble de la période d'observation.

**Période d'observation**. Lorsque des critères objectifs tels que la température corporelle sont enregistrés comme décrit ci-après, les animaux sont examinés et observés pendant au moins 3 jours avant l'administration du produit. Après administration du produit, les animaux sont placés en observation et examinés au moins 1 fois par jour sur une durée d'au moins 14 jours, en vue de la détection de réactions locales et générales. Le jour de l'administration du produit, il est nécessaire d'effectuer au moins une inspection supplémentaire après 4 h, ou aux intervalles de temps spécifiés dans les monographies. En cas de seconde administration du produit, la période d'observation se termine généralement 14 jours après la seconde administration.

**Réactions locales et générales**. Les animaux présentant des réactions locales ou générales anormales graves sont euthanasiés. Tous les animaux morts font l'objet d'un examen nécropsique à l'échelle macroscopique. Des examens microscopiques et microbiologiques complémentaires peuvent être indiqués.

Les animaux placés en observation font l'objet d'examens visant à la détection de réactions locales ou générales. D'autres critères sont également enregistrés lorsqu'ils constituent des indicateurs d'utilité reconnue, par exemple la température corporelle, la masse corporelle, d'autres indices de performance et l'absorption de nourriture.

*Réactions locales.* Dans la mesure où cela est approprié et possible, l'ampleur et la persistance de toute réaction locale (y compris l'apparition de réactions douloureuses) ainsi que la proportion d'animaux manifestant des réactions locales sont notées.

*Réactions générales.* La température, et si approprié, la masse corporelle sont consignées en tant qu'indicateurs généraux des effets systémiques de l'administration du produit. Tous les signes cliniques sont également enregistrés.

*Température corporelle.* Pour les mammifères, les études comprennent des mesures de la température corporelle pendant la période d'observation. La température corporelle est notée à partir d'au moins 3 jours avant l'administration du produit, au moment même, puis 4 h après et à intervalles appropriés. La température corporelle avant administration du produit doit être comprise dans les valeurs physiologiques. Au moins pour les produits avec lesquels une élévation significative de la température corporelle est prévisible (par exemple les produits contenant des endotoxines et différents vaccins viraux vivants) ou pour lesquels l'élévation de température est spécifiée dans la monographie correspondante (par exemple au maximum 2 °C pour le vaccin de l'actinobacillose du porc), il est recommandé d'utiliser la température moyenne des jours précédant l'administration du produit (par exemple du jour – 3 au jour 0) comme ligne de base de la température, pour disposer d'un critère clair pour l'évaluation de l'essai.

*Masse corporelle et absorption de nourriture.* Lorsqu'elle constitue un indicateur d'innocuité ayant une fiabilité et une utilité reconnues, par exemple chez les animaux jeunes en phase de croissance ou chez le poisson, la masse corporelle est mesurée et documentée peu de temps avant l'administration du produit et pendant la période d'observation. L'absorption de nourriture est contrôlée et documentée en tant qu'indicateur sur l'effet de l'administration du produit. Dans la plupart des cas, il sera suffisant de noter que la ration quotidienne a été consommée, ou partiellement ou entièrement rejetée mais, dans certains cas, il peut être nécessaire de noter le poids effectif de la nourriture consommée, s'il s'agit d'un indicateur approprié de l'innocuité du produit.

*Signes cliniques.* Tous les signes cliniques de nature générale, attendus ou non, sont consignés, notamment les modifications de l'état de santé et les altérations comportementales.

*Fiches d'évaluation.* Les fiches d'évaluation sont préparées pour chaque produit en fonction des signes attendus. Tous les paramètres et toutes les données sont portés sur ces fiches. Elles comportent des paramètres généraux mais doivent également être adaptées à chaque type de produit et contenir la liste des signes cliniques qui peuvent être plus marquants pour un produit donné.

**Critères de répétition de l'essai**. Si un signe anormal apparaît, le vétérinaire responsable détermine si ce signe est dû au produit, sur la base d'un examen nécropsique si nécessaire. Si la cause de ce signe anormal n'est pas claire ou lorsqu'un animal est retiré de l'essai pour des motifs indépendants du produit, l'essai peut être répété. Si, dans le second essai, le même signe anormal réapparaît, le produit ne satisfait pas à l'essai. Tout traitement administré à un animal pendant la période d'observation est noté. Si le traitement peut interférer avec l'essai, l'essai n'est pas valable.

# 5.3. ANALYSE STATISTIQUE DES RÉSULTATS DES DOSAGES ET ESSAIS BIOLOGIQUES

**01/2008:50300**

# 5.3. ANALYSE STATISTIQUE DES RÉSULTATS DES DOSAGES ET ESSAIS BIOLOGIQUES

## 1. INTRODUCTION

Le présent chapitre contient des indications relatives à la conception des titrages biologiques prescrits dans la Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.) et à l'analyse de leurs résultats. Il a été rédigé à l'usage d'utilisateurs dont ni la formation ni les fonctions principales ne relèvent des statistiques, mais qui sont amenés de par leurs fonctions à analyser ou interpréter les résultats de ces titrages, souvent sans l'aide ou l'avis d'un statisticien. Les méthodes de calcul décrites ici n'ont pas un caractère obligatoire pour l'interprétation des dosages qui font eux, par contre, partie intégrante de la Ph. Eur. Des méthodes alternatives peuvent être utilisées, et acceptées par les autorités compétentes, à condition d'être fondées sur des données appropriées, et justifiées lors de la validation de l'essai. Un grand choix de logiciels de calcul sont à la disposition de l'analyste, et peuvent lui être plus ou moins utiles selon les installations et les compétences dont il dispose.

Il existe diverses situations où l'intervention d'un statisticien s'impose : le traitement global de l'organisation et de l'analyse d'essais dans le cadre de la recherche ou du développement de nouveaux produits ; le cas où les conditions nécessaires imposées dans ce chapitre pour les plans d'essai ne sont pas satisfaites, par exemple lorsque des contraintes expérimentales spécifiques nécessitent l'utilisation de plans d'essai sur mesure, ou lorsque l'emploi d'un nombre égal de doses équidistantes est inapproprié ; l'analyse de courbes dose-réponse non linéaires étendues, comme on en rencontre par exemple dans les immunodosages. Un aperçu est néanmoins donné de l'analyse d'une courbe dose-réponse étendue dans la section 3.4, pour un modèle largement utilisé, et un exemple simple est traité dans la section 5.4.

### 1.1. PLANIFICATION DES ESSAIS ET FIDÉLITÉ

La Ph. Eur. décrit des méthodes biologiques destinées au dosage de certaines substances et préparations dont l'activité ne peut pas être déterminée correctement par des méthodes chimiques ou physiques. Dans la mesure du possible, le principe appliqué dans ces dosages est la comparaison avec une préparation étalon, en vue de déterminer la quantité de la substance à titrer qui produit le même effet biologique qu'une quantité fixée, *l'unité*, de la préparation étalon. L'une des conditions essentielles à l'application de ces méthodes de titrage biologiques est que les essais soient effectués simultanément sur la préparation étalon et la substance à examiner, et dans des conditions identiques.

Pour certains essais (la détermination d'un titre en virus par exemple), l'activité de l'échantillon examiné n'est pas exprimée en termes relatifs par rapport à celle d'un étalon. La section 4.5 traite de ce type d'essais.

Toute estimation d'activité obtenue par un titrage biologique est sujette à une erreur aléatoire, due à la variabilité inhérente des réponses biologiques. Il faut donc, dans la mesure du possible, effectuer un calcul d'erreur à partir des résultats de chaque dosage, même lorsque la méthode officielle est utilisée. Tel est l'objectif des méthodes décrites ci-après pour la conception des plans d'essai et le calcul d'erreur. Dans tous les cas, avant d'adopter une méthode statistique, il convient de procéder à un essai préliminaire, avec un nombre suffisant de dosages, pour vérifier l'applicabilité de la méthode.

L'intervalle de confiance de l'activité estimée fournit une indication sur la fidélité de l'estimation obtenue lors du dosage. Il est calculé en tenant compte du plan expérimental et de la taille de l'échantillon. Pour les titrages biologiques, on utilise généralement un intervalle de confiance à 95 pour cent. Le calcul des limites est effectué par des méthodes statistiques de façon à pouvoir affirmer qu'il existe une probabilité de 95 pour cent pour que la valeur « vraie » de l'activité se situe dans ces limites. L'acceptabilité ou non de cette fidélité pour la Pharmacopée européenne dépend des exigences spécifiées dans la monographie de la préparation concernée.

Les termes « moyenne » et « écart type » sont employés ici au sens défini dans la plupart des ouvrages de biométrie actuels.

Les expressions « activité déclarée » ou « activité indiquée sur l'étiquette », « activité assignée », « activité présumée », « rapport d'activité » et « activité estimée » sont utilisées dans ce chapitre pour désigner les concepts suivants :

– l'activité « déclarée » ou « indiquée sur l'étiquette » est, dans le cas d'un produit formulé, la valeur nominale attribuée sur la base des données disponibles sur l'activité du produit en vrac et, dans le cas d'un produit en vrac, l'activité estimée par le fabricant ;
– l'activité « assignée » est l'activité de la préparation étalon ;
– l'activité « présumée » est l'activité provisoirement attribuée à la préparation à examiner, pour les besoins du calcul de la dose qui est supposée présenter une activité équivalente à celle de la dose utilisée pour la préparation étalon ;
– le « rapport d'activité » est, pour une préparation inconnue, le rapport des doses de la préparation étalon et de la préparation inconnue qui ont une activité équivalente dans les conditions du titrage ;
– l'activité « estimée » est l'activité calculée à partir des résultats du titrage.

La section 9 (Symboles et définitions) donne la liste des symboles les plus utilisés dans le présent chapitre. Les symboles qui n'y figurent pas ou qui sont utilisés avec un sens différent sont définis dans la partie du texte où ils apparaissent.

## 2. RANDOMISATION ET INDÉPENDANCE DES TRAITEMENTS INDIVIDUELS

L'affectation des différents traitements aux diverses unités expérimentales (animaux, tubes, etc.) doit être réalisée de façon strictement aléatoire. Ce principe de randomisation s'applique également à celles des conditions expérimentales dont l'affectation n'est pas délibérément prévue dans le plan d'expérience, par exemple le choix de l'emplacement des cages dans le laboratoire ou l'ordre dans lequel sont administrés les traitements. Il importe en particulier de ne pas traiter ensemble (au même moment ou au même emplacement) un groupe d'animaux recevant la même dose d'une préparation, à moins qu'il ne soit établi que la source de variation considérée (temps ou emplacement) est négligeable. Cette affectation aléatoire peut être réalisée au moyen de la fonction de randomisation que possèdent certains logiciels informatiques. L'expérimentateur doit vérifier que cette fonction fournit à chaque fois des séries de nombres différentes.

Les préparations affectées aux différentes unités expérimentales doivent être aussi indépendantes que possible. Ainsi, dans chaque groupe expérimental, les dilutions correspondant à chaque traitement ne résultent pas, normalement, de la division d'une même dose, mais doivent être préparées individuellement. Sans cette précaution, la variabilité inhérente à la préparation ne sera pas totalement représentée dans la variance de l'erreur expérimentale. Il s'ensuivra une sous-estimation de l'erreur résiduelle et par conséquent :

1) un renforcement injustifié de la rigueur des tests d'analyse de variance (voir sections 3.2.3 et 3.2.4),

5. Textes généraux

2) une sous-estimation des limites de confiance réelles de l'essai qui, comme indiqué dans la section 3.2.5, sont calculées à partir de l'estimation de $s^2$, le carré moyen de l'erreur résiduelle.

# 3. TITRAGES FONDÉS SUR DES RÉPONSES QUANTITATIVES

## 3.1. MODÈLES STATISTIQUES

### *3.1.1. PRINCIPES GÉNÉRAUX*

Les titrages biologiques décrits dans la Ph. Eur. sont conçus comme des « titrages de dilution », c'est à dire que la préparation à examiner est supposée contenir la même substance active que la préparation étalon, seule la proportion des composants actifs et inertes y étant différente. Dans ce cas, la préparation à titrer peut en théorie être dérivée de la préparation étalon par dilution avec les composants inertes. Pour vérifier si un titrage particulier peut être considéré comme un titrage de dilution, il faut comparer les relations dose-réponse respectivement obtenues avec l'étalon et avec la préparation à titrer. Si ces relations diffèrent de façon significative, le modèle théorique du titrage de dilution n'est pas valide. L'existence de différences significatives entre les relations dose-réponse obtenues avec l'étalon et la préparation à titrer peut indiquer que l'une des préparations contient, outre la substance active, d'autres composants qui ne sont pas inertes mais affectent les réponses mesurées.

Pour mettre en évidence l'effet de dilution dans le modèle théorique, il est utile de transformer la relation dose-réponse en une fonction linéaire sur l'intervalle de doses le plus étendu possible. 2 modèles statistiques présentent un intérêt pour les titrages biologiques prescrits : le modèle en lignes parallèles et le modèle à rapport de pente.

Leur mise en oeuvre exige que les conditions suivantes soient satisfaites :

1) les différents traitements ont été affectés au hasard aux unités expérimentales,

2) les réponses obtenues pour chaque traitement présentent une distribution normale,

3) les écarts types des réponses obtenues au sein de chaque groupe de traitement pour la préparation étalon et la préparation à examiner ne présentent pas de différences significatives.

Lors du développement d'une méthode de titrage, l'analyste doit déterminer si ces conditions sont satisfaites sur un grand nombre d'essais.

– L'application des indications données dans la section 2 permet de satisfaire à la condition 1.
– La condition 2 représente une hypothèse qui, dans la pratique, est presque toujours vérifiée. Des écarts mineurs par rapport à cette hypothèse n'introduisent pas, en général, de graves failles dans l'analyse tant que le plan d'essai comporte plusieurs répétitions pour chaque traitement. En cas de doute, un test de normalité (par ex. le test de Shapiro-Wilk[(1)]) peut être effectué.
– La condition 3 peut être vérifiée par un test d'homo-généité des variances (par ex. le test de Bartlett[(2)] ou le test de Cochran[(3)]). L'analyse de représentations graphiques des données peut également être très instructive à cet égard (voir exemples dans la section 5).

Lorsque les conditions 2 et/ou 3 ne sont pas remplies, une transformation des réponses peut permettre de mieux s'en approcher. Les transformations possibles sont par exemple ln $y$, $\sqrt{y}$ , $y^2$.

– La transformation logarithmique des réponses $y$ en ln $y$ peut être utile lorsque l'homogénéité des variances n'est pas satisfaisante. Elle peut également améliorer la normalité si la distribution est asymétrique sur la droite.
– La transformation de $y$ en $\sqrt{y}$ est utile lorsque la distribution des valeurs observées suit une loi de Poisson, c'est à dire lorsqu'elles sont obtenues par dénombrement.
– La transformation de $y$ en $y^2$ peut être utile si, par exemple, la dose est davantage susceptible d'être proportionnelle à la surface d'une zone d'inhibition qu'au diamètre, mesuré, de cette zone.

Pour certains dosages fondés sur des réponses quantitatives, comme les immunodosages ou les dosages *in vitro* sur cellules, un nombre élevé de doses est utilisé. Ces doses induisent des réponses qui couvrent dans sa totalité l'intervalle de réponse possible et donnent une courbe dose-réponse non linéaire étendue. De telles courbes sont typiques de l'ensemble des dosages biologiques, mais dans beaucoup de cas l'utilisation d'un nombre élevé de doses est contraire à l'éthique (par exemple pour les dosages *in vivo*) ou se heurte à des contraintes pratiques, et les objectifs du dosage peuvent être atteints avec un nombre restreint de doses. Il est donc usuel de se limiter aux doses comprises dans la partie de la courbe dose-réponse rendue linéaire grâce à une transformation appropriée, et les méthodes décrites dans les sections 3.2 ou 3.3 sont alors applicables. Dans certains cas, toutefois, l'analyse de courbes dose-réponse étendues peut être souhaitable. Un modèle pouvant être utilisé pour ce type d'analyse est présenté dans ses grandes lignes dans la section 3.4, et un exemple simple est décrit dans la section 5.4.

Il existe un autre catégorie de titrages : ceux où il n'est pas possible de mesurer une réponse pour chaque unité expérimentale, mais seulement de décompter le nombre d'unités répondant à chaque traitement. Cette catégorie de titrages fait l'objet de la section 4.

### *3.1.2. TITRAGES DE ROUTINE*

Lorsqu'une méthode de titrage est utilisée en routine, il est rarement possible d'effectuer une vérification systématique des conditions 1 à 3 car, en raison du nombre limité d'observations par titrage, la sensibilité des tests statistiques risque d'être insuffisante. Heureusement, les statisticiens ont pu démontrer que, dans les titrages équilibrés symétriques, de faibles écarts d'homogénéité de la variance ou de normalité n'affectent pas sérieusement les résultats du titrage. Il n'est nécessaire de s'interroger sur l'applicabilité du modèle statistique que si une série de titrages amène à suspecter sa validité. Il peut alors être nécessaire d'effectuer une nouvelle série d'investigations préliminaires (voir section 3.1.1).

2 autres conditions nécessaires s'appliquent, selon le modèle statistique utilisé :

– pour le modèle en lignes parallèles :

4A) la relation entre le logarithme de la dose et la réponse peut être représentée par une droite sur l'intervalle de doses utilisé,

5A) la droite obtenue pour toute préparation inconnue est parallèle à celle obtenue pour l'étalon,

– pour le modèle à rapport de pente :

4B) pour chaque préparation, la relation entre la dose et la réponse peut être représentée par une droite sur l'intervalle de doses utilisé,

5B) la droite obtenue pour toute préparation inconnue doit couper l'axe des $y$ (dose zéro) au même point que la droite obtenue pour la préparation étalon (autrement dit, les fonctions réponses de toutes les préparations doivent avoir la même ordonnée à l'origine que la fonction réponse de l'étalon).

Les conditions 4A et 4B ne peuvent être vérifiées que dans les titrages où au moins 3 dilutions sont utilisées pour chaque préparation. L'emploi d'un titrage comportant seulement 1 ou 2 dilutions pour chaque préparation peut être justifié

(1) Wilk, M.B. and Shapiro, S.S. (1968). The joint assessment of normality of several independent samples, *Technometrics* 10, 825-839.
(2) Bartlett, M.S. (1937). Properties of sufficiency and statistical tests, *Proc. Roy. Soc. London*, Series A 160, 280-282.
(3) Cochran, W.G. (1951). Testing a linear relation among variances, *Biometrics* 7, 17-32.

si l'expérience a montré que les conditions de linéarité et de parallélisme ou d'égalité des ordonnées à l'origine sont satisfaites.

Après obtention des résultats du titrage, et avant le calcul de l'activité relative de chaque échantillon examiné, une analyse de variance est effectuée pour vérifier si les conditions 4A et 5A (ou 4B et 5B) sont satisfaites. Pour ce faire, on subdivise la somme totale des carrés en un certain nombre de sommes de carrés correspondant à chacune des conditions à satisfaire. La somme de carrés restante représente l'erreur expérimentale résiduelle, à laquelle peut être comparée l'existence ou l'absence de sources de variation importantes par une série de rapports *F*.

Une fois la validité du titrage établie, on peut calculer l'activité relative de chaque échantillon par rapport à l'étalon et l'exprimer en termes de rapport d'activité ou la convertir en une unité convenable pour la préparation considérée, par exemple l'Unité Internationale. Les limites de confiance peuvent également être déterminées à partir de chaque série de résultats de titrage.

Les titrages fondés sur le modèle en lignes parallèles et sur le modèle à rapport de pente sont respectivement discutés dans les sections 3.2 et 3.3.

Si l'une des 5 conditions (1, 2, 3, 4A, 5A ou 1, 2, 3, 4B, 5B) n'est pas satisfaite, les méthodes de calcul décrites ici ne sont pas applicables et la technique de titrage doit faire l'objet d'une nouvelle étude.

L'analyste ne doit pas adopter une autre transformation à moins d'avoir démontré que la non satisfaction des conditions n'est pas accidentelle mais résulte d'une altération systématique des conditions expérimentales. Dans ce cas, il convient de répéter les vérifications décrites dans la section 3.1.1 avant d'adopter une nouvelle transformation pour les titrages de routine.

Un nombre excessif de résultats non valides pour cause de non-parallélisme ou de non-linéarité, dans un titrage de routine effectué pour comparer des préparations semblables, indique souvent une inadéquation du plan d'essai quant aux répétitions. Cette inadéquation résulte souvent d'une prise en compte incomplète des sources de variation susceptibles d'affecter le titrage, qui peut se traduire par une sous-estimation de l'erreur résiduelle et donc par l'obtention de rapports *F* élevés.

Il n'est pas toujours possible de prendre en compte toutes les sources de variation possibles dans un titrage unique (par ex. la variabilité d'un jour à l'autre). Dans ce cas, il peut arriver que les intervalles de confiance associés aux répétitions du titrage ne présentent pas un chevauchement satisfaisant, et il faut faire preuve de prudence dans l'interprétation des intervalles de confiance individuels. Pour obtenir une estimation plus fiable de l'intervalle de confiance, il peut être nécessaire de réaliser plusieurs titrages indépendants et de les combiner pour obtenir une estimation unique de l'activité, avec un seul intervalle de confiance (voir section 6).

Pour les besoins du contrôle de qualité des titrages de routine, il est recommandé de conserver un enregistrement des estimations de la pente de régression et de l'estimation de l'erreur résiduelle sous forme de graphiques de contrôle.

– Une erreur résiduelle exceptionnellement élevée peut être le signe d'un problème technique. Il convient d'effectuer des investigations en ce sens et, s'il peut être établi que quelque chose a altéré le bon déroulement de la procédure de titrage, de répéter le titrage. Une erreur résiduelle inhabituellement élevée peut également indiquer la présence d'un résultat aberrant occasionnel. Une réponse douteuse en raison d'une non conformité de la procédure au cours d'un titrage sera rejetée. Si une valeur aberrante est découverte après que les réponses ont été enregistrées, mais qu'il est possible d'établir une relation avec des irrégularités dans le déroulement du titrage, son omission peut être justifiée. Le rejet ou la rétention arbitraires d'une réponse apparemment aberrante peut être une source d'erreur grave. En règle générale, il est déconseillé de rejeter certaines observations pour la seule raison qu'un test de recherche de résultats aberrants a donné un résultat significatif.

– A l'inverse, il peut parfois arriver que, du fait d'une erreur résiduelle exceptionnellement faible, les rapports *F* dépassent les valeurs critiques. Dans ce cas, il peut être justifié de remplacer l'erreur résiduelle estimée à partir du titrage individuel par une erreur résiduelle moyenne calculée à partir des données historiques enregistrées dans les graphiques de contrôle.

#### *3.1.3. CALCULS ET RESTRICTIONS*

Conformément aux principes généraux de bonne conception des essais, les plans d'essai sont normalement soumis aux 3 restrictions suivantes, qui comportent des avantages tant du point de vue de la facilité du calcul que de la fidélité.

a) Le même nombre de dilutions doit être utilisé pour chacune des préparations.

b) Dans le modèle en lignes parallèles, le rapport entre les doses successives doit être constant pour tous les traitements du titrage ; dans le modèle à rapport de pente, l'intervalle entre les doses successives doit être constant pour tous les traitements du titrage.

c) Le nombre d'unités expérimentales doit être le même pour chaque traitement.

Si le plan d'essai utilisé respecte ces restrictions, les calculs sont simples. Les formules à appliquer sont données dans les sections 3.2 et 3.3. Il est recommandé d'utiliser un logiciel spécialement conçu à cet effet. Il existe plusieurs programmes capables de traiter facilement toutes les situations associées aux plans d'essai décrits dans les monographies. Ces programmes n'utilisent pas forcément tous les mêmes formules et algorithmes de calcul, mais ils doivent normalement conduire aux même résultats.

L'emploi de plans d'essai échappant à ces restrictions peut être à la fois envisageable et correct, mais les formules à appliquer dans ce cas sont trop complexes pour pouvoir être décrites ici. Une description succincte des méthodes de calcul est donnée dans la section 7.1. Ces méthodes sont également applicables dans le cas des plans restreints, où elles sont équivalentes aux formules simples.

Les formules données dans le présent texte pour les plans d'essai restreints peuvent être utilisées, par exemple, pour créer des programmes *ad hoc* avec un tableur. Les exemples décrits dans la section 5 peuvent servir à éclaircir les aspects statistiques et à vérifier si un programme donne des résultats corrects.

### 3.2. MODÈLE EN LIGNES PARALLÈLES

#### *3.2.1. INTRODUCTION*

Le modèle en lignes parallèles est illustré dans la figure 3.2.1.-I. Le logarithme des doses est porté sur l'axe horizontal, de gauche à droite dans l'ordre des concentrations croissantes. Les réponses sont portées sur l'axe vertical. Les réponses individuelles à chaque traitement sont figurées par des points noirs. Les 2 droites représentent la relation ln(dose)-réponse respectivement calculée pour l'étalon et pour la préparation à titrer.

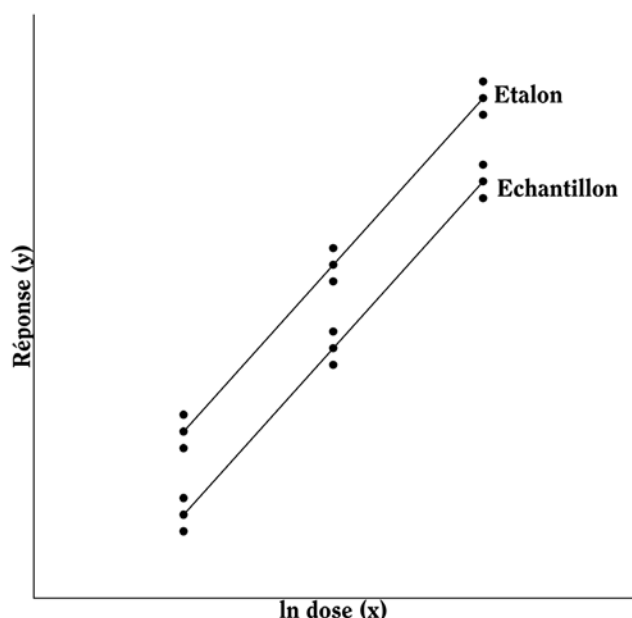



Figure 3.2.1.-I. – *Modèle en lignes parallèles pour un titrage 3 + 3*

*Note* : la forme logarithmique utilisée dans ce chapitre est toujours le logarithme népérien (ln ou $\log_e$). Le terme « antilogarithme » désigne par conséquent la grandeur $e^x$. Il est également possible, néanmoins, d'utiliser les logarithmes décimaux (log ou $\log_{10}$), auquel cas l'antilogarithme sera $10^x$.

Pour que le titrage donne un résultat satisfaisant, l'activité présumée de l'échantillon examiné doit être proche de l'activité vraie. C'est sur la base de cette activité présumée et de l'activité assignée de l'étalon que sont préparées des dilutions d'activité équivalente (si possible), c'est à dire que des doses correspondantes de l'étalon et de la préparation inconnue sont supposées donner la même réponse. Si l'on ne dispose d'aucune information sur l'activité présumée, des titrages préliminaires sont effectués sur un large intervalle de doses pour déterminer l'intervalle de linéarité de la courbe.

Plus l'activité présumée de la préparation à doser s'approche de la valeur vraie, plus proches seront les 2 droites puisque, à doses égales, elles sont censées donner des réponses égales. La distance horizontale entre les droites représente l'activité « vraie » de la préparation à doser, par rapport à son activité présumée. A l'inverse, plus la distance entre les 2 droites est grande, plus l'activité présumée est éloignée de la valeur vraie. Si la droite de la préparation à doser se situe à droite de celle de la préparation étalon, l'activité présumée est une surestimation, et les calculs donneront une activité estimée inférieure à l'activité présumée. A l'inverse, si la droite de la préparation à doser se situe à gauche de celle de la préparation étalon, l'activité présumée est une sous-estimation, et les calculs donneront une activité estimée supérieure à l'activité présumée.

*3.2.2. PLAN D'ESSAI*

Les considérations suivantes sont utiles pour optimiser la fidélité du plan d'essai :

1) le rapport entre la pente et l'erreur résiduelle doit être aussi élevé que possible,

2) l'intervalle de doses doit être aussi étendu que possible,

3) les droites doivent être aussi proches que possible, c'est à dire que l'activité présumée doit constituer une bonne estimation de l'activité vraie.

L'affectation des unités expérimentales (animaux, tubes, etc.) aux différents traitements peut être réalisée de diverses façons.

**3.2.2.1. Essai totalement randomisé**

Si l'ensemble des unités expérimentales peut être considéré comme raisonnablement homogène, sans que rien n'indique l'existence d'une moindre variabilité des réponses dans certains sous-groupes identifiables, l'affectation des unités aux différents traitements est effectuée de façon aléatoire.

Si certains sous-groupes (emplacements ou jours d'expérimentation par exemple) ont des chances d'être plus homogènes que l'ensemble des unités, il est possible d'améliorer la fidélité du titrage en introduisant une ou plusieurs restrictions dans le plan d'essai. Une distribution convenable des unités suivant ces restrictions permettra d'éliminer une ou plusieurs sources de variation inopportunes.

**3.2.2.2. Essai en blocs complets**

Ce plan d'essai permet d'éliminer une source de variation identifiable, par exemple les différences de sensibilité entre plusieurs portées d'animaux d'expérimentation ou les variations entre plusieurs boîtes de Pétri dans un dosage microbiologique par diffusion. Le plan prévoit que chaque traitement soit appliqué un nombre égal de fois à chaque bloc (portée ou boîte de Pétri) et n'est utilisable que lorsque le bloc est assez important pour recevoir chacun des traitements. Ceci est illustré dans la section 5.1.3. Il est également possible d'utiliser un essai randomisé avec répétitions. Les traitements sont alors attribués au hasard à l'intérieur de chaque bloc. Un algorithme permettant d'obtenir des permutations au hasard est donné dans la section 8.5.

**3.2.2.3. Carré latin**

Ce plan d'essai est approprié lorsque la réponse peut être affectée par deux sources de variation différentes, dont chacune peut prendre $k$ valeurs ou positions. Par exemple, dans le dosage d'un antibiotique par diffusion, les traitements peuvent être répartis selon une matrice $k \times k$, dans une grande boîte, chaque traitement figurant une seule fois dans chaque ligne et chaque colonne. On peut utiliser ce plan d'essai quand les nombres de lignes, de colonnes et de traitements sont égaux. Les réponses sont présentées sous forme d'un carré, dit carré latin. En isolant les variations dues aux différences de réponse entre les $k$ lignes et les $k$ colonnes, il est possible de réduire l'erreur. Un exemple de carré latin est présenté dans la section 5.1.2. Un algorithme permettant d'obtenir des carrés latins est donné dans la section 8.6. Des plans d'essai plus complexes, dans lesquels le carré latin comporte des réplications d'un ou plusieurs traitements, peuvent être utiles dans certaines circonstances. Les formules simplifiées données dans ce chapitre ne sont alors plus applicables, et il convient de faire appel à un statisticien.

**3.2.2.4. Essai croisé**

Ce plan d'essai est utile lorsque l'essai peut être subdivisé en blocs mais que l'on ne peut appliquer que 2 traitements à chaque bloc. Un bloc peut par exemple se composer d'une unité pouvant être utilisée 2 fois. Ce plan d'essai vise à augmenter la fidélité en éliminant les effets des différences entre unités, tout en compensant ceux d'une éventuelle différence de niveau général des réponses entre les 2 phases de l'essai. On parle de « double essai croisé » si l'on utilise 2 doses d'étalon et 2 doses de la préparation à examiner.

L'expérimentation se déroule en 2 phases séparées par un intervalle de temps convenable. On divise les unités en 4 groupes et chaque groupe reçoit 1 des 4 traitements au cours de la première phase de l'essai. Les unités ayant reçu une préparation dans la première phase de l'essai reçoivent l'autre lors la seconde, et les unités ayant reçu des doses faibles lors d'une phase reçoivent des doses élevées lors de la suivante. L'ordre d'attribution des doses est indiqué dans le tableau 3.2.2.-I. Un exemple est décrit dans la section 5.1.5.

Tableau 3.2.2.-I. – *Ordre des doses dans un essai croisé*

| Groupe d'unités | Temps I | Temps II |
|---|---|---|
| 1 | $S_1$ | $T_2$ |
| 2 | $S_2$ | $T_1$ |
| 3 | $T_1$ | $S_2$ |
| 4 | $T_2$ | $S_1$ |

### *3.2.3. ANALYSE DE VARIANCE*

On trouvera dans cette section les formules requises pour effectuer l'analyse de variance et les exemples traités dans la section 5.1 en faciliteront la compréhension. Il sera également utile de se référer à la liste de symboles figurant dans la section 9.

Les formules indiquées s'appliquent à des essais symétriques, où une ou plusieurs préparations à titrer (*T*, *U*, etc.) sont comparées à un étalon (*S*). Il est à noter que ces formules ne peuvent être utilisées que si les doses sont uniformément espacées, les nombres de traitements par préparation égaux, et le nombre d'applications de chaque traitement identique. Il est strictement déconseillé d'essayer d'appliquer ces formules dans toute autre situation.

Mis à part quelques ajustements nécessaires dans le calcul d'erreur, l'analyse des résultats d'un dosage s'effectue selon le même principe pour les essais totalement randomisés, en blocs complets ou en carré latin. Les formules applicables aux essais croisés suivent une logique de calcul légèrement différente et font l'objet de l'exemple 5.1.5.

Après examen des points discutés dans la section 3.1 et, si nécessaire, transformation des réponses, on calcule la moyenne des valeurs par traitement et par préparation, comme indiqué dans le tableau 3.2.3.-I. On forme également les contrastes linéaires qui se rapportent aux pentes des droites ln(dose)-réponse. 3 formules supplémentaires, nécessaires pour la construction de l'analyse de variance, sont données dans le tableau 3.2.3.-II.

La variation totale dans les réponses induites par les différents traitements fait ensuite l'objet d'une partition comme indiqué dans le tableau 3.2.3.-III, les sommes de carrés étant calculées à partir des valeurs obtenues dans les tableaux 3.2.3.-I et 3.2.3.-II. La somme des carrés due à la non-linéarité ne peut être calculée que si le titrage comporte au moins 3 doses par préparation.

L'erreur résiduelle associée au titrage s'obtient en soustrayant de la variation totale dans les réponses les variations prises en compte dans le plan d'essai (tableau 3.2.3.-IV). Dans ce tableau, $\bar{y}$ représente la moyenne de toutes les réponses enregistrées lors du titrage. On notera que, pour un carré latin, le nombre $n$ de réponses obtenu par traitement est égal au nombre de lignes, de colonnes ou de traitements $dh$.

La suite de l'analyse de variance s'effectue comme suit : diviser chaque somme de carrés par le nombre de degrés de liberté correspondant, pour obtenir les carrés moyens, puis rapporter le carré moyen obtenu pour chacune des variables à tester à l'erreur résiduelle $s^2$ et évaluer le degré de signification de ce rapport (dit rapport *F*) à l'aide de la table 8.1 ou d'une sous-routine appropriée d'un programme de calcul.

### *3.2.4. TESTS DE VALIDITÉ*

Les résultats du titrage sont considérés comme « statistiquement valides » si l'analyse de variance conduit aux conclusions suivantes.

1) Le terme de régression linéaire est significatif (probabilité calculée inférieure à 0,05). Si ce critère n'est pas satisfait, il est impossible de calculer les limites de confiance à 95 pour cent.

2) Le terme de non-parallélisme n'est pas significatif (probabilité calculée supérieure ou égale à 0,05). Ceci indique que la condition 5A (voir section 3.1) est satisfaite.

3) Le terme de non-linéarité n'est pas significatif (probabilité calculée supérieure ou égale à 0,05). Ceci indique que la condition 4A (voir section 3.1) est satisfaite.

Dans le cas d'un essai multiple, un écart de parallélisme significatif peut être dû à la présence dans l'essai d'une préparation donnant une droite ln(dose)-réponse ayant une pente différente de celle des autres préparations. Plutôt que

Tableau 3.2.3.-I. – *Formules pour les dosages à d doses de chaque préparation, modèle en lignes parallèles*

| | Etalon (*S*) | 1[er] échantillon à examiner (*T*) | 2[e] échantillon à examiner (*U*, etc.) |
|---|---|---|---|
| **Réponse moyenne à la dose la plus faible** | $S_1$ | $T_1$ | $U_1$ |
| **Réponse moyenne à la 2[e] dose** | $S_2$ | $T_2$ | $U_2$ |
| **...** | ... | ... | ... |
| **Réponse moyenne à la dose la plus élevée** | $S_d$ | $T_d$ | $U_d$ |
| **Total préparation** | $P_S = S_1 + S_2 + ... + S_d$ | $P_T = T_1 + T_2 + ... + T_d$ | $P_U = ...$etc. |
| **Contraste linéaire** | $L_S = 1S_1 + 2S_2 + ... + dS_d - \frac{1}{2}(d+1)P_S$ | $L_T = 1T_1 + 2T_2 + ... + dT_d - \frac{1}{2}(d+1)P_T$ | $L_U = ...$etc. |

Tableau 3.2.3.-II. – *Formules complémentaires pour la construction de l 'analyse de variance*

| | | |
|---|---|---|
| $H_P = \frac{n}{d}$ | $H_L = \frac{12n}{d^3 - d}$ | $K = \frac{n(P_S + P_T + ...)^2}{hd}$ |

Tableau 3.2.3.-III. – *Formules de calcul de la somme des carrés et degrés de liberté*

| Source de variation | Degrés de liberté (*f*) | Somme des carrés |
|---|---|---|
| **Préparations** | $h - 1$ | $SS_{\text{prep}} = H_P(P_S^2 + P_T^2 + ...) - K$ |
| **Régression linéaire** | 1 | $SS_{\text{reg}} = \frac{1}{h}H_L(L_S + L_T + ...)^2$ |
| **Non-parallélisme** | $h - 1$ | $SS_{\text{par}} = H_L(L_S^2 + L_T^2 + ...) - SS_{\text{reg}}$ |
| **Non-linéarité**[(*)] | $h(d-2)$ | $SS_{\text{lin}} = SS_{\text{trait}} - SS_{\text{prep}} - SS_{\text{reg}} - SS_{\text{par}}$ |
| **Traitements** | $hd - 1$ | $SS_{\text{trait}} = n(S_1^2 + ... + S_d^2 + T_1^2 + ... + T_d^2 + ...) - K$ |

[(*)] Non calculé pour les titrages à 2 doses



5. Textes généraux

Table 3.2.3.-IV. – *Estimation de l'erreur résiduelle*

| Source de variation | | Degrés de liberté | Somme des carrés |
|---|---|---|---|
| Blocs (lignes)(*) | | $n - 1$ | $SS_{\text{bloc}} = hd\left(R_1^2 + \ldots + R_n^2\right) - K$ |
| Colonnes(**) | | $n - 1$ | $SS_{\text{col}} = hd\left(C_1^2 + \ldots + C_n^2\right) - K$ |
| Erreur résiduelle (***) | Totalement randomisé | $hd\,(n - 1)$ | $SS_{\text{res}} = SS_{\text{tot}} - SS_{\text{trait}}$ |
| | Blocs complets | $(hd - 1)\,(n - 1)$ | $SS_{\text{res}} = SS_{\text{tot}} - SS_{\text{trait}} - SS_{\text{bloc}}$ |
| | Carré latin | $(hd - 2)\,(n - 1)$ | $SS_{\text{res}} = SS_{\text{tot}} - SS_{\text{trait}} - SS_{\text{bloc}} - SS_{\text{col}}$ |
| Total | | $nhd - 1$ | $SS_{\text{tot}} = \sum (y - \overline{y})^2$ |

Pour les carrés latins, ces formules ne sont applicables que si $n = hd$
(*) Non calculé pour les essais totalement randomisés
(**) Seulement calculé pour les carrés latins
(***) Dépend du type de plan d'essai utilisé



de déclarer non valide l'ensemble du titrage, il peut alors être décidé d'éliminer toutes les données relatives à cette préparation et de reprendre l'analyse au début.

Une fois la validité statistique établie, on peut estimer les activités et les limites de confiance associées par les méthodes décrites dans la section qui suit.

*3.2.5. ESTIMATION DE L'ACTIVITÉ ET LIMITES DE CONFIANCE*

Soit *I* le logarithme du rapport entre 2 doses successives d'une préparation. Dans le cas d'un dosage à *d* doses, la pente commune *b* est donnée par :

$$b = \frac{H_L\,(L_S + L_T + \ldots)}{Inh} \quad (3.2.5.\text{-}1)$$

et le logarithme du rapport d'activité d'une préparation à examiner, par exemple *T*, est égal à :

$$M'_T = \frac{P_T - P_S}{db} \quad (3.2.5.\text{-}2)$$

L'activité calculée est une estimation de l'activité « vraie » de chaque préparation. On peut obtenir les limites de confiance associées en calculant l'antilogarithme de :

$$CM'_T \pm \sqrt{(C-1)\,(CM'^2_T + 2V)} \quad (3.2.5.\text{-}3)$$

$$\text{où } C = \frac{SS_{\text{reg}}}{SS_{\text{reg}} - s^2t^2} \quad \text{et } V = \frac{SS_{\text{reg}}}{b^2dn}$$

La valeur *t* est donnée dans la table 8.2 pour *p* = 0,05 et un nombre de degrés de liberté égal à celui de l'erreur résiduelle. L'activité estimée $R_T$ et les limites de confiance associées s'obtiennent en multipliant par $A_T$ les valeurs obtenues, après conversion en antilogarithmes. Si l'activité des solutions mères, déterminée sur la base de l'activité assignée de la préparation étalon et de l'activité présumée de la préparation à examiner, n'est pas exactement équivalente, l'application d'un facteur de correction est nécessaire (voir exemples 5.1.2 et 5.1.3).

*3.2.6. VALEURS MANQUANTES*

Dans un dosage équilibré, il peut arriver qu'une ou plusieurs réponses fassent défaut par suite d'un accident n'ayant aucun rapport avec les traitements appliqués (par exemple la mort d'un des animaux). Si l'on considère que cet accident est sans lien aucun avec la composition de la préparation administrée, la réalisation de calculs exacts reste possible mais les formules à appliquer sont nécessairement plus compliquées et ne peuvent être données que dans le cadre des modèles linéaires généraux (voir section 7.1). Il existe néanmoins une méthode d'approximation qui permet de conserver la simplicité du plan équilibré, en remplaçant les réponses manquantes par des valeurs calculées. Pour compenser la perte d'information résultante, on soustrait du nombre de degrés de liberté utilisé pour la somme totale des carrés et l'erreur résiduelle le nombre de valeurs manquantes et on utilise l'une des formules données ci-après pour les valeurs manquantes. Il est toutefois important de souligner que cette méthode n'est qu'une approximation, et que l'emploi de la méthode exacte reste toujours préférable.

S'il manque plus d'une observation, les formules restent applicables. La méthode à suivre consiste alors à poser une approximation grossière pour toutes les valeurs manquantes sauf une, pour laquelle on applique les formules appropriées en utilisant toutes les autres valeurs y compris les approximations. La valeur ainsi calculée est ensuite introduite dans les formules pour poursuivre le calcul, de la même façon, pour la première des valeurs pour lesquelles on a précédemment posé une approximation. Une fois ce calcul effectué pour toutes les valeurs manquantes, on répète le cycle de calcul dans sa totalité depuis le début, en utilisant pour chaque calcul l'approximation ou la valeur calculée la plus récente pour chacune des réponses auxquelles est appliquée la formule. On poursuit ainsi jusqu'à ce que 2 cycles consécutifs donnent les mêmes valeurs. La convergence est généralement rapide.

Si le nombre de valeurs remplacées est faible, par rapport au nombre total d'observations obtenues dans l'ensemble de l'expérience (disons moins de 5 pour cent), l'approximation résultant de ce processus de remplacement et de réduction du nombre de degrés de liberté par le nombre de valeurs manquantes ainsi remplacées est généralement tout à fait satisfaisante. Il convient toutefois de faire preuve de beaucoup de prudence dans l'interprétation de l'analyse, notamment en cas de prépondérance de valeurs manquantes dans un traitement ou un bloc, et de solliciter l'avis d'un biométricien s'il apparaît quoi que ce soit d'inhabituel. Le remplacement de valeurs manquantes dans un essai sans répétition est une opération particulièrement délicate.

*Essai totalement randomisé*

Dans un essai totalement randomisé, la valeur manquante peut être remplacée par la moyenne arithmétique des autres réponses au même traitement.

*Essai en blocs complets*

La valeur manquante *y'* est obtenue à l'aide de l'équation :

$$y' = \frac{nB' + kT' - G'}{(n-1)\,(k-1)} \quad (3.2.6.\text{-}1)$$

où *B'* est la somme des réponses dans le bloc contenant la valeur manquante, *T'* le total du traitement correspondant et *G'* la somme de toutes les réponses obtenues dans le titrage.

*Carré latin*

La valeur manquante *y'* est obtenue à l'aide de l'équation :

$$y' = \frac{k\,(B' + C' + T') - 2G'}{(k-1)\,(k-2)} \quad (3.2.6.\text{-}2)$$

où *B'* et *C'* représentent respectivement la somme des réponses dans la ligne et dans la colonne contenant la valeur manquante. Dans le cas présent *k* = *n*.

*Essai croisé*

Si un accident conduisant à la perte de valeurs se produit dans un essai croisé, il convient de consulter un ouvrage de statistiques (par ex. D.J. Finney, voir section 10), car les formules à appliquer dépendent des combinaisons de traitements considérées.

## 3.3. MODÈLE À RAPPORT DE PENTE

### *3.3.1. INTRODUCTION*

Ce modèle est approprié, par exemple, pour certains titrages microbiologiques où la variable indépendante est la concentration d'un facteur de croissance essentiel inférieure à la concentration optimale du milieu. Le modèle à rapport de pente est illustré figure 3.3.1.-I.

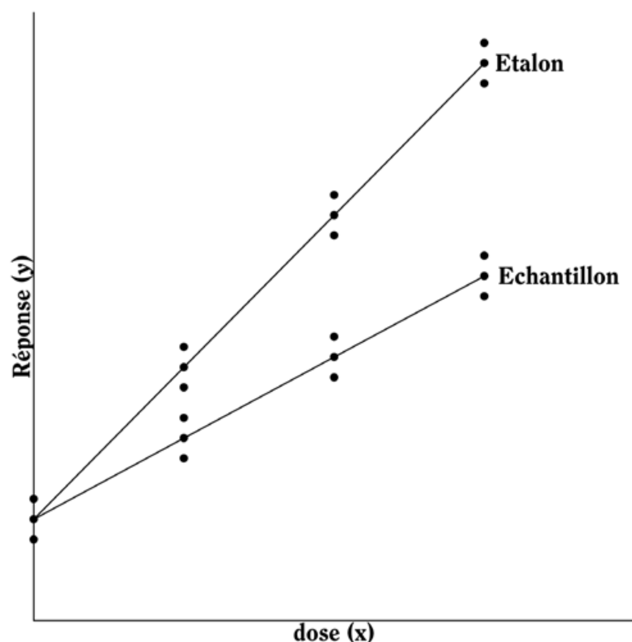



Figure 3.3.1.-I. – *Modèle à rapport de pente pour un titrage 2 × 3 + 1*

Les doses sont portées sur l'axe horizontal, de gauche à droite dans l'ordre des concentrations croissantes. Les réponses sont portées sur l'axe vertical. Les réponses individuelles à chaque traitement sont figurées par des points noirs. Les 2 droites représentent la relation dose-réponse respectivement calculée pour l'étalon et pour la préparation à titrer, dans l'hypothèse que leur point d'intersection se situe à la dose zéro. A la différence du modèle en lignes parallèles, il n'est pas effectué de transformation logarithmique des doses.

Par contre, tout comme dans un titrage selon le modèle en lignes parallèles, il est important que l'activité présumée de l'échantillon soit proche de l'activité vraie, et que les dilutions préparées pour les préparations à examiner et pour l'étalon soient (si possible) d'activité équivalente. Plus l'activité présumée de la préparation à doser s'approche de la valeur vraie, plus proches seront les 2 droites. Le rapport des pentes représente l'activité « vraie » de la préparation à doser, par rapport à son activité présumée. Si la pente de la droite obtenue pour la préparation à doser est plus forte que celle obtenue pour l'étalon, l'activité présumée est une sous-estimation, et les calculs donneront une activité estimée supérieure à l'activité présumée. A l'inverse, si la pente obtenue pour la préparation à doser est moins forte que celle obtenue pour l'étalon, l'activité présumée est une surestimation, et les calculs donneront une activité estimée inférieure à l'activité présumée.

Lors de la conception du plan d'essai, il convient de vérifier pour toutes les réponses que les conditions 1, 2 et 3 de la section 3.1 sont satisfaites. L'analyse de variance à effectuer en routine est décrite dans la section 3.3.3, avec vérification des conditions 4B et 5B de la section 3.1.

### *3.3.2. PLAN D'ESSAI*

L'utilisation de la méthode d'analyse statistique décrite ci-après impose les restrictions suivantes dans la réalisation de l'essai :

a) l'examen de l'étalon et des préparations à titrer doit être effectué avec le même nombre de dilutions équidistantes,

b) un groupe supplémentaire d'unités expérimentales n'ayant reçu aucun traitement (blancs) peut être examiné,

c) chaque groupe de traitement doit comporter le même nombre d'unités expérimentales.

Comme précédemment indiqué dans la section 3.1.3, l'emploi de plans d'essai échappant à ces restrictions peut être à la fois envisageable et correct, mais les méthodes d'analyse statistique simples présentées ici ne sont alors plus applicables et il convient de solliciter l'avis d'un expert ou d'utiliser un logiciel approprié.

On utilise en général un plan d'essai comportant 2 doses par préparation plus 1 blanc (dit essai « ($2h$ + 1) à zéro commun ») car ce type de plan assure une fidélité maximale tout en permettant de vérifier la validité dans les limites des contraintes mentionnées ci-dessus. Cependant, la linéarité de la relation ne se vérifie pas dans tous les cas jusqu'à la dose zéro. Il est possible, au prix d'une légère perte de fidélité, d'utiliser un plan d'essai ne comportant pas de blancs. Dans ce cas, il est préférable d'utiliser 3 doses par préparation (essai « ($3h$) à zéro commun ») plutôt que 2. Les doses sont choisies comme suit :

1) l'étalon est administré à une dose élevée, qui approche sans la dépasser la dose maximale donnant une réponse moyenne située dans la partie linéaire de la courbe dose-réponse,

2) les autres doses sont réparties de façon équidistante entre la dose maximale et la dose zéro,

3) les préparations à examiner sont administrées à des doses équivalentes, déterminées sur la base de l'activité présumée du produit.

On peut utiliser un plan totalement randomisé, un plan en blocs complets ou un carré latin comme décrit dans la section 3.2.2. Tout comme pour les titrages fondés sur le modèle en lignes parallèles, l'application de l'un de ces plans nécessite un ajustement à la somme des carrés de l'erreur. L'analyse du titrage d'une ou plusieurs préparations à examiner par rapport à un étalon est décrite ci-après.

### *3.3.3. ANALYSE DE VARIANCE*

#### **3.3.3.1. Plan (*hd* +1)**

Les réponses sont vérifiées, comme décrit dans la section 3.1, et si nécessaire transformées. On calcule ensuite la moyenne des réponses pour chaque traitement et pour chaque préparation, comme indiqué dans le tableau 3.3.3.1.-I, ainsi que la réponse moyenne des blancs $B$.

On procède ensuite au calcul des sommes de carrés utilisées dans l'analyse de variance, comme indiqué dans les tableaux 3.3.3.1.-I à 3.3.3.1.-III. La somme des carrés associée à la non-linéarité ne peut être calculée que si le titrage comprend au moins 3 doses pour chaque préparation. L'erreur résiduelle s'obtient en soustrayant de la variation totale dans les réponses les variations prises en compte dans le plan d'essai (tableau 3.3.3.1.-IV).

La suite de l'analyse de variance s'effectue comme suit : diviser chaque somme de carrés par le nombre de degrés de liberté correspondant, pour obtenir les carrés moyens, puis rapporter le carré moyen obtenu pour chacune des variables à tester à l'erreur résiduelle $s^2$ et évaluer le degré de signification de ce rapport (dit rapport $F$) à l'aide de la table 8.1 ou d'une sous-routine appropriée d'un programme de calcul.

#### **3.3.3.2. Plan (*hd*)**

Les formules à appliquer sont fondamentalement les mêmes que pour le plan ($hd$ + 1), à de légères différences près.

– $B$ est supprimé dans toutes les formules.

– $K = \dfrac{n\,(P_S + P_T + ...)^2}{hd}$

– $SS_{\text{blanc}}$ ne figure plus dans l'analyse de variance.

Tableau 3.3.3.1.-I. – *Formules pour les dosages à d doses de chaque préparation et 1 blanc, modèle à rapport de pente*

| | **Etalon (*S*)** | **1er échantillon à examiner (*T*)** | **2e échantillon à examiner (*U*, etc.)** |
|---|---|---|---|
| **Réponse moyenne à la dose la plus faible** | $S_1$ | $T_1$ | $U_1$ |
| **Réponse moyenne à la 2e dose** | $S_2$ | $T_2$ | $U_2$ |
| **...** | ... | ... | ... |
| **Réponse moyenne à la dose la plus élevée** | $S_d$ | $T_d$ | $U_d$ |
| **Total préparation** | $P_S = S_1 + S_2 + \ldots + S_d$ | $P_T = T_1 + T_2 + \ldots + T_d$ | $P_U = \ldots$ |
| **Produit linéaire** | $L_S = 1S_1 + 2S_2 + \ldots + dS_d$ | $L_T = 1T_1 + 2T_2 + \ldots + dT_d$ | $L_U = \ldots$ |
| **Ordonnée à l'origine** | $a_S = (4d+2)\,P_S - 6L_S$ | $a_T = (4d+2)\,P_T - 6L_T$ | $a_U = \ldots$ |
| **Pente** | $b_S = 2L_S - (d+1)\,P_S$ | $b_T = 2L_T - (d+1)\,P_T$ | $b_U = \ldots$ |
| **Traitements** | $G_S = S_1^2 + \ldots + S_d^2$ | $G_T = T_1^2 + \ldots + T_d^2$ | $G_U = \ldots$ |
| **Non-linéarité(*)** | $J_S = G_S - \frac{P_S^2}{d} - \frac{3b_S^2}{d^3 - d}$ | $J_T = G_T - \frac{P_T^2}{d} - \frac{3b_T^2}{d^3 - d}$ | $J_U = \ldots$ |

(*) Non calculé pour les titrages à 2 doses

Tableau 3.3.3.1.-II. – *Formules complémentaires pour la construction de l'analyse de variance*

| | | | |
|---|---|---|---|
| $H_B = \frac{nhd^2 - nhd}{hd^2 - hd + 4d + 2}$ | $H_I = \frac{n}{4d^3 - 2d^2 - 2d}$ | $a = \frac{a_S + a_T + \ldots}{h\,(d^2 - d)}$ | $K = \frac{n\,(B + P_S + P_T + \ldots)^2}{hd + 1}$ |

Tableau 3.3.3.1.-III. – *Formules de calcul de la somme des carrés et degrés de liberté*

| **Source de variation** | **Degrés de liberté (*f*)** | **Somme des carrés** |
|---|---|---|
| **Régression** | $h$ | $SS_{\mathrm{reg}} = SS_{\mathrm{trait}} - SS_{\mathrm{blanc}} - SS_{\mathrm{int}} - SS_{\mathrm{lin}}$ |
| **Blancs** | 1 | $SS_{\mathrm{blanc}} = H_B\,(B - a)^2$ |
| **Intersection** | $h - 1$ | $SS_{\mathrm{int}} = H_I\left(\left(a_S^2 + a_T^2 + \ldots\right) - h\,(d^2 - d)^2\,a^2\right)$ |
| **Non linéarité(*)** | $h\,(d-2)$ | $SS_{\mathrm{lin}} = n\,(J_S + J_T + \ldots)$ |
| **Traitements** | $hd$ | $SS_{\mathrm{trait}} = n\,(B^2 + G_S + G_T + \ldots) - K$ |

(*) Non calculé pour les titrages à 2 doses

Tableau 3.3.3.1.-IV. – *Estimation de l'erreur résiduelle*

| **Source de variation** | | **Degrés de liberté** | **Somme des carrés** |
|---|---|---|---|
| **Blocs (lignes)(*)** | | $n - 1$ | $SS_{\mathrm{bloc}} = hd\left(R_1^2 + \ldots + R_n^2\right) - K$ |
| **Colonnes(**)** | | $n - 1$ | $SS_{\mathrm{col}} = hd\left(C_1^2 + \ldots + C_n^2\right) - K$ |
| **Erreur résiduelle(***)** | **Totalement randomisé** | $(hd+1)\,(n-1)$ | $SS_{\mathrm{res}} = SS_{\mathrm{tot}} - SS_{\mathrm{trait}}$ |
| | **Blocs complets** | $hd\,(n-1)$ | $SS_{\mathrm{res}} = SS_{\mathrm{tot}} - SS_{\mathrm{trait}} - SS_{\mathrm{bloc}}$ |
| | **Carré latin** | $(hd-1)\,(n-1)$ | $SS_{\mathrm{res}} = SS_{\mathrm{tot}} - SS_{\mathrm{trait}} - SS_{\mathrm{bloc}} - SS_{\mathrm{col}}$ |
| **Total** | | $nhd + n - 1$ | $SS_{\mathrm{tot}} = \sum (y - \overline{y})^2$ |

Pour les carrés latins, ces formules ne sont applicables que si $n = hd$
(*) Non calculé pour les essais totalement randomisés
(**) Seulement calculé pour les carrés latins
(***) Dépend du type de plan d'essai utilisé

– le nombre de degrés de liberté pour les traitements devient *hd* – 1.
– le nombre de degrés de liberté pour l'erreur résiduelle la variance totale est calculé comme décrit pour le modèle en lignes parallèles (voir tableau 3.2.3.-IV).

Pour vérifier la validité du titrage et calculer l'activité et les intervalles de confiance, on procède comme indiqué dans les sections 3.3.4 et 3.3.5.

*3.3.4. TESTS DE VALIDITÉ*

Les résultats du titrage sont considérés comme « statistiquement valides » si l'analyse de variance conduit aux conclusions suivantes :

1) le terme « blancs » dans les plans (*hd* + 1) n'est pas significatif (probabilité calculée supérieure ou égale à 0,05) ; ceci indique que les réponses obtenues pour les blancs ne diffèrent pas significativement de l'ordonnée à l'origine commune, et que la relation linéaire est valide jusqu'à la dose zéro ;

2) le terme d'intersection n'est pas significatif (probabilité calculée supérieure ou égale à 0,05) ; ceci indique que la condition 5B (voir section 3.1) est satisfaite ;

3) dans les titrages comprenant au moins 3 doses par préparation, le terme de non-linéarité n'est pas significatif (probabilité calculée supérieure ou égale à 0,05) ; ceci indique que la condition 4B (voir section 3.1) est satisfaite.

L'existence d'une variabilité significative pour les blancs indique que l'hypothèse de linéarité n'est pas vérifiée au voisinage de la dose zéro. Si cette situation semble être systématique plutôt qu'accidentelle, pour le type de titrage considéré, le plan (*hd*) est mieux adapté. Il convient dans ce cas de négliger toutes les réponses obtenues avec les blancs.

Une fois la validité du dosage établie au moyen de ces tests, le calcul de l'activité et des limites de confiance associées est effectué comme décrit dans la section 3.3.5.

*3.3.5. ESTIMATION DE L'ACTIVITÉ ET LIMITES DE CONFIANCE*

**3.3.5.1. Plan (*hd* + 1)**

L'ordonnée à l'origine $a'$ commune à toutes les préparations est donnée par :

$$a' = \frac{(2d+1)\,B + (2d-3)\,ha}{h\,(2d-3) + 2d + 1} \qquad (3.3.5.1.\text{-}1)$$

L'équation suivante permet de calculer la pente de la courbe de l'étalon, celles des autres courbes étant calculées de la même manière :

$$b'_S = \frac{6L_S - 3d\,(d+1)\,a'}{2d^3 + 3d^2 + d} \qquad (3.3.5.1.\text{-}2)$$

Le rapport d'activité est égal, pour chaque préparation, à :

$$R'_T = \frac{b'_T}{b'_S} \qquad (3.3.5.1.\text{-}3)$$

et doit être multiplié par $A_T$, l'activité présumée de la préparation à doser, pour obtenir l'activité estimée $R_T$. Si l'écart entre 2 doses successives n'est pas identique pour l'étalon et pour la préparation à doser, l'activité doit en outre être multipliée par $I_S/I_T$. Notons que, à la différence du modèle en lignes parallèles, il n'est pas effectué ici de calcul des antilogarithmes.

L'intervalle de confiance associé à $R'_T$ est donné par :

$$CR'_T - K' \pm \sqrt{(C-1)\,(CR'^2_T + 1) + K'\,(K' - 2CR'_T)} \qquad (3.3.5.1.\text{-}4)$$

où $C = \dfrac{b'^2_S}{b'^2_S - s^2t^2V_1}$ et $K' = (C-1)\,V_2$

$V_1$ et $V_2$ sont fonction de la variance et de la covariance du numérateur et du dénominateur de $R'_T$. Il peuvent être calculés comme suit :

$$V_1 = \frac{6}{n\,(2d+1)}\left(\frac{1}{d\,(d+1)} + \frac{3}{2\,(2d+1) + hd\,(d-1)}\right) \qquad (3.3.5.1.\text{-}5)$$

$$V_2 = \frac{3d\,(d+1)}{(3d+1)\,(d+2) + hd\,(d-1)} \qquad (3.3.5.1.\text{-}6)$$

Les limites de confiance sont multipliées par $A_T$ et si nécessaire par $I_S/I_T$.

**3.3.5.2. Plan (*hd*)**

Les formules sont les mêmes que pour le plan (*hd* + 1), aux modifications suivantes près :

$$a' = a \qquad (3.3.5.2.\text{-}1)$$

$$V_1 = \frac{6}{nd\,(2d+1)}\left(\frac{1}{d+1} + \frac{3}{h\,(d-1)}\right) \qquad (3.3.5.2.\text{-}2)$$

$$V_2 = \frac{3\,(d+1)}{3\,(d+1) + h\,(d-1)} \qquad (3.3.5.2.\text{-}3)$$

3.4. COURBES DOSE-REPONSE SIGMOÏDES ÉTENDUES

Le modèle présenté ici est approprié, par exemple, pour certains immunodosages nécessitant l'analyse de courbes dose-réponse sigmoïdes étendues. Il est illustré figure 3.4.-I.

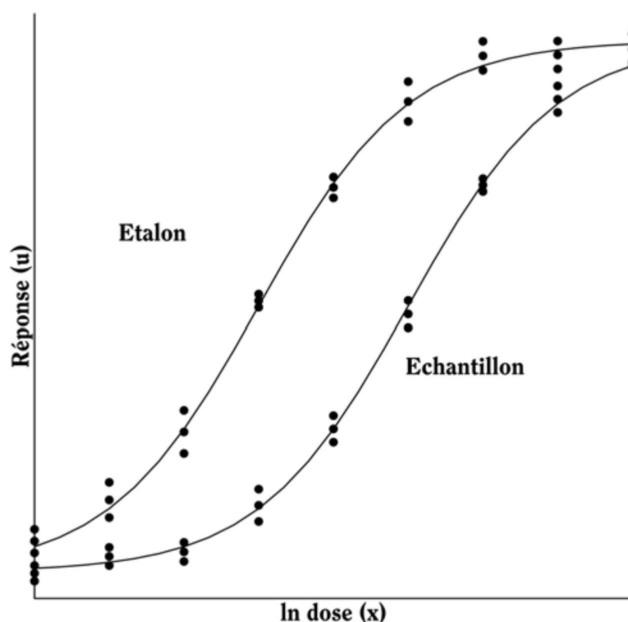



Figure 3.4.-I. – *Modèle de distribution logistique à 4 paramètres*

Le logarithme des doses est porté en abscisse, avec la concentration la plus faible à gauche et la plus élevée à droite. Les réponses sont portées en ordonnée. Chaque réponse individuelle à un traitement donné est représentée par un point. Les 2 courbes représentent respectivement la relation ln(dose)-réponse calculée pour la préparation de référence et pour la préparation à examiner.

L'allure générale des courbes peut en général être décrite par une fonction logistique, mais il existe d'autres formes possibles. Chaque courbe peut être caractérisée par 4 paramètres : l'asymptote supérieure $\alpha$, l'asymptote inférieure $\delta$, le facteur de pente $\beta$ et la position horizontale $\gamma$. C'est pourquoi ce modèle est souvent appelé modèle à 4 paramètres. Une expression mathématique possible de la courbe dose-réponse est :

5. Textes généraux

$$u = \delta + \frac{\alpha - \delta}{1 + e^{-\beta(x-\gamma)}}$$

Une des conditions de validité du dosage est que les courbes de la préparation de référence et de la préparation à examiner possèdent le même facteur de pente et les mêmes niveaux de réponse maximale et minimale aux doses extrêmes. Elles ne peuvent différer que par leur position horizontale $\gamma$. La distance horizontale séparant les courbes dépend de l'activité « vraie » de la préparation inconnue. Si le dosage est utilisé en routine, il peut suffire de valider la condition d'égalité des réponses maximale et minimale lors du développement du dosage, et de ne revalider directement cette condition qu'à intervalles de temps appropriés ou lorsque des modifications sont apportées aux matériels ou conditions de dosage.

Les estimations les plus probables des paramètres et leurs intervalles de confiance peuvent être obtenus à l'aide de programmes informatiques appropriés. Ces programmes peuvent comprendre certains tests statistiques fournissant des indications sur la validité. Par exemple, si l'estimation la plus probable présente un écart significatif par rapport au modèle ajusté dans les conditions d'égalité supposée des asymptotes supérieure et inférieure et du facteur de pente, il est possible que l'une ou la totalité de ces conditions ne soient pas satisfaites.

Le modèle logistique pose un certain nombre de problèmes statistiques qui peuvent appeler des solutions diversifiées selon les types de dosage considérés, dont il n'est pas possible de donner un résumé simple. Une grande diversité d'approches possibles sont décrites dans la littérature. Il est donc recommandé de solliciter l'avis d'un statisticien pour ce type d'analyse. Un exemple simple en est toutefois décrit dans la section 5.4, pour illustrer un mode « possible » d'analyse des données présentées. Une brève discussion des approches alternatives et de diverses considérations statistiques figure dans la section 7.5.

Lorsque l'on ne peut recourir ni à l'avis d'un statisticien ni à un logiciel approprié, d'autres approches sont possibles : 1) si l'on dispose d'estimations « raisonnables » de la limite supérieure $\alpha$ et de la limite inférieure $\delta$, sélectionnez pour toutes les préparations les doses pour lesquelles la moyenne des réponses $u$ se situe entre approximativement 20 pour cent et 80 pour cent de ces limites, puis appliquez à l'ensemble des réponses correspondant aux doses sélectionnées la transformation $y = \ln\left(\frac{u-\delta}{\alpha-u}\right)$ et procédez à l'analyse à l'aide du modèle en lignes parallèles (section 3.2) ; 2) sélectionnez une série de doses pour lesquelles les réponses $u$ ou les réponses transformées appropriées, par exemple ln($u$), sont approximativement linéaires si on les représente en fonction du ln(dose) ; on peut alors procéder à l'analyse à l'aide du modèle en lignes parallèles (section 3.2).

# 4. TITRAGES FONDÉS SUR DES RÉPONSES QUALITATIVES

## 4.1. INTRODUCTION

Dans certains titrages, il est impossible ou excessivement laborieux de mesurer la réponse de chaque unité expérimentale selon une échelle quantitative. On peut par contre observer si une réponse, telle que la mort ou des symptômes d'hypoglycémie, se produit ou non dans chaque unité : le résultat dépend donc du nombre d'unités donnant une réponse positive. De tels essais sont dits qualitatifs ou « tout ou rien ».

La situation est très voisine de celle décrite dans la section 3.1 pour les titrages fondés sur des effets quantitatifs, mais au lieu d'avoir $n$ réponses séparées pour chaque traitement, on n'enregistre qu'une seule valeur, la fraction d'unités de chaque groupe qui présentent une réponse. La représentation graphique de ces fractions en fonction du logarithme de la dose donne en général une courbe sigmoïde (en S) plutôt qu'une droite. On utilise alors une fonction mathématique décrivant cette courbe sigmoïde pour obtenir une estimation de la courbe dose-réponse. La fonction la plus couramment utilisée à cet effet est la loi de distribution normale. Cette loi présente un intérêt théorique certain, et est probablement la mieux adaptée lorsque la réponse reflète la tolérance des unités. Si, par contre, la réponse est plutôt susceptible de dépendre d'un processus de croissance, l'emploi du modèle de distribution logistique est préférable bien que la différence entre les résultats respectivement obtenus avec ces deux modèles soit généralement très faible.

Les estimations les plus probables de la pente et de la position des courbes ne peuvent être obtenues que par une procédure itérative. Il existe de nombreuses procédures qui conduisent au même résultat, mais diffèrent quant à leur efficacité en raison de la rapidité de la convergence. L'une des méthodes les plus rapides est l'optimisation directe de la fonction de vraisemblance maximale (voir section 7.1), qu'il est facile de réaliser avec des programmes informatiques comportant une procédure prévue à cet effet. Malheureusement, ces procédures ne donnent pas, pour la plupart, d'estimation de l'intervalle de confiance, et la technique à utiliser pour l'obtenir est trop complexe pour pouvoir être décrite ici. La technique décrite ci-après n'est donc pas la plus rapide, mais elle a été choisie pour sa relative simplicité. Elle peut être utilisée pour le titrage d'une ou plusieurs préparations par comparaison à une préparation étalon. Les conditions suivantes doivent être satisfaites :

1) la relation entre le logarithme de la dose et la réponse peut être représentée par une courbe de distribution normale,

2) les courbes obtenues pour l'étalon et la préparation à examiner sont parallèles, c'est-à-dire qu'elles ont une allure identique et ne diffèrent que par leur position horizontale,

3) en théorie, il n'existe pas de réponse naturelle aux doses extrêmement faibles ni de non réponse naturelle aux doses extrêmement élevées.

## 4.2. MÉTHODE DES PROBITS

Il est possible de rendre linéaire la courbe sigmoïde en remplaçant chaque réponse (c'est à dire la fraction de réponses positives par groupe) par la valeur correspondante de la loi normale centrée réduite. Cette valeur, souvent appelée « normit », peut théoriquement prendre des valeurs allant de $-\infty$ à $+\infty$. Il était proposé, dans le passé, d'ajouter 5 à chaque normit, pour obtenir des « probits », ce qui facilitait les calculs en évitant d'avoir à traiter des valeurs négatives. L'avènement de l'informatique a rendu cette opération superflue. Il serait donc plus juste d'appeler « méthode des normits » la méthode décrite ci-après mais, comme le terme « analyse des probits » est très largement utilisé, il a été décidé de le conserver ici pour des raisons historiques.

Une fois les réponses linéarisées, il devrait normalement être possible d'effectuer une analyse en lignes parallèles comme décrit dans la section 3.2. Malheureusement, la condition de validité relative à l'homogénéité de la variance pour chaque dose n'est pas satisfaite. La variance est en effet minimale à normit = 0 et croît lorsque le normit prend des valeurs négatives et positives. Il est donc nécessaire de donner davantage de poids aux réponses situées au milieu de la courbe qu'à celles situées dans ses parties extrêmes. La méthode utilisée à cet effet est décrite ci-après, ainsi que l'analyse de variance et l'estimation de l'activité et de l'intervalle de confiance.

### *4.2.1. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS SOUS FORME DE TABLEAU*

Les données obtenues sont reportées dans les colonnes du tableau 4.2.1.-I, numérotées comme suit :

(1) dose de la préparation étalon ou de la préparation à doser,

(2) nombre $n$ d'unités soumises à chaque traitement,

(3) nombre $r$ d'unités donnant une réponse positive au traitement,

(4) logarithme $x$ de la dose,

(5) fraction $p = r/n$ de réponses positives par groupe.

Le premier cycle de calcul commence ensuite :

(6) la colonne *Y* ne comporte que des zéros à la première itération,

(7) valeur $\Phi = \Phi(Y)$ correspondante de la loi normale centrée réduite (voir également table 8.4).

Les valeurs à inscrire dans les colonnes (8) à (10) sont calculées à l'aide des formules suivantes :

(8) $$Z = \frac{e^{-Y^2/2}}{\sqrt{2\pi}} \quad (4.2.1.\text{-}1)$$

(9) $$y = Y + \frac{p - \Phi}{Z} \quad (4.2.1.\text{-}2)$$

(10) $$w = \frac{nZ^2}{\Phi - \Phi^2} \quad (4.2.1.\text{-}3)$$

Il est facile de calculer les valeurs des colonnes (11) à (15) à partir de celles des colonnes (4), (9) et (10) car elles sont respectivement égales à $wx$, $wy$, $wx^2$, $wy^2$ et $wxy$, et la somme $\Sigma$ de chacune des colonnes (10) à (15) est calculée séparément pour chaque préparation.

Les sommes calculées dans le tableau 4.2.1.-I sont ensuite reportées dans les colonnes (1) à (6) du tableau 4.2.1.-II dont les colonnes (7) à (12) sont alors calculées comme suit :

(7) $$S_{xx} = \sum wx^2 - \frac{(\sum wx)^2}{\sum w} \quad (4.2.1.\text{-}4)$$

(8) $$S_{xy} = \sum wxy - \frac{(\sum wx)(\sum wy)}{\sum w} \quad (4.2.1.\text{-}5)$$

(9) $$S_{yy} = \sum wy^2 - \frac{(\sum wy)^2}{\sum w} \quad (4.2.1.\text{-}6)$$

(10) $$\overline{x} = \frac{\sum wx}{\sum w} \quad (4.2.1.\text{-}7)$$

(11) $$\overline{y} = \frac{\sum wy}{\sum w} \quad (4.2.1.\text{-}8)$$

La pente commune *b* est égale à :

$$b = \frac{\sum S_{xy}}{\sum S_{xx}} \quad (4.2.1.\text{-}9)$$

et l'équation suivante permet de calculer l'ordonnée à l'origine *a* de la courbe de l'étalon, celles des autres courbes étant calculées de la même manière :

(12) $$a = \overline{y} - b\overline{x} \quad (4.2.1.\text{-}10)$$

On peut alors remplacer les valeurs de la colonne (6) du premier tableau de travail par $Y = a + bx$, et répéter ainsi le cycle de calcul jusqu'à obtention d'une différence suffisamment faible entre 2 cycles (par ex. obtention pour *Y*, entre 2 cycles consécutifs, d'une différence inférieure à $10^{-8}$).

*4.2.2. TESTS DE VALIDITÉ*

Avant de procéder au calcul des activités et des intervalles de confiance, il faut vérifier la validité du titrage. Si le plan d'essai comporte au moins 3 doses pour chaque préparation, les écarts de linéarité peuvent être mesurés comme suit : ajouter une 13<sup>e</sup> colonne au tableau 4.2.1.-II et porter dans cette colonne les valeurs de

$$S_{yy} - \frac{S_{xy}^2}{S_{xx}} \quad (4.2.2.\text{-}1)$$

Le total de la colonne est une mesure des écarts de linéarité et suit approximativement une loi $\chi^2$ comportant un nombre de degrés de liberté égal à $N - 2h$. Le niveau de signification de cette valeur peut être évalué à l'aide de la table 8.3 ou d'une sous-routine appropriée d'un programme informatique. Si la valeur est significative au niveau de probabilité 0,05, le titrage doit probablement être rejeté (voir section 4.2.4).

Si le test ne fait pas apparaître d'écarts significatifs par rapport à la régression linéaire, le test suivant est effectué pour les écarts de parallélisme, au niveau de signification 0,05 :

$$\chi^2 = \sum \frac{S_{xy}^2}{S_{xx}} - \frac{(\sum S_{xy})^2}{\sum S_{xx}} \quad (4.2.2.\text{-}2)$$

avec $h - 1$ degrés de liberté.

*4.2.3. ESTIMATION DE L'ACTIVITÉ ET LIMITES DE CONFIANCE*

S'il n'apparaît pas d'écarts significatifs de parallélisme ou de linéarité, le calcul du ln(rapport d'activité) $M_T'$ est effectué :

$$M_T' = \frac{a_T - a_S}{b} \quad (4.2.3.\text{-}1)$$

Tableau 4.2.1.-I. – *Premier tableau de travail*

| | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) | (9) | (10) | (11) | (12) | (13) | (14) | (15) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | dose | *n* | *r* | *x* | *p* | *Y* | $\Phi$ | *Z* | *y* | *w* | *wx* | *wy* | $wx^2$ | $wy^2$ | *wxy* |
| *S* | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| | | | | | | | | | | Σ = | Σ = | Σ = | Σ = | Σ = | Σ = |
| *T* | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| | | | | | | | | | | Σ = | Σ = | Σ = | Σ = | Σ = | Σ = |
| etc. | | | | | | | | | | | | | | | |

Tableau 4.2.1.-II. – *Second tableau de travail*

| | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) | (9) | (10) | (11) | (12) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $\Sigma w$ | $\Sigma wx$ | $\Sigma wy$ | $\Sigma wx^2$ | $\Sigma wy^2$ | $\Sigma wxy$ | $S_{xx}$ | $S_{xy}$ | $S_{yy}$ | $\overline{x}$ | $\overline{y}$ | *a* |
| *S* | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| *T* | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| etc. | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| | | | | | | | Σ = | Σ = | | | | |

5. Textes généraux

et le résultat transformé en antilogarithme. Posons maintenant $t = 1{,}96$ et $s = 1$. Les limites de confiance sont les antilogarithmes des valeurs :

$$CM'_T-(C-1)(\overline{x}_S-\overline{x}_T)\pm\sqrt{(C-1)\left(V\sum S_{xx}+C\left(M'_T-\overline{x}_S+\overline{x}_T\right)^2\right)} \quad (4.2.3.\text{-}2)$$

$$\text{où } C = \frac{b^2\sum S_{xx}}{b^2\sum S_{xx}-s^2t^2} \quad \text{et } V = \frac{1}{\sum\limits_S w}+\frac{1}{\sum\limits_T w}$$

*4.2.4. TITRAGES NON VALIDES*

Lorsque le test de linéarité décrit dans la section 4.2.2 donne un résultat significatif, le titrage doit normalement être rejeté. S'il est décidé d'accepter l'essai, les formules sont légèrement modifiées : $t$ devient la valeur $t$ ($p = 0{,}05$) qui correspond au nombre de degrés de liberté utilisé pour le test de linéarité et $s^2$ devient la valeur $\chi^2$ divisée par le même nombre de degrés de liberté (donc une valeur typiquement supérieure à 1).

Le test de parallélisme est lui aussi légèrement modifié. La valeur $\chi^2$ pour le non-parallélisme est divisée par le nombre de degrés de liberté correspondant, et le résultat est à son tour divisé par la valeur $s^2$ calculée ci-dessus ; on obtient ainsi un rapport $F$ à $h - 1$ et $N - 2h$ degrés de liberté, qui est évalué selon la méthode habituelle au niveau de signification 0,05.

4.3. MÉTHODE DES LOGITS

Comme indiqué dans la section 4.1, la méthode des logits est parfois mieux adaptée que celle des probits. Cette méthode est ainsi désignée car elle est dérivée de la fonction logit, qui est la réciproque de la loi logistique. La procédure à suivre est similaire à celle décrite pour les probits, aux modifications suivantes près des formules pour $\Phi$ et $Z$.

$$\Phi = \frac{1}{1+e^{-Y}} \quad (4.3.\text{-}1)$$

$$Z = \frac{e^{-Y}}{(1+e^{-Y})^2} \quad (4.3.\text{-}2)$$

4.4. AUTRES FORMES DE COURBES

La méthode des probits ou des logits est dans presque tous les cas adéquate pour l'analyse des réponses qualitatives dans le cadre de la Pharmacopée européenne. Si, toutefois, il peut être établi que la courbe ln (dose)-réponse a une autre forme que les 2 courbes décrites ci-dessus, il est possible d'adopter une autre fonction $\Phi$. On utilise alors pour $Z$ la dérivée première de $\Phi$.

Par exemple, s'il peut être démontré que la courbe n'est pas symétrique, la loi de Gompertz peut être appropriée (méthode des gompits), auquel cas on aura $\Phi = 1 - e^{-e^Y}$ et $Z = e^{Y-e^Y}$.

4.5. DOSE EFFICACE MÉDIANE

Dans certains types de titrages, il est souhaitable de déterminer la dose efficace médiane ($DE_{50}$), c'est-à-dire la dose qui produit une réponse dans 50 pour cent des cas (unités). La méthode des probits peut être utilisée pour déterminer cette dose efficace médiane mais, comme il n'est pas nécessaire d'exprimer cette dose par rapport à un étalon, les formules à appliquer sont légèrement différentes.

*NOTE* : il est néanmoins possible d'utiliser un étalon, pour la validation du titrage. En règle générale, le titrage est considéré comme valide si la $DE_{50}$ calculée pour l'étalon est suffisamment proche de la $DE_{50}$ assignée. La signification de l'expression « suffisamment proche » dans ce contexte dépendra des exigences spécifiées dans la monographie.

On procède à la mise en tableau des réponses obtenues pour les échantillons à examiner, et éventuellement pour l'étalon, comme décrit dans la section 4.2.1, puis l'essai de linéarité est effectué comme indiqué dans la section 4.2.2. L'essai de parallélisme n'est pas nécessaire pour ce type de titrage. La $DE_{50}$ de l'échantillon $T$ (de même que celle des autres échantillons) s'obtient comme décrit dans la section 4.2.3, aux modifications suivantes près dans les formules 4.2.3.-1 et 4.2.3.-2) :

$$M'_T = \frac{-a_T}{b} \quad (4.5.\text{-}1)$$

et

$$CM'_T-(C-1)\overline{x}_T\pm\sqrt{(C-1)\left(V\sum S_{xx}+C\left(M'_T-\overline{x}_T\right)^2\right)} \quad (4.5.\text{-}2)$$

$$\text{où } V = \frac{1}{\sum\limits_T w} \quad \text{et } C \text{ reste inchangé}$$

# 5. EXEMPLES

Cette section décrit une série d'exemples illustrant l'application des formules. Ces exemples ont été choisis en premier lieu pour leur valeur illustrative du point de vue de la méthode de calcul statistique utilisée et non, lorsque l'emploi de méthodes alternatives est autorisé dans une monographie particulière, dans l'intention d'indiquer la meilleure méthode de titrage. Comme ils peuvent également servir d'outils de vérification des programmes informatiques, le nombre de décimales indiqué est plus élevé qu'il n'est habituellement nécessaire. Notons également qu'il existe d'autres méthodes de calcul équivalentes. Elles doivent normalement conduire aux mêmes résultats exactement que celles utilisées dans les exemples.

5.1. MODÈLE EN LIGNES PARALLÈLES

*5.1.1. ESSAI MULTIPLE À 2 DOSES TOTALEMENT RANDOMISÉ*

*Titrage de la corticotropine par injection sous-cutanée chez le rat*

La préparation étalon est administrée à raison de 0,25 unité et 1,0 unité pour 100 g de masse corporelle. Les deux préparations à examiner possèdent une activité présumée de 1 unité/mg, et sont administrées dans les mêmes quantités que l'étalon. Les réponses obtenues et les moyennes par traitement sont reportées dans le tableau 5.1.1.-I. La représentation graphique des données ne laisse subsister aucun doute sur l'homogénéité de la variance et la normalité des données, mais fait suspecter un éventuel problème de parallélisme pour la préparation $U$.

Tableau 5.1.1.-I. – *Réponse instrumentale y : masse d'acide ascorbique (mg) pour 100 g de surrénale*

| | **Etalon *S*** | | **Préparation *T*** | | **Préparation *U*** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $S_1$ | $S_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $U_1$ | $U_2$ |
| | 300 | 289 | 310 | 230 | 250 | 236 |
| | 310 | 221 | 290 | 210 | 268 | 213 |
| | 330 | 267 | 360 | 280 | 273 | 283 |
| | 290 | 236 | 341 | 261 | 240 | 269 |
| | 364 | 250 | 321 | 241 | 307 | 251 |
| | 328 | 231 | 370 | 290 | 270 | 294 |
| | 390 | 229 | 303 | 223 | 317 | 223 |
| | 360 | 269 | 334 | 254 | 312 | 250 |
| | 342 | 233 | 295 | 216 | 320 | 216 |
| | 306 | 259 | 315 | 235 | 265 | 265 |
| Moyenne | 332,0 | 248,4 | 323,9 | 244,0 | 282,2 | 250,0 |

5. Textes généraux

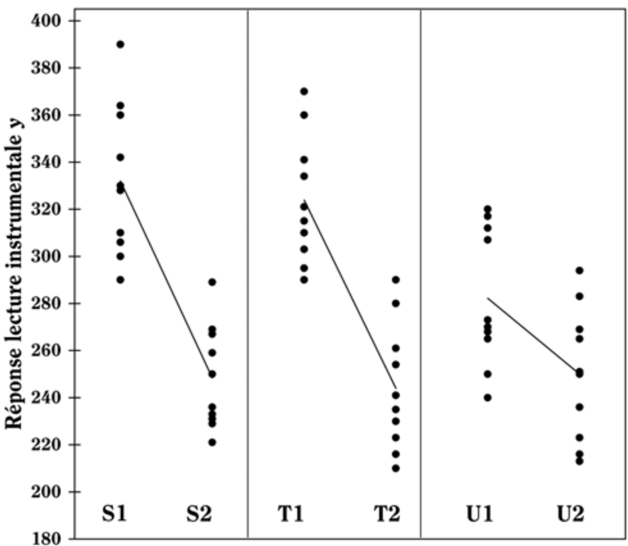



Figure 5.1.1.-I.

L'application des formules des tableaux 3.2.3.-I et 3.2.3.-II conduit aux résultats suivants :

$P_S$ = 580,4 $L_S$ = – 41,8

$P_T$ = 567,9 $L_T$ = – 39,95

$P_U$ = 532,2 $L_U$ = – 16,1

$H_P = \frac{10}{2} = 5$ $H_L = \frac{120}{6} = 20$

On peut alors poursuivre l'analyse de variance en appliquant les formules des tableaux 3.2.3-III et 3.2.3.-IV. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.1.1.-II.

Tableau 5.1.1.-II. – *Analyse de variance*

| **Source de variation** | **Degrés de liberté** | **Somme des carrés** | **Carré moyen** | **Rapport F** | **Probabilité** |
|---|---|---|---|---|---|
| Préparations | 2 | 6256,6 | 3128,3 | | |
| Régression | 1 | 63 830,8 | 63 830,8 | 83,38 | 0,000 |
| Non parallélisme | 2 | 8218,2 | 4109,1 | 5,37 | 0,007 |
| Traitements | 5 | 78 305,7 | | | |
| Erreur résiduelle | 54 | 41 340,9 | 765,57 | | |
| Total | 59 | 119 646,6 | | | |

L'analyse confirme que la régression linéaire est hautement significative. L'écart de parallélisme, toutefois, est également significatif ($p$ = 0,0075), ce que laissait d'ailleurs suspecter la représentation graphique, où la droite correspondant à la préparation $U$ n'est pas parallèle à celle de l'étalon. Cette préparation est donc rejetée et l'analyse répétée avec seulement la préparation $T$ et l'étalon.

Tableau 5.1.1.-III. – *Analyse de variance sans la préparation U*

| **Source de variation** | **Degrés de liberté** | **Somme des carrés** | **Carré moyen** | **Rapport F** | **Probabilité** |
|---|---|---|---|---|---|
| Préparations | 1 | 390,6 | 390,6 | | |
| Régression | 1 | 66 830,6 | 66 830,6 | 90,5 | 0,000 |
| Non parallélisme | 1 | 34,2 | 34,2 | 0,05 | 0,831 |
| Traitements | 3 | 67 255,5 | | | |
| Erreur résiduelle | 36 | 26 587,3 | 738,54 | | |
| Total | 39 | 93 842,8 | | | |

Après réalisation de l'analyse sans la préparation $U$, il apparaît que les conditions de régression et de parallélisme sont satisfaites. On peut donc calculer l'activité. Les formules de la section 3.2.5 donnent :

– pour la pente commune :

$$b = \frac{20\,(-41,8 - 39,95)}{ln4 \times 10 \times 2} = -58,970$$

– pour ln(rapport d'activité) :

$$M'_T = \frac{567,9 - 580,4}{2 \times (-58,970)} = 0,1060$$

$$C = \frac{66\,830,6}{66\,830,6 - 738,54 \times 2,028^2} = 1,0476$$

$$V = \frac{66\,830,6}{(-58,970)^2 \times 2 \times 10} = 0,9609$$

– et pour ln(limites de confiance) :

$$1,0476 \times 0,1060 \pm \sqrt{0,0476 \times (1,0476 \times 0,1060^2 + 2 \times 0,9609)}$$
$$= 0,1110 \pm 0,3034$$

En prenant l'antilogarithme de ces deux dernières valeurs, nous obtenons un rapport d'activité de 1,11 avec un intervalle de confiance à 95 pour cent de 0,82-1,51.

La multiplication de ce résultat par l'activité présumée de la préparation $T$ donne une activité de 1,11 unités/mg avec un intervalle de confiance à 95 pour cent de 0,82-1,51 unités/mg.

### *5.1.2. ESSAI À 3 DOSES EN CARRÉ LATIN*

*Titrage par diffusion d'un antibiotique sur une plaque rectangulaire*

L'activité assignée de l'étalon est de 4855 UI/mg, et l'activité présumée de la préparation de 5600 UI/mg. Des solutions mères sont préparées en dissolvant 25,2 mg de l'étalon dans 24,5 mL de solvant et 21,4 mg de la préparation à examiner dans 23,95 mL de solvant. Les solutions finales sont obtenues par une première dilution au 1/20 des 2 solutions mères, puis une série de dilutions de raison 1,5.

Un carré latin est généré suivant la méthode décrite dans la section 8.6 (voir tableau 5.1.2.-I). Les réponses obtenues lors de ce titrage de routine sont reportées dans le tableau 5.1.2.-II (zones d'inhibition en mm × 10), et les moyennes par traitement dans le tableau 5.1.2.-III. La représentation graphique des données (voir figure 5.1.2.-I) ne donne pas de raison de douter de la normalité des données ou de l'homogénéité de la variance.

L'application des formules des tableaux 3.2.3.-I et 3.2.3.-II conduit aux résultats suivants :

$P_S$ = 529,667 $L_S$ = 35,833

$P_T$ = 526,333 $L_T$ = 39,333

$H_P = \frac{6}{3} = 2$ $H_L = \frac{72}{24} = 3$

On peut alors poursuivre l'analyse de variance en appliquant les formules des tableaux 3.2.3-III et 3.2.3.-IV. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.1.2.-IV.

L'analyse met en évidence des différences significatives entre les lignes. Cela montre que la fidélité obtenue avec un carré latin est supérieure à celle obtenue avec un essai totalement randomisé. Le caractère hautement significatif de la régression et l'absence d'écarts de parallélisme et de linéarité significatifs des droites de régression confirme que le titrage est approprié au calcul des activités.

5. Textes généraux

Tableau 5.1.2.-I. – *Distribution des traitements sur la plaque*

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | $S_1$ | $T_1$ | $T_2$ | $S_3$ | $S_2$ | $T_3$ |
| 2 | $T_1$ | $T_3$ | $S_1$ | $S_2$ | $T_2$ | $S_3$ |
| 3 | $T_2$ | $S_3$ | $S_2$ | $S_1$ | $T_3$ | $T_1$ |
| 4 | $S_3$ | $S_2$ | $T_3$ | $T_1$ | $S_1$ | $T_2$ |
| 5 | $S_2$ | $T_2$ | $S_3$ | $T_3$ | $T_1$ | $S_1$ |
| 6 | $T_3$ | $S_1$ | $T_1$ | $T_2$ | $S_3$ | $S_2$ |

Tableau 5.1.2.-II. – *Zones d'inhibition mesurées (mm × 10)*

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | moy. ligne |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 161 | 160 | 178 | 187 | 171 | 194 | 175,2 = $R_1$ |
| 2 | 151 | 192 | 150 | 172 | 170 | 192 | 171,2 = $R_2$ |
| 3 | 162 | 195 | 174 | 161 | 193 | 151 | 172,7 = $R_3$ |
| 4 | 194 | 184 | 199 | 160 | 163 | 171 | 178,5 = $R_4$ |
| 5 | 176 | 181 | 201 | 202 | 154 | 151 | 177,5 = $R_5$ |
| 6 | 193 | 166 | 161 | 186 | 198 | 182 | 181,0 = $R_6$ |
| Moy. Col. | 172,8 = $C_1$ | 179,7 = $C_2$ | 177,2 = $C_3$ | 178,0 = $C_4$ | 174,8 = $C_5$ | 173,5 = $C_6$ | |

Tableau 5.1.2.-III. – *Moyennes des traitements*

| | Etalon *S* | | | Préparation *T* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $S_1$ | $S_2$ | $S_3$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ |
| Moyenne | 158,67 | 176,50 | 194,50 | 156,17 | 174,67 | 195,50 |

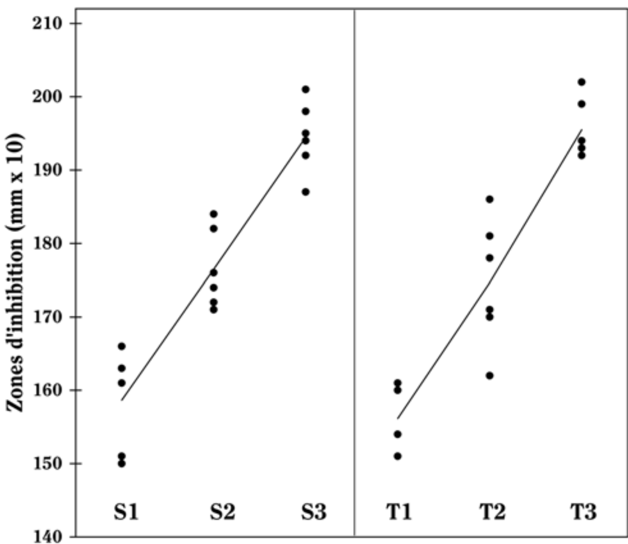



Figure 5.1.2.-I.

Tableau 5.1.2.-IV. – *Analyse de variance*

| Source de variation | Degrés de liberté | Somme des carrés | Carré moyen | Rapport *F* | Probabilité |
|---|---|---|---|---|---|
| Préparations | 1 | 11,1111 | 11,1111 | | |
| Régression | 1 | 8475,0417 | 8475,0417 | 408,1 | 0,000 |
| Non-parallélisme | 1 | 18,3750 | 18,3750 | 0,885 | 0,358 |
| Non-linéarité | 2 | 5,4722 | 2,7361 | 0,132 | 0,877 |
| Traitements | 5 | 8510 | | | |
| Blocs | 5 | 412 | 82,40 | 3,968 | 0,012 |
| Colonnes | 5 | 218,6667 | 43,73 | 2,106 | 0,107 |
| Erreur résiduelle | 20 | 415,3333 | 20,7667 | | |
| Total | 35 | 9556 | | | |

Les formules de la section 3.2.5 donnent :

– pour la pente commune :

$$b = \frac{3 \times (35,833 + 39,333)}{\ln(1,5) \times 6 \times 2} = 46,346$$

– pour ln(rapport d'activité) :

$$M'_T = \frac{526,333 - 529,667}{3 \times 46,346} = -0,023974$$

$$C = \frac{8475,0417}{8475,0417 - 20,7667 \times 2,086^2} = 1,0108$$

$$V = \frac{8475,0417}{46,346^2 \times 3 \times 6} = 0,2192$$

– et pour ln(limites de confiance) :

$$1,0108 \times (-0,0240) \pm \sqrt{0,0108 \times (1,0108 \times (-0,0240)^2 + 2 \times 0,2192)} = -0,02423 \pm 0,06878$$

En prenant l'antilogarithme de ces deux dernières valeurs, nous obtenons un rapport d'activité de 0,976 3 avec un intervalle de confiance à 95 pour cent de 0,9112-1,0456.

L'application d'un facteur de correction de

$$\frac{4855 \times 25,2/24,5}{5600 \times 21,4/23,95} = 0,99799$$

est nécessaire car, au vu de l'activité présumée de la préparation à examiner, les doses utilisées ne sont pas exactement équivalentes. En multipliant l'activité relative par ce facteur de correction et par l'activité présumée de 5600 UI/mg, on obtient une activité estimée de 5456 UI/mg avec un intervalle de confiance à 95 pour cent de 5092-5843 UI/mg.

### *5.1.3. ESSAI À 4 DOSES EN BLOCS COMPLETS*

*Titrage d'un antibiotique par turbidimétrie*

L'objet de ce titrage est l'attribution d'une activité en unités internationales par ampoule. L'activité assignée de l'étalon est de 670 UI/mg, l'activité présumée de la préparation à examiner de 20 000 UI/ampoule. Sur la base de ces données, les solutions mères sont préparées comme suit : on dissout 16,7 mg de l'étalon dans 25 mL de solvant, et le contenu d'une ampoule de la préparation à examiner dans 40 mL de solvant. Les solutions finales sont obtenues par une première dilution au 1/40 des 2 solutions mères, puis une série de dilutions de raison 1,5. Les tubes sont placés dans un bain-marie selon une répartition en blocs complets (voir section 8.5). Les réponses obtenues sont reportées dans le tableau 5.1.3.-I.

L'examen de la figure 5.1.3.-I ne donne pas de raison de douter de la validité des hypothèses de normalité des données et d'homogénéité de la variance. L'écart type de $S_3$ est un peu élevé mais sans qu'il y ait lieu de s'en inquiéter.

Tableau 5.1.3.-I. – *Densité optique des suspensions (× 1000)*

| | **Etalon *S*** | | | | **Préparation *T*** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Bloc | $S_1$ | $S_2$ | $S_3$ | $S_4$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $T_4$ | Moy. |
| 1 | 252 | 207 | 168 | 113 | 242 | 206 | 146 | 115 | 181,1 |
| 2 | 249 | 201 | 187 | 107 | 236 | 197 | 153 | 102 | 179,0 |
| 3 | 247 | 193 | 162 | 111 | 246 | 197 | 148 | 104 | 176,0 |
| 4 | 250 | 207 | 155 | 108 | 231 | 191 | 159 | 106 | 175,9 |
| 5 | 235 | 207 | 140 | 98 | 232 | 186 | 146 | 95 | 167,4 |
| Moy. | 246,6 | 203,0 | 162,4 | 107,4 | 237,4 | 195,4 | 150,4 | 104,4 | |

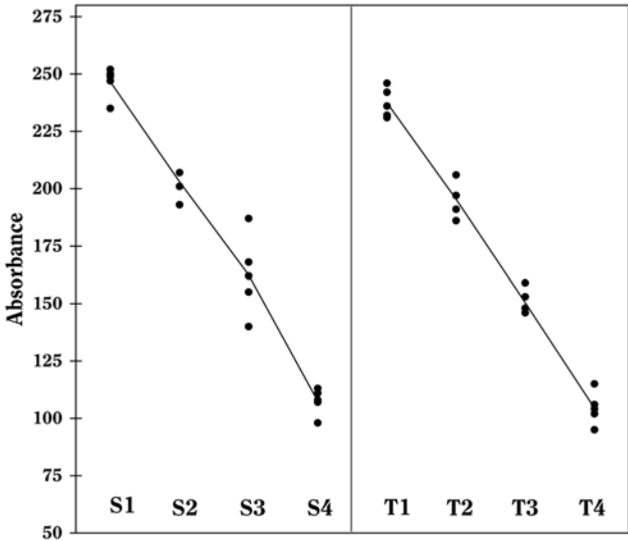



Figure 5.1.3.-I.

L'application des formules des tableaux 3.2.3.-I et 3.2.3.-II conduit aux résultats suivants :

$P_S$ = 719,4 $\quad L_S$ = – 229,1

$P_T$ = 687,6 $\quad L_T$ = – 222

$H_P = \frac{5}{4} = 1{,}25 \quad H_L = \frac{60}{60} = 1$

L'analyse de variance est effectuée à l'aide des formules données dans les tableaux 3.2.3.-III et 3.2.3.-IV. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.1.3.-II.

Tableau 5.1.3.-II. – *Analyse de variance*

| **Source de variation** | **Degrés de liberté** | **Somme des carrés** | **Carré moyen** | **Rapport *F*** | **Probabilité** |
|---|---|---|---|---|---|
| Préparations | 1 | 632,025 | 632,025 | | |
| Régression | 1 | 101 745,6 | 101 745,6 | 1887,1 | 0,000 |
| Non-parallélisme | 1 | 25,205 | 25,205 | 0,467 | 0,500 |
| Non-linéarité | 4 | 259,14 | 64,785 | 1,202 | 0,332 |
| Traitements | 7 | 102 662 | | | |
| Lignes | 4 | 876,75 | 219,188 | 4,065 | 0,010 |
| Erreur résiduelle | 28 | 1509,65 | 53,916 | | |
| Total | 39 | 105 048,4 | | | |

Il existe une différence significative entre les blocs. Ceci montre qu'un essai en blocs complets permet d'obtenir une fidélité supérieure. Le caractère hautement significatif de la régression et l'absence d'écarts de parallélisme et de linéarité significatifs confirment que le titrage permet de calculer les activités. Les formules de la section 3.2.5 donnent :

– pour la pente commune :

$$b = \frac{1 \times (-229,1 - 222)}{\ln(1,5) \times 5 \times 2} = -111,255$$

– pour ln(rapport d'activité) :

$$M'_T = \frac{687,6 - 719,4}{4 \times (-111,255)} = 0,071457$$

$$C = \frac{101\,745,6}{101\,745,6 - 53,916 \times 2,048^2} = 1,00223$$

$$V = \frac{101\,745,6}{(-111,255)^2 \times 4 \times 5} = 0,4110$$

– et pour ln(limites de confiance) :

$$1,00223 \times 0,0715 \pm$$
$$\sqrt{0,00223 \times (1,00223 \times 0,0715^2 + 2 \times 0,4110)}$$
$$= 0,07162 \pm 0,04293$$

En prenant l'antilogarithme de ces deux dernières valeurs, nous obtenons un rapport d'activité de 1,0741 avec un intervalle de confiance à 95 pour cent de 1,0291-1,1214.

L'application d'un facteur de correction de

$$\frac{670 \times 16,7/25}{20\,000 \times 1/40} = 0,89512$$

est nécessaire car, au vu de l'activité présumée de la préparation à examiner, les doses utilisées ne sont pas exactement équivalentes. En multipliant le rapport d'activité par ce facteur de correction et par l'activité présumée de 20 000 UI/mg, on obtient une activité estimée de 19 228 UI/ampoule avec un intervalle de confiance à 95 pour cent de 18 423-20 075 UI/ampoule.

*5.1.4. ESSAI MULTIPLE À 5 DOSES TOTALEMENT RANDOMISÉ*

*Titrage in vitro de 3 vaccins de l'hépatite B par comparaison à un étalon*

Trois séries indépendantes de cinq dilutions au 1/2 sont préparées à partir de chaque vaccin. Après diverses opérations faisant partie de la méthode de titrage, des mesures d'absorbance sont effectuées. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.1.4.-I.

Tableau 5.1.4.-I. – *Densités optiques*

| **Dilution** | **Etalon *S*** | | | **Préparation *T*** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1:16 000 | 0,043 | 0,045 | 0,051 | 0,097 | 0,097 | 0,094 |
| 1:8000 | 0,093 | 0,099 | 0,082 | 0,167 | 0,157 | 0,178 |
| 1:4000 | 0,159 | 0,154 | 0,166 | 0,327 | 0,355 | 0,345 |
| 1:2000 | 0,283 | 0,295 | 0,362 | 0,501 | 0,665 | 0,576 |
| 1:1000 | 0,514 | 0,531 | 0,545 | 1,140 | 1,386 | 1,051 |

| **Dilution** | **Préparation *U*** | | | **Préparation *V*** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1:16 000 | 0,086 | 0,071 | 0,073 | 0,082 | 0,082 | 0,086 |
| 1:8000 | 0,127 | 0,146 | 0,133 | 0,145 | 0,144 | 0,173 |
| 1:4000 | 0,277 | 0,268 | 0,269 | 0,318 | 0,306 | 0,316 |
| 1:2000 | 0,586 | 0,489 | 0,546 | 0,552 | 0,551 | 0,624 |
| 1:1000 | 0,957 | 0,866 | 1,045 | 1,037 | 1,039 | 1,068 |

On sait qu'il existe une relation linéaire entre le logarithme de la densité optique et le logarithme de la dose. Les moyennes des transformées logarithmiques des valeurs de la densité optique sont données dans le tableau 5.1.4.-II. La représentation graphique des données ne met en évidence aucune anomalie.

5. Textes généraux

Tableau 5.1.4.-II. – *Moyennes des transformées logarithmiques de la densité optique*

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $S_1$ | – 3,075 | $T_1$ | – 2,344 | $U_1$ | – 2,572 | $V_1$ | – 2,485 |
| $S_2$ | – 2,396 | $T_2$ | – 1,789 | $U_2$ | – 2,002 | $V_2$ | – 1,874 |
| $S_3$ | – 1,835 | $T_3$ | – 1,073 | $U_3$ | – 1,305 | $V_3$ | – 1,161 |
| $S_4$ | – 1,166 | $T_4$ | – 0,550 | $U_4$ | – 0,618 | $V_4$ | – 0,554 |
| $S_5$ | – 0,635 | $T_5$ | 0,169 | $U_5$ | – 0,048 | $V_5$ | 0,047 |

L'application des formules des tableaux 3.2.3.-I et 3.2.3.-II conduit aux résultats suivants :

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| $P_S$ | = | – 9,108 | $L_S$ | = | 6,109 |
| $P_T$ | = | – 5,586 | $L_T$ | = | 6,264 |
| $P_U$ | = | – 6,544 | $L_U$ | = | 6,431 |
| $P_V$ | = | – 6,027 | $L_V$ | = | 6,384 |
| $H_P$ | = | $\frac{3}{5}=0{,}6$ | $H_L$ | = | $\frac{36}{120}=0{,}3$ |

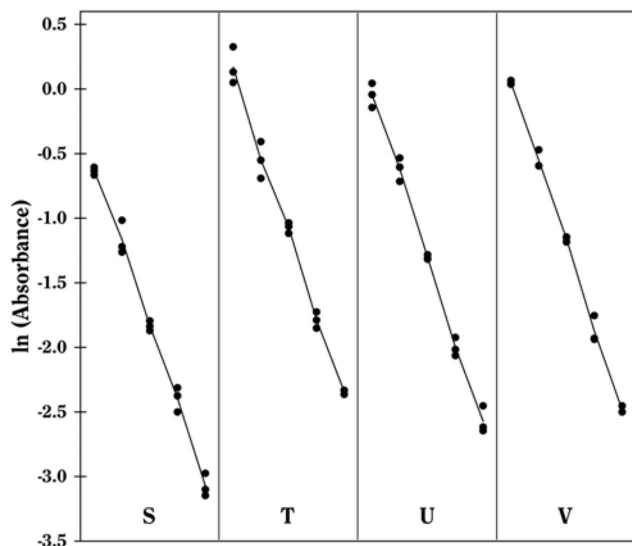



Figure 5.1.4.-I.

L'analyse de variance est réalisée à l'aide des formules des tableaux 3.2.3.-III et 3.2.3.-IV. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.1.4.-III.

Tableau 5.1.4.-III. – *Analyse de variance*

| Source de variation | Degrés de liberté | Somme des carrés | Carré moyen | Rapport *F* | Probabilité |
|---|---|---|---|---|---|
| Préparations | 3 | 4,475 | 1,492 | | |
| Régression | 1 | 47,58 | 47,58 | 7126 | 0,000 |
| Non-parallélisme | 3 | 0,0187 | 0,006 | 0,933 | 0,434 |
| Non-linéarité | 12 | 0,0742 | 0,006 | 0,926 | 0,531 |
| Traitements | 19 | 52,152 | | | |
| Erreur résiduelle | 40 | 0,267 | 0,0067 | | |
| Total | 59 | 52,42 | | | |

Le caractère hautement significatif de la régression et l'absence d'écarts de parallélisme et de linéarité significatifs confirment que le calcul des activités peut être effectué en toute sécurité. Les formules de la section 3.2.5 donnent :

– pour la pente commune :

$$b = \frac{0,3 \times (6,109 + 6,264 + 6,431 + 6,384)}{\ln 2 \times 3 \times 4} = 0,90848$$

– pour ln(rapport d'activité) de la préparation *T* :

$$M'_T = \frac{-5,586 - (-9,108)}{5 \times 0,90848} = 0,7752$$

$$C = \frac{47,58}{47,58 - 0,0067 \times 2,021^2} = 1,00057$$

$$V = \frac{47,58}{0,9085^2 \times 5 \times 3} = 3,8436$$

– et pour ln(limites de confiance) de la préparation *T* :

$$1,00057 \times 0,7752 \pm \sqrt{0,00057 \times (1,00057 \times 0,7752^2 + 2 \times 3,8436)}$$

$$= 0,7756 \pm 0,0689$$

En prenant l'antilogarithme de ces deux dernières valeurs, nous obtenons un rapport d'activité de 2,171 avec un intervalle de confiance à 95 pour cent de 2,027-2,327. Comme toutes les préparations ont une activité (présumée ou assignée) de 20 µg de protéine par millilitre, le calcul donne pour la préparation à examiner *T* une activité de 43,4 µg de protéine par millilitre avec un intervalle de confiance à 95 pour cent de 40,5-46,5 µg de protéine par millilitre.

La même procédure est appliquée pour estimer l'activité des autres préparations à examiner et les intervalles de confiance associés. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.1.4.-IV.

Tableau 5.1.4.-IV. – *Estimations finales de l'activité des vaccins à examiner et limites de confiance à 95 pour cent (en µg de protéine par millilitre)*

| | Limite inférieure | Estimation | Limite supérieure |
|---|---|---|---|
| **Vaccin *T*** | 40,5 | 43,4 | 46,5 |
| **Vaccin *U*** | 32,9 | 35,2 | 37,6 |
| **Vaccin *V*** | 36,8 | 39,4 | 42,2 |

### *5.1.5 DOUBLE ESSAI CROISÉ*

*Titrage de l'insuline par injection sous-cutanée à des lapins*

La préparation étalon est administrée à raison de 1 unité/mL et 2 unités/mL. La préparation à examiner est admi-nistrée à des doses équivalentes, déterminées sur la base de l'activité présumée du produit qui est de 40 unités/mL. Chaque lapin reçoit par voie sous-cutanée 0,5 mL des solutions appropriées, attribuées selon le plan représenté dans le tableau 5.1.5.-I. Les réponses obtenues sont présentées dans le tableau 5.1.5.-II. L'importante variance constatée reflète la variabilité des résultats d'un lapin à l'autre et montre l'utilité d'appliquer un essai croisé.

Tableau 5.1.5.-I. – *Ordre des traitements*

| | Groupe de lapins | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **1** | **2** | **3** | **4** |
| Jour 1 | $S_1$ | $S_2$ | $T_1$ | $T_2$ |
| Jour 2 | $T_2$ | $T_1$ | $S_2$ | $S_1$ |

Tableau 5.1.5.-II. – *Réponse y : somme des valeurs de la glycémie (mg/100 mL) après 1 h et 2h30*

| | Groupe 1 | | Groupe 2 | | Groupe 3 | | Groupe 4 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $S_1$ | $T_2$ | $S_2$ | $T_1$ | $T_1$ | $S_2$ | $T_2$ | $S_1$ |
| | 112 | 104 | 65 | 72 | 105 | 91 | 118 | 144 |
| | 126 | 112 | 116 | 160 | 83 | 67 | 119 | 149 |
| | 62 | 58 | 73 | 72 | 125 | 67 | 42 | 51 |
| | 86 | 63 | 47 | 93 | 56 | 45 | 64 | 107 |
| | 52 | 53 | 88 | 113 | 92 | 84 | 93 | 117 |
| | 110 | 113 | 63 | 71 | 101 | 56 | 73 | 128 |
| | 116 | 91 | 50 | 65 | 66 | 55 | 39 | 87 |
| | 101 | 68 | 55 | 100 | 91 | 68 | 31 | 71 |
| Moy. | 95,6 | 82,8 | 69,6 | 93,3 | 89,9 | 66,6 | 72,4 | 106,8 |

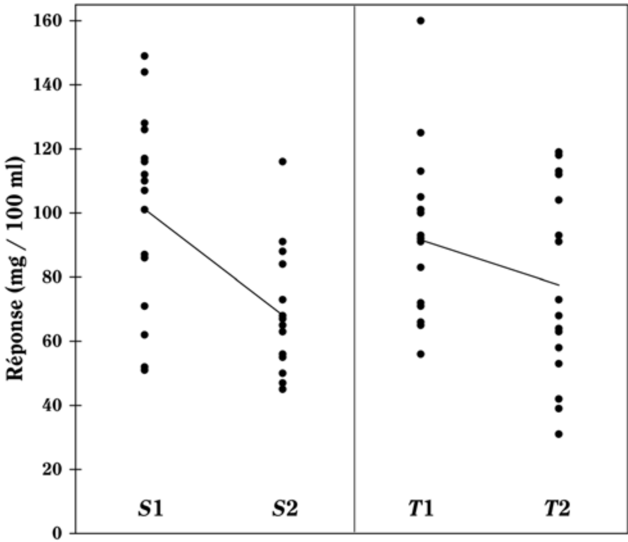



Figure 5.1.5.-I.

L'analyse de variance est plus compliquée ici que pour les autres plans d'essai décrits car, dans la somme des carrés, la composante due au parallélisme n'est pas indépendante de celle due aux différences entre lapins. Pour vérifier le parallélisme des droites de régression, il faut calculer un second terme d'erreur en soustrayant de la composante due aux différences entre lapins la composante de parallélisme et deux composantes d'interaction.

L'analyse de variance met en jeu 3 composantes d'interaction résultant de la répétition des traitements à l'intérieur de chaque groupe :

jours × préparation ; jours × régression ; jours × parallélisme.

Ces termes reflètent la tendance qu'ont les facteurs considérés (préparations, régression et parallélisme) à varier d'un jour à l'autre. Les rapports *F* correspondants permettent de vérifier la validité de l'essai sous cet aspect. Si les valeurs de *F* sont significativement élevées, il convient d'interpréter les résultats du titrage avec circonspection et même, si possible, de le recommencer.

L'analyse de variance est réalisée en appliquant séparément les formules des tableaux 3.2.3.-I à 3.2.3.-III aux 2 jours et à l'ensemble de toutes les données. Les formules des tableaux 3.2.3.-I et 3.2.3.-II donnent :

| | | |
|---|---|---|
| Jour 1 : | $P_S$ = 165,25 | $L_S$ = – 13 |
| | $P_T$ = 162,25 | $L_T$ = – 8,75 |
| | $H_P = \frac{8}{2} = 4$ | $H_L = \frac{96}{6} = 16$ |
| Jour 2 : | $P_S$ = 173,38 | $L_S$ = – 20,06 |
| | $P_T$ = 176,00 | $L_T$ = – 5,25 |
| | $H_P = \frac{8}{2} = 4$ | $H_L = \frac{96}{6} = 16$ |
| Ensemble : | $P_S$ = 169,31 | $L_S$ = – 16,53 |
| | $P_T$ = 169,13 | $L_T$ = – 7,00 |
| | $H_P = \frac{16}{2} = 8$ | $H_L = \frac{192}{6} = 32$ |

et celles du tableau 3.2.3.-III permettent de calculer :

| Jour 1 | | | Jour 2 | | | Ensemble | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $SS_{prep}$ | = | 18,000 | $SS_{prep}$ | = | 13,781 | $SS_{prep}$ | = | 0,141 |
| $SS_{reg}$ | = | 3784,5 | $SS_{reg}$ | = | 5125,8 | $SS_{reg}$ | = | 8859,5 |
| $SS_{par}$ | = | 144,5 | $SS_{par}$ | = | 1755,3 | $SS_{par}$ | = | 1453,5 |

Les termes d'interaction s'obtiennent par l'opération : jour 1 + jour 2 – ensemble :

$$SS_{\text{jours}\times\text{prep}} = 31,64$$
$$SS_{\text{jours}\times\text{reg}} = 50,77$$
$$SS_{\text{jours}\times\text{par}} = 446,27$$

On calcule également la somme des carrés due à la variabilité d'un jour à l'autre :

$$SS_{\text{jours}} = \frac{1}{2}N\left(D_1^2 + D_2^2\right) - K = 478,52$$

et la somme des carrés due aux blocs (variabilité entre lapins) :

$$SS_{\text{bloc}} = 2\sum B_i^2 - K = 39\ 794,7$$

où $B_i$ est la réponse moyenne par lapin.

L'analyse de variance est ensuite poursuivie comme indiqué dans le tableau 5.1.5.-III.

Tableau 5.1.5.-III. – *Analyse de variance*

| Source de variation | Degrés de liberté | Somme des carrés | Carré moyen | Rapport *F* | Probabilité |
|---|---|---|---|---|---|
| Non-parallélisme | 1 | 1453,5 | 1453,5 | 1,064 | 0,311 |
| Jours × Prép. | 1 | 31,6 | 31,6 | 0,023 | 0,880 |
| Jours × Régr. | 1 | 50,8 | 50,8 | 0,037 | 0,849 |
| Erreur rés. inter-lapins | 28 | 38 258,8 | 1366,4 | | |
| Lapins | 31 | 39 794,7 | 1283,7 | | |
| Préparations | 1 | 0,14 | 0,14 | 0,001 | 0,975 |
| Régression | 1 | 8859,5 | 8859,5 | 64,532 | 0,000 |
| Jours | 1 | 478,5 | 478,5 | 3,485 | 0,072 |
| Jours × non-par. | 1 | 446,3 | 446,3 | 3,251 | 0,082 |
| Erreur rés. intra-lapins | 28 | 3844,1 | 137,3 | | |
| Total | 63 | 53 423,2 | | | |

Cette analyse confirme que les conditions de validité sont satisfaites : régression hautement significative, absence d'écart de parallélisme significatif, caractère non significatif des 3 composantes d'interaction.

5. Textes généraux

Les formules de la section 3.2.5 donnent :

– pour la pente commune :

$$b = \frac{32 \times (-16,53 - 7)}{\ln 2 \times 16 \times 2} = -33,95$$

– pour ln(rapport d'activité) :

$$M'_T = \frac{169,13 - 169,31}{2 \times (-33,95)} = 0,00276$$

$$C = \frac{8859,5}{8859,5 - 137,3 \times 2,048^2} = 1,0695$$

$$V = \frac{8859,5}{(-33,95)^2 \times 2 \times 16} = 0,2402$$

– et pour ln(limites de confiance) :

$$1,0695 \times 0,00276 \pm \sqrt{0,0695 \times (1,0695 \times 0,00276^2 + 2 \times 0,2402)}$$
$$= 0,00295 \pm 0,18279$$

En prenant l'antilogarithme de ces deux dernières valeurs, nous obtenons un rapport d'activité de 1,003 avec un intervalle de confiance à 95 pour cent de 0,835-1,204. Ces résultats multipliés par $A_T$ = 40 donnent une activité de 40,1 unités/mL avec un intervalle de confiance à 95 pour cent de 33,4-48,2 unités/mL.



## 5.2. MODÈLE À RAPPORT DE PENTE

### *5.2.1. ESSAI (0,3,3) TOTALEMENT RANDOMISÉ*

*Titrage du facteur VIII*

Un laboratoire effectue un titrage d'activité colorimétrique du factor VIII dans des solutions concentrées. Ce laboratoire ne possède pas d'expérience sur ce type de titrage, mais essaie de le rendre opérationnel. 3 dilutions équivalentes sont préparées pour l'étalon et pour la préparation à examiner. Un blanc est également préparé bien que l'on ne s'attende pas à obtenir une relation dose-réponse linéaire pour les doses faibles. Chaque dilution est examinée avec 8 répétitions, c'est-à-dire un nombre supérieur à celui qui serait utilisé en routine.

La représentation graphique des données montre clairement que la relation dose-réponse n'est effectivement pas linéaire aux doses faibles. Les réponses obtenues pour le blanc ne seront donc pas utilisées dans les calculs (de nouveaux essais sont bien sûr nécessaires pour justifier cette décision). Les formules des tableaux 3.3.3.2.-I et 3.3.3.1.-II donnent :

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| $P_S$ | = | 0,6524 | $P_T$ | = | 0,5651 |
| $L_S$ | = | 1,4693 | $L_T$ | = | 1,2656 |
| $a_S$ | = | 0,318 | $a_T$ | = | 0,318 |
| $b_S$ | = | 0,329 | $b_T$ | = | 0,271 |
| $G_S$ | = | 0,1554 | $G_T$ | = | 0,1156 |
| $J_S$ | = | $4,17 \cdot 10^{-8}$ | $J_T$ | = | $2,84 \cdot 10^{-6}$ |

et

$H_I$ = 0,09524 $a'$ = 0,05298 $K$ = 1,9764

et l'analyse de variance est réalisée à l'aide des formules des tableaux 3.3.3.1.-III et 3.3.3.1.-IV.

Le caractère hautement significatif de la régression et l'absence d'écarts de linéarité et d'intersection significatifs indiquent que l'activité peut être calculée.

Pente de la courbe de l'étalon :

$$b'_S = \frac{6 \times 1,469 - 36 \times 0,0530}{84} = 0,0822$$

Pente de la courbe de la préparation à examiner :

$$b'_T = \frac{6 \times 1,266 - 36 \times 0,0530}{84} = 0,0677$$

L'application de la formule 3.3.5.1.-3 donne :

$$R = \frac{0,0677}{0,0822} = 0,823$$

$$C = \frac{0,0822^2}{0,0822^2 - 3,86 \cdot 10^{-6} \times 2,018^2 \times 0,0357} = 1,000083$$

$$K' = 0,000083 \times 0,75 = 0,000062$$

et les limites de confiance à 95 pour cent sont de :

$$0,823 \pm \sqrt{0,000083 \times 1,678 + 0,000062 \times (-1,646)}$$
$$= 0,823 \pm 0,006$$

Le rapport d'activité estimé est donc de 0,823 avec un intervalle de confiance à 95 pour cent de 0,817-0,829.

Tableau 5.2.1.-I. – *Absorbances*

| | **Blanc** | **Etalon *S* (en UI/mL)** | | | **Préparation *T* (en UI/mL)** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Conc. | *B* | $S_1$ 0,01 | $S_2$ 0,02 | $S_3$ 0,03 | $T_1$ 0,01 | $T_2$ 0,02 | $T_3$ 0,03 |
| | 0,022 | 0,133 | 0,215 | 0,299 | 0,120 | 0,188 | 0,254 |
| | 0,024 | 0,133 | 0,215 | 0,299 | 0,119 | 0,188 | 0,253 |
| | 0,024 | 0,131 | 0,216 | 0,299 | 0,118 | 0,190 | 0,255 |
| | 0,026 | 0,136 | 0,218 | 0,297 | 0,120 | 0,190 | 0,258 |
| | 0,023 | 0,137 | 0,220 | 0,297 | 0,120 | 0,190 | 0,257 |
| | 0,022 | 0,136 | 0,220 | 0,305 | 0,121 | 0,191 | 0,257 |
| | 0,022 | 0,138 | 0,219 | 0,299 | 0,121 | 0,191 | 0,255 |
| | 0,023 | 0,137 | 0,218 | 0,302 | 0,121 | 0,190 | 0,254 |
| Moy. | 0,0235 | 0,1351 | 0,2176 | 0,2996 | 0,1200 | 0,1898 | 0,2554 |

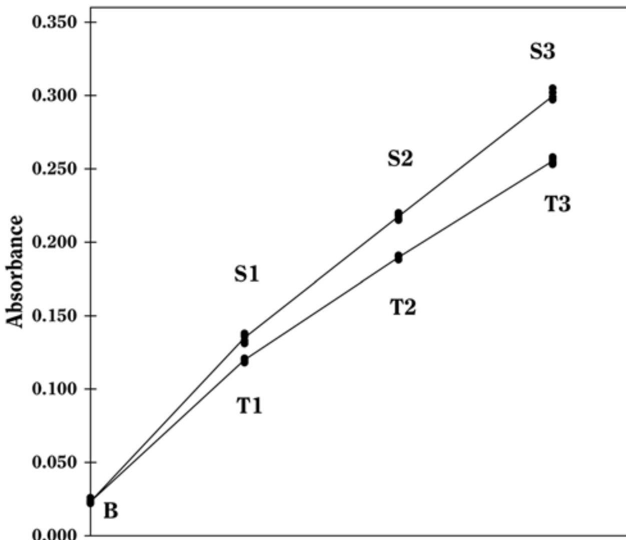



Figure 5.2.1.-I.

Tableau 5.2.1.-II. – *Analyse de variance*

| **Source de variation** | **Degrés de liberté** | **Somme des carrés** | **Carré moyen** | **Rapport *F*** | **Probabilité** |
|---|---|---|---|---|---|
| Régression | 2 | 0,1917 | 0,0958 | 24 850 | 0,000 |
| Intersection | 1 | $3 \cdot 10^{-9}$ | $3 \cdot 10^{-9}$ | $7 \cdot 10^{-4}$ | 0,978 |
| Non-linéarité | 2 | $2 \cdot 10^{-5}$ | $1 \cdot 10^{-5}$ | 2,984 | 0,061 |
| Traitements | 5 | 0,1917 | | | |
| Erreur résiduelle | 42 | $1,62 \cdot 10^{-4}$ | $3,86 \cdot 10^{-6}$ | | |
| Total | 47 | 0,1919 | | | |

*5.2.2. ESSAI (0,4,4,4) TOTALEMENT RANDOMISÉ*
*Titrage in vitro de vaccins de la grippe*

La teneur en antigène hémagglutinine (AH) de 2 vaccins grippaux est déterminée par immunodiffusion radiale simple. Les 2 vaccins ont une activité déclarée de 15 µg d'AH par dose, soit l'équivalent d'une teneur en AH de 30 µg/mL. La teneur en AH assignée à l'étalon est de 39 µg/mL.

L'étalon et les vaccins à titrer sont examinés à 4 concentrations, préparées en double sur la base de leur teneur (assignée ou déclarée) respective. Lorsque l'équilibre entre le réactif interne et le réactif externe est atteint, on mesure la surface de la zone annulaire de précipitation. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.2.2.-I.

La représentation graphique des données ne fait apparaître aucun aspect inhabituel. L'application des formules des tableaux 3.3.3.1.-I et 3.3.3.1.-II donne :

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $P_S$ | = | 108,2 | $P_T$ | = | 103,85 | $P_U$ | = | 85,8 |
| $L_S$ | = | 301,1 | $L_T$ | = | 292,1 | $L_U$ | = | 234,1 |
| $a_S$ | = | 141,0 | $a_T$ | = | 116,7 | $a_U$ | = | 139,8 |
| $b_S$ | = | 61,2 | $b_T$ | = | 64,95 | $b_U$ | = | 39,2 |
| $G_S$ | = | 3114,3 | $G_T$ | = | 2909,4 | $G_U$ | = | 1917,3 |
| $J_S$ | = | 0,223 | $J_T$ | = | 2,227 | $J_U$ | = | 0,083 |
| *et* | | | | | | | | |
| $H_I$ | = | 0,0093 | $a'$ | = | 11,04 | $K$ | = | 14 785,8 |

et l'analyse de variance est réalisée à l'aide des formules des tableaux 3.3.3.1.-III et 3.3.3.1.-IV. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.2.2.-II.

Le caractère hautement significatif de la régression et l'absence d'écarts de linéarité et d'intersection significatifs indiquent que l'activité peut être calculée.

Pente de la courbe de l'étalon :

$$b'_S = \frac{6 \times 301,1 - 60 \times 11,04}{180} = 6,356$$

Pente de la courbe du vaccin $T$ :

$$b'_T = \frac{6 \times 292,1 - 60 \times 11,04}{180} = 6,056$$

Pente de la courbe du vaccin $U$ :

$$b'_U = \frac{6 \times 234,1 - 60 \times 11,04}{180} = 4,123$$

Le rapport d'activité estimé est donc de 6,056/6,356 = 0,953 pour le vaccin $T$ et de 4,123/6,356 = 0,649 pour le vaccin $U$.

$$C = \frac{6,356^2}{6,356^2 - 1,068 \times 2,179^2 \times 0,0444} = 1,0056$$

$$K' = 0,0056 \times 0,625 = 0,0035$$

Les limites de confiance sont données par la formule 3.3.5.1.-4.

Pour le vaccin $T$ :

$$0,955 \pm \sqrt{0,0056 \times 1,913 + 0,0035 \times (-1,913)} = 0,955 \pm 0,063$$

Pour le vaccin $U$ :

$$0,649 \pm \sqrt{0,0056 \times 1,423 + 0,0035 \times (-1,301)} = 0,649 \pm 0,058$$

La teneur en AH, en µg/dose, est calculée en multipliant les rapports d'activité et les limites de confiance par l'activité présumée (15 µg/dose). Les résultats obtenus figurent dans le tableau 5.2.2.-III.

Tableau 5.2.2.-I. – *Surface de précipitation* (mm²)

| Conc. | Etalon *S* | | Préparation *T* | | Préparation *U* | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| (µg/mL) | I | II | I | II | I | II |
| 7,5 | 18,0 | 18,0 | 15,1 | 16,8 | 15,4 | 15,7 |
| 15,0 | 22,8 | 24,5 | 23,1 | 24,2 | 20,2 | 18,6 |
| 22,5 | 30,4 | 30,4 | 28,9 | 27,4 | 24,2 | 23,1 |
| 30,0 | 35,7 | 36,6 | 34,4 | 37,8 | 27,4 | 27,0 |

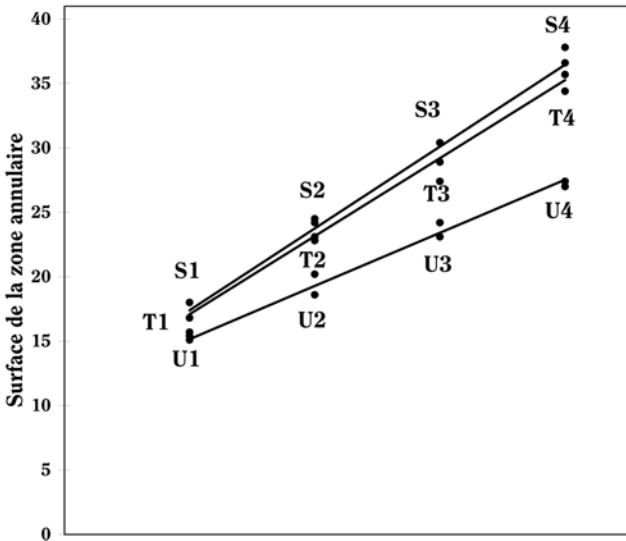



Figure 5.2.2.-I.

Tableau 5.2.2.-II. – *Analyse de variance*

| Source de variation | Degrés de liberté | Somme des carrés | Carré moyen | Rapport *F* | Probabilité |
|---|---|---|---|---|---|
| Régression | 3 | 1087,7 | 362,6 | 339,5 | 0,000 |
| Intersection | 2 | 3,474 | 1,737 | 1,626 | 0,237 |
| Non-linéarité | 6 | 5,066 | 0,844 | 0,791 | 0,594 |
| Traitements | 11 | 1096,2 | | | |
| Erreur résiduelle | 12 | 12,815 | 1,068 | | |
| Total | 23 | 1109,0 | | | |

Tableau 5.2.2.-III. – *Estimations de la teneur en AH* (µg/dose)

| | Limite inférieure | Estimation | Limite supérieure |
|---|---|---|---|
| **Vaccin *T*** | 13,4 | 14,3 | 15,3 |
| **Vaccin *U*** | 8,9 | 9,7 | 10,6 |

## 5.3. RÉPONSES QUALITATIVES

### *5.3.1. TITRAGE D'UNE PRÉPARATION PAR RAPPORT À UN ÉTALON PAR LA MÉTHODE DES PROBITS*

*Titrage in vivo d'un vaccin diphtérique*

Un vaccin diphtérique (activité présumée 140 UI/ampoule) est titré par comparaison à un étalon (activité assignée 132 UI/ampoule). Sur la base de ces activités, on prépare des doses équivalentes de ces préparations, qui sont administrées de façon aléatoire à des groupes de cobayes. Après un délai donné, les animaux sont soumis à une épreuve virulente au moyen de la toxine diphtérique. Les résultats obtenus (nombre d'animaux survivants) sont présentés dans le tableau 5.3.1.-I.

Ces valeurs sont transposées dans le premier tableau de travail, dont on calcule les colonnes suivantes comme décrit dans la section 4.2.1. Le tableau 5.3.1.-II représente le premier cycle de cette procédure de calcul.

5. Textes généraux

La somme des 6 dernières colonnes de ce tableau est ensuite effectuée pour chacune des préparations, et les résultats sont portés dans le second tableau de travail (voir tableau 5.3.1.-III), dont les autres colonnes sont calculées à l'aide des formules 4.2.1.-4 à 4.2.1.-10. La pente commune *b* résultante est de 1,655.

On remplace alors par $a + bx$ les valeurs de *Y* dans le premier tableau de travail, puis on effectue un second cycle de calcul (tableau 5.3.1.-IV).

On procède ainsi par cycles de calcul itératifs jusqu'à obtention d'une différence faible entre 2 cycles consécutifs. Le second tableau de travail se présente alors sous la forme indiquée dans le tableau 5.3.1.-V.

Tableau 5.3.1.-I. – *Données brutes du titrage sur cobayes d'un vaccin diphtérique*

| **Etalon (*S*) Activité assignée 132 UI/ampoule** | | | **Vaccin à examiner (*T*) Activité présumée 140 UI/ampoule** | | |
|---|---|---|---|---|---|
| dose (UI/mL) | soumis à l'épreuve | protégés | dose (UI/mL) | soumis à l'épreuve | protégés |
| 1,0 | 12 | 0 | 1,0 | 11 | 0 |
| 1,6 | 12 | 3 | 1,6 | 12 | 4 |
| 2,5 | 12 | 6 | 2,5 | 11 | 8 |
| 4,0 | 11 | 10 | 4,0 | 11 | 10 |

Un test de linéarité est ensuite effectué comme décrit dans la section 4.2.2. La valeur $\chi^2$ avec 4 degrés de liberté est de 0,851 + 1,070 = 1,921, soit une valeur *p* de 0,750, ce qui n'est pas significatif.

Etant donné l'absence d'écarts de linéarité significatifs, le test de parallélisme peut être effectué comme décrit dans la même section. La valeur $\chi^2$ avec 1 degré de liberté est de :

$$(16,71 + 17,27) - \frac{14,15^2}{5,89} = 0,001$$

soit une valeur *p* de 0,974, ce qui n'est pas significatif.

En opérant comme indiqué dans la section 4.2.3, on obtient alors les estimations suivantes :

– pour ln(rapport d'activité) :

$$M'_T = \frac{-1,721 - (-2,050)}{2,401} = 0,137$$

$$C = \frac{2,401^2 \times 5,893}{2,401^2 \times 5,893 - 1^2 \times 1,960^2} = 1,127$$

$$V = \frac{1}{18,37} + \frac{1}{17,96} = 0,110$$

Tableau 5.3.1.-II. – *Premier tableau de travail, premier cycle de calcul*

| **Vaccin** | **Dose** | ***n*** | ***r*** | ***x*** | ***p*** | ***Y*** | **Φ** | ***Z*** | ***y*** | ***w*** | ***wx*** | ***wy*** | ***wx²*** | ***wy²*** | ***wxy*** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *S* | 1,0 | 12 | 0 | 0,000 | 0,000 | 0 | 0,5 | 0,399 | – 1,253 | 7,64 | 0,00 | – 9,57 | 0,00 | 12,00 | 0,00 |
| | 1,6 | 12 | 3 | 0,470 | 0,250 | 0 | 0,5 | 0,399 | – 0,627 | 7,64 | 3,59 | – 4,79 | 1,69 | 3,00 | – 2,25 |
| | 2,5 | 12 | 6 | 0,916 | 0,500 | 0 | 0,5 | 0,399 | 0,000 | 7,64 | 7,00 | 0,00 | 6,41 | 0,00 | 0,00 |
| | 4,0 | 11 | 10 | 1,386 | 0,909 | 0 | 0,5 | 0,399 | 1,025 | 7,00 | 9,71 | 7,18 | 13,46 | 7,36 | 9,95 |
| *T* | 1,0 | 11 | 0 | 0,000 | 0,000 | 0 | 0,5 | 0,399 | – 1,253 | 7,00 | 0,00 | – 8,78 | 0,00 | 11,00 | 0,00 |
| | 1,6 | 12 | 4 | 0,470 | 0,333 | 0 | 0,5 | 0,399 | – 0,418 | 7,64 | 3,59 | – 3,19 | 1,69 | 1,33 | – 1,50 |
| | 2,5 | 11 | 8 | 0,916 | 0,727 | 0 | 0,5 | 0,399 | 0,570 | 7,00 | 6,42 | 3,99 | 5,88 | 2,27 | 3,66 |
| | 4,0 | 11 | 10 | 1,386 | 0,909 | 0 | 0,5 | 0,399 | 1,025 | 7,00 | 9,71 | 7,18 | 13,46 | 7,36 | 9,95 |

Tableau 5.3.1.-III. – *Second tableau de travail, premier cycle de calcul*

| **Vaccin** | **Σ*w*** | **Σ*wx*** | **Σ*wy*** | **Σ*wx²*** | **Σ*wy²*** | **Σ*wxy*** | $S_{xx}$ | $S_{xy}$ | $S_{yy}$ | $\bar{x}$ | $\bar{y}$ | ***a*** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *S* | 29,92 | 20,30 | – 7,18 | 21,56 | 22,36 | 7,70 | 7,79 | 12,58 | 20,64 | 0,68 | – 0,24 | – 1,36 |
| *T* | 28,65 | 19,72 | – 0,80 | 21,03 | 21,97 | 12,11 | 7,46 | 12,66 | 21,95 | 0,69 | – 0,03 | – 1,17 |

Tableau 5.3.1.-IV. – *Premier tableau de travail, second cycle de calcul*

| **Vaccin** | **Dose** | ***n*** | ***r*** | ***x*** | ***p*** | ***Y*** | **Φ** | ***Z*** | ***y*** | ***w*** | ***wx*** | ***wy*** | ***wx²*** | ***wy²*** | ***wxy*** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *S* | 1,0 | 12 | 0 | 0,000 | 0,000 | – 1,36 | 0,086 | 0,158 | – 1,911 | 3,77 | 0,00 | – 7,21 | 0,00 | 13,79 | 0,00 |
| | 1,6 | 12 | 3 | 0,470 | 0,250 | – 0,58 | 0,279 | 0,336 | – 0,672 | 6,74 | 3,17 | – 4,53 | 1,49 | 3,04 | – 2,13 |
| | 2,5 | 12 | 6 | 0,916 | 0,500 | 0,15 | 0,561 | 0,394 | – 0,001 | 7,57 | 6,94 | – 0,01 | 6,36 | 0,00 | – 0,01 |
| | 4,0 | 11 | 10 | 1,386 | 0,909 | 0,93 | 0,824 | 0,258 | 1,260 | 5,07 | 7,03 | 6,39 | 9,75 | 8,05 | 8,86 |
| *T* | 1,0 | 11 | 0 | 0,000 | 0,000 | – 1,17 | 0,122 | 0,202 | – 1,769 | 4,20 | 0,00 | – 7,43 | 0,00 | 13,14 | 0,00 |
| | 1,6 | 12 | 4 | 0,470 | 0,333 | – 0,39 | 0,349 | 0,370 | – 0,430 | 7,23 | 3,40 | – 3,11 | 1,60 | 1,34 | – 1,46 |
| | 2,5 | 11 | 8 | 0,916 | 0,727 | 0,35 | 0,637 | 0,375 | 0,591 | 6,70 | 6,14 | 3,96 | 5,62 | 2,34 | 3,63 |
| | 4,0 | 11 | 10 | 1,386 | 0,909 | 1,13 | 0,870 | 0,211 | 1,311 | 4,35 | 6,03 | 5,70 | 8,36 | 7,48 | 7,90 |

Tableau 5.3.1.-V. – *Second tableau de travail, dernier cycle de calcul*

| **Vaccin** | **Σ*w*** | **Σ*wx*** | **Σ*wy*** | **Σ*wx²*** | **Σ*wy²*** | **Σ*wxy*** | $S_{xx}$ | $S_{xy}$ | $S_{yy}$ | $\bar{x}$ | $\bar{y}$ | ***a*** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *S* | 18,37 | 14,80 | – 2,14 | 14,85 | 17,81 | 5,28 | 2,93 | 7,00 | 17,56 | 0,81 | – 0,12 | – 2,05 |
| *T* | 17,96 | 12,64 | – 0,55 | 11,86 | 18,35 | 6,76 | 2,96 | 7,15 | 18,34 | 0,70 | – 0,03 | – 1,72 |

– et pour ln(limites de confiance) :

$$0,155 - 0,013 \pm \sqrt{0,127\,(0,649 + 1,127 \times 0,036^2)}$$
$$= 0,142 \pm 0,288$$

L'activité et les limites de confiance peuvent alors être obtenues en multipliant les antilogarithmes par l'activité présumée (140 UI/ampoule). L'estimation ainsi obtenue est de 160,6 UI/ampoule avec un intervalle de confiance à 95 pour cent de 121,0-215,2 UI/ampoule.

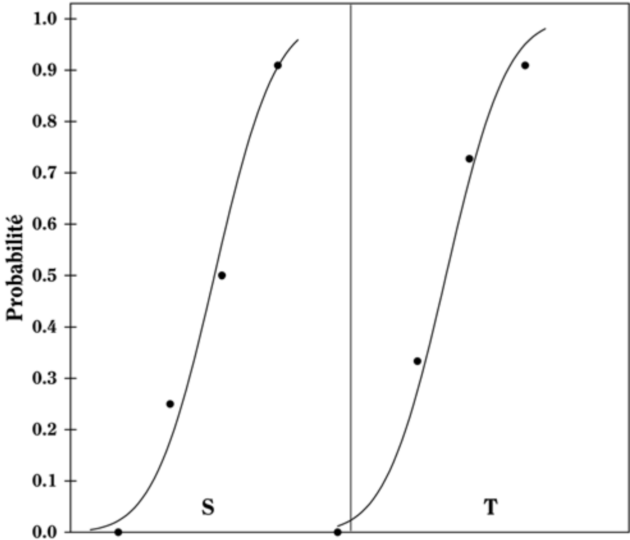



Figure 5.3.1.-I.

*5.3.2. TITRAGE D'UNE PRÉPARATION PAR RAPPORT À UN ÉTALON PAR LA MÉTHODE DES LOGITS ET D'AUTRES TYPES DE MÉTHODES*

Les résultats ci-après sont ceux qui seraient obtenus si les données de la section 5.3.1 étaient traitées par la méthode des logits et par d'autres méthodes « classiques » de la même famille. Cet exemple est à considérer comme un exercice d'illustration, et non comme une alternative à la méthode des probits dans le cas particulier traité. Il n'est en effet admis d'utiliser une autre fonction que sur la base de justifications expérimentales ou théoriques.

Tableau 5.3.2.-I. – *Résultats obtenus avec différentes fonctions d'analyse*

| | **Logit** | **Gompit** | **Angle**(*) |
|---|---|---|---|
| $\Phi$ | $\frac{1}{1+e^{-Y}}$ | $1-e^{-e^{Y}}$ | $\frac{1}{2}\sin Y + \frac{1}{2}$ |
| Z | $\frac{e^{-Y}}{(1+e^{-Y})^2}$ | $e^{Y-e^{Y}}$ | $\frac{1}{2}\cos Y$ |
| Pente *b* | 4,101 | 2,590 | 1,717 |
| $\chi^2$ lin. | 2,15 | 3,56 | 1,50 |
| $\chi^2$ par. | 0,0066 | 0,168 | 0,0010 |
| Activité | 162,9 | 158,3 | 155,8 |
| Limite inf. | 121,1 | 118,7 | 122,6 |
| Limite sup. | 221,1 | 213,3 | 200,7 |

(*) $\begin{cases} \text{Si } Y < -\frac{1}{2}\pi \text{ alors } \Phi = 0 \text{ et } Z = 0 \\ \text{Si } Y > \frac{1}{2}\pi \text{ alors } \Phi = 1 \text{ et } Z = 0 \end{cases}$

*5.3.3. DÉTERMINATION DE LA $DE_{50}$ D'UNE SUBSTANCE PAR LA MÉTHODE DES PROBITS*

*Titrage in vitro d'un vaccin poliomyélitique oral*

Le titrage d'un vaccin poliomyélitique oral est effectué par détermination de la $DE_{50}$ sur plaques ELISA avec 10 dilutions différentes et 8 répétitions de 50 µL. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.3.3.-I.

Tableau 5.3.3.-I. – *Dilutions ($10^x$ µL du vaccin non dilué)*

| – 3,5 | – 4,0 | – 4,5 | – 5,0 | – 5,5 | – 6,0 | – 6,5 | – 7,0 | – 7,5 | – 8,0 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| + | + | + | + | – | – | – | – | – | – |
| + | + | + | + | – | – | – | – | – | – |
| + | + | – | – | – | – | – | – | – | – |
| + | + | + | + | – | – | – | – | – | – |
| + | + | + | – | – | – | – | – | – | – |
| + | + | + | + | + | – | – | – | – | – |
| + | + | + | + | + | – | + | – | – | – |
| + | + | + | + | – | + | – | – | – | – |

Ces valeurs sont transposées dans le premier tableau de travail, dont on calcule les colonnes suivantes comme décrit dans la section 4.2.1. Le tableau 5.3.3.-II représente le premier cycle de cette procédure de calcul.

La somme des 6 dernières colonnes de ce tableau est ensuite effectuée, et les résultats sont portés dans le second tableau de travail (voir tableau 5.3.3.-III), dont les autres colonnes sont calculées à l'aide des formules 4.2.1.-4 à 4.2.1.-10. la pente commune *b* résultante est de – 0,295.

On remplace alors par *a* + *bx* les valeurs de *Y* dans le premier tableau de travail, puis on effectue un second cycle de calcul. On procède ainsi par cycles de calcul itératifs jusqu'à obtention d'une différence faible entre 2 cycles consécutifs. Le second tableau de travail se présente alors sous la forme indiquée dans le tableau 5.3.3.-IV.

Un test de linéarité est ensuite effectué comme décrit dans la section 4.2.2. La valeur $\chi^2$ avec 8 degrés de liberté est de 2,711, soit une valeur *p* de 0,951, ce qui n'est pas significatif.

En opérant comme indiqué dans la section 4.5, on obtient alors les estimations suivantes :

– pour ln(rapport d'activité) :

$$M'_T = \frac{-(-7,931)}{-0,646} = -12,273$$

$$C = \frac{(-0,646)^2 \times 55,883}{(-0,646)^2 \times 55,883 - 1^2 \times 1,960^2} = 1,197$$

$$V = \frac{1}{19,39} = 0,052$$

– et pour ln(limites de confiance) :

$$-14,692 - (-2,420) \pm \sqrt{0,197 \times (2,882 + 1,197 \times 0,009^2)}$$
$$= -12,272 \pm 0,754$$

Cette estimation est encore exprimée en termes ln(dilutions). Pour convertir cette expression en $\ln(DE_{50})$/mL, il faut effectuer la transformation $-M'_T + \ln\left(\frac{1000}{50}\right)$.

Par ailleurs, comme l'activité de ce type de vaccin est généralement exprimée en termes $\log_{10}(DE_{50})$/mL, il faut diviser les résultats par ln(10). L'activité estimée ainsi obtenue est égale à 6,63 $\log_{10}(DE_{50})$/mL, avec un intervalle de confiance à 95 pour cent de 6,30-6,96 $\log_{10}(DE_{50})$/mL.

Tableau 5.3.3.-II. – *Premier tableau de travail, premier cycle de calcul*

| Vaccin | Dose | *n* | *r* | *x* | *p* | *Y* | *Φ* | *Z* | *y* | *w* | *wx* | *wy* | $wx^2$ | $wy^2$ | *wxy* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *T* | $10^{-3,5}$ | 8 | 0 | – 8,06 | 0,000 | 0,00 | 0,5 | 0,399 | – 1,253 | 5,09 | – 41,04 | – 6,38 | 330,8 | 8,00 | 51,4 |
| | $10^{-4,0}$ | 8 | 0 | – 9,21 | 0,000 | 0,00 | 0,5 | 0,399 | – 1,253 | 5,09 | – 46,91 | – 6,38 | 432,0 | 8,00 | 58,8 |
| | $10^{-4,5}$ | 8 | 1 | – 10,36 | 0,125 | 0,00 | 0,5 | 0,399 | – 0,940 | 5,09 | – 52,77 | – 4,79 | 546,8 | 4,50 | 49,6 |
| | $10^{-5,0}$ | 8 | 2 | – 11,51 | 0,250 | 0,00 | 0,5 | 0,399 | – 0,627 | 5,09 | – 58,63 | – 3,19 | 675,1 | 2,00 | 36,7 |
| | $10^{-5,5}$ | 8 | 6 | – 12,66 | 0,750 | 0,00 | 0,5 | 0,399 | 0,627 | 5,09 | – 64,50 | 3,19 | 816,8 | 2,00 | – 40,4 |
| | $10^{-6,0}$ | 8 | 7 | – 13,82 | 0,875 | 0,00 | 0,5 | 0,399 | 0,940 | 5,09 | – 70,36 | 4,79 | 972,1 | 4,50 | – 66,1 |
| | $10^{-6,5}$ | 8 | 7 | – 14,97 | 0,875 | 0,00 | 0,5 | 0,399 | 0,940 | 5,09 | – 76,23 | 4,79 | 1140,8 | 4,50 | – 71,7 |
| | $10^{-7,0}$ | 8 | 8 | – 16,12 | 1,000 | 0,00 | 0,5 | 0,399 | 1,253 | 5,09 | – 82,09 | 6,38 | 1323,1 | 8,00 | – 102,9 |
| | $10^{-7,5}$ | 8 | 8 | – 17,27 | 1,000 | 0,00 | 0,5 | 0,399 | 1,253 | 5,09 | – 87,95 | 6,38 | 1518,9 | 8,00 | – 110,2 |
| | $10^{-8,0}$ | 8 | 8 | – 18,42 | 1,000 | 0,00 | 0,5 | 0,399 | 1,253 | 5,09 | – 93,82 | 6,38 | 1728,2 | 8,00 | – 117,6 |

Tableau 5.3.3.-III. – *Second tableau de travail, premier cycle de calcul*

| Vaccin | Σ*w* | Σ*wx* | Σ*wy* | Σ$wx^2$ | Σ$wy^2$ | Σ*wxy* | $S_{xx}$ | $S_{xy}$ | $S_{yy}$ | $\bar{x}$ | $\bar{y}$ | *a* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *T* | 50,93 | – 674,3 | 11,17 | 9484,6 | 57,50 | – 312,32 | 556,92 | – 164,43 | 55,05 | – 13,24 | 0,219 | – 3,690 |

Tableau 5.3.3.-IV. – *Second tableau de travail, dernier cycle de calcul*

| Vaccin | Σ*w* | Σ*wx* | Σ*wy* | Σ$wx^2$ | Σ$wy^2$ | Σ*wxy* | $S_{xx}$ | $S_{xy}$ | $S_{yy}$ | $\bar{x}$ | $\bar{y}$ | *a* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *T* | 19,39 | – 238,2 | 0,11 | 2981,1 | 26,05 | – 37,45 | 55,88 | – 36,11 | 26,05 | – 12,28 | 0,006 | – 7,931 |

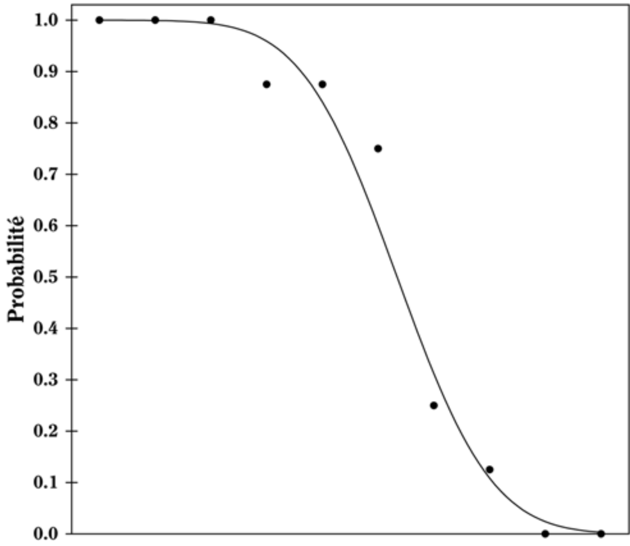



Figure 5.3.3.-I.

## 5.4. COURBES DOSE-RÉPONSE SIGMOÏDES ÉTENDUES

### *5.4.1. ANALYSE D'UNE COURBE LOGISTIQUE À 4 PARAMÈTRES*

*Titrage sérologique d'immunosérums tétaniques*

Comme indiqué précédemment dans la section 3.4, cet exemple a pour objet d'illustrer un mode d'analyse « possible » des données présentées, sans avoir vocation à représenter nécessairement le mode d'analyse « unique » ou « optimal ». Beaucoup d'autres approches sont décrites dans la littérature, mais elles ne devraient normalement pas conduire, dans la plupart des cas, à des résultats très différents. On trouvera dans la section 7.5 une brève discussion de ces approches alternatives ainsi que d'autres considérations statistiques.

Un immunosérum de cobaye est dosé par comparaison à un immunosérum de référence (0,4 UI/mL) par une technique d'immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA). 10 dilutions au 1/2 de chaque préparation sont déposées sur une plaque ELISA à 96 puits. Chaque dilution est déposée en double. Les réponses observées sont reportées dans le tableau 5.4.1.-I.

Tableau 5.4.1.-I. – *Réponses observées*

| Préparation de référence *S* | | | Préparation à examiner *T* | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Dil. | Obs. 1 | Obs. 2 | Dil. | Obs. 1 | Obs. 2 |
| 1/10 | 2,912 | 2,917 | 1/10 | 3,017 | 2,987 |
| 1/20 | 2,579 | 2,654 | 1/20 | 2,801 | 2,808 |
| 1/40 | 2,130 | 2,212 | 1/40 | 2,401 | 2,450 |
| 1/80 | 1,651 | 1,638 | 1/80 | 1,918 | 1,963 |
| 1/160 | 1,073 | 0,973 | 1/160 | 1,364 | 1,299 |
| 1/320 | 0,585 | 0,666 | 1/320 | 0,861 | 0,854 |
| 1/640 | 0,463 | 0,356 | 1/640 | 0,497 | 0,496 |
| 1/1280 | 0,266 | 0,234 | 1/1280 | 0,340 | 0,344 |
| 1/2560 | 0,228 | 0,197 | 1/2560 | 0,242 | 0,217 |
| 1/5120 | 0,176 | 0,215 | 1/5120 | 0,178 | 0,125 |

Pour traiter cet exemple, il sera supposé que le laboratoire a validé les conditions 1 à 3 spécifiées dans la section 3.1.1, lorsque le dosage a été développé pour les analyses de routine. En outre, le laboratoire a également validé la condition d'égalité de la limite supérieure et de la limite inférieure.

Une représentation graphique ne fait pas apparaître de particularité inhabituelle. On procède à l'ajustement des paramètres de la fonction logistique par la méthode des moindres carrés, au moyen d'un programme informatique approprié, en supposant que les termes de l'erreur résiduelle sont des variables aléatoires normales indépendantes et identiquement distribuées. Dans le cas considéré, 3 paramètres (α, β et δ) sont nécessaires pour décrire le facteur de pente commun et les asymptotes inférieure et supérieure communes, plus 2 paramètres supplémentaires ($\gamma_S$ et $\gamma_T$) pour décrire la position horizontale des 2 courbes. Le programme fournit les estimations suivantes pour ces différents paramètres :

$$\alpha = 3,196 \qquad \gamma_S = -4,307$$

$$\beta = 1,125 \qquad \gamma_T = -4,684$$

$$\delta = 0,145$$

De plus, il fournit pour la variance résiduelle $s^2$ une estimation de 0,001429 avec 20 degrés de liberté (variation intra-traitements).

Pour obtenir les limites de confiance, et vérifier le parallélisme et la linéarité, on linéarise les réponses *u* observées avant de les soumettre à une analyse en lignes parallèles pondérée au moyen du programme. Cette procédure est très semblable à celle décrite dans la section 4.2 pour la méthode des probits, avec les modifications suivantes :

$$Y = \beta(x - \gamma) \qquad y = Y + \frac{\left(\frac{u-\delta}{\alpha-\delta}\right) - \Phi}{Z}$$

$$\Phi = \frac{1}{1+e^{-Y}} \qquad w = \frac{Z^2(\alpha-\delta)^2}{s^2}$$

$$Z = \frac{e^{-Y}}{(1+e^{-Y})^2}$$

On obtient ainsi une analyse de variance pondérée des réponses transformées *y* avec les pondérations *w* :

Tableau 5.4.1.-II. — *Analyse de variance pondérée*

| Source de variation | Degrés de liberté | Chi carré | Probabilité |
|---|---|---|---|
| Préparations | 1 | 0,529653 | 0,467 |
| Régression | 1 | 6599,51 | 0,000 |
| Non-parallélisme | 1 | 0,0458738 | 0,830 |
| Non-linéarité | 16 | 8,89337 | 0,918 |
| Traitements | 19 | 6608,98 | 0,000 |
| Erreur résiduelle | 20 | 20,0000 | |
| Total | 39 | 6628,98 | |

On ne constate pas d'écarts significatifs de parallélisme et de linéarité ; la méthode de dosage est donc satisfaisante pour les calculs d'activité. Si la condition d'égalité des asymptotes supérieure et inférieure n'est pas satisfaite, il est probable que soient observés des écarts significatifs de linéarité et/ou de parallélisme, car les tests de linéarité et de parallélisme reflètent l'étroitesse de l'ajustement du modèle à 4 paramètres dans son intégralité. L'erreur résiduelle dans l'analyse de variance est toujours égale à 1 par suite de la transformation. Il est toutefois possible de calculer un facteur d'hétérogénéité (analogue à celui utilisé dans la méthode des probits).

L'activité relative de la préparation à examiner peut être obtenue par calcul de l'antilogarithme de $\gamma_S - \gamma_T$. En multipliant cette valeur par l'activité assignée de la préparation de référence, on obtient une activité estimée de 1,459 × 0,4 = 0,584 UI/mL. La formule 4.2.3.-2 donne, pour les limites de confiance à 95 pour cent, les valeurs 0,557 UI/mL et 0,612 UI/mL.

# 6. COMBINAISON DES RÉSULTATS DE TITRAGES

## 6.1. INTRODUCTION

Pour satisfaire aux exigences de la Pharmacopée Européenne, il est souvent nécessaire de réaliser plusieurs titrages indépendants et de combiner leurs résultats. La question se pose alors de savoir s'il est admissible de combiner les résultats de ces titrages et, si oui, de quelle manière.

2 titrages peuvent être considérés comme indépendants lorsque l'exécution de l'un d'entre eux n'affecte en rien la probabilité associée aux résultats de l'autre. Ceci implique que l'ensemble des erreurs aléatoires attachées aux principaux facteurs d'influence de l'un des titrages (par exemple : dilutions de l'étalon et de la préparation à examiner, sensibilité de l'indicateur biologique) doivent être indépendantes des erreurs aléatoires correspondantes de l'autre titrage. Des essais effectués sur plusieurs jours consécutifs au moyen de dilutions de l'étalon préparées au même moment ne sont donc pas indépendants.

Il existe différentes méthodes pour combiner les résultats de titrages indépendants, la plus acceptable d'un point de vue théorique étant aussi la plus difficile à appliquer. 3 méthodes approchées simples sont décrites ci-après, mais d'autres peuvent être utilisées si les conditions nécessaires sont remplies.

Avant de combiner les activités obtenues à partir des titrages fondés sur le modèle en lignes parallèles ou celui des probits, il convient de les exprimer en logarithmes ; par contre, les activités obtenues à partir de titrages fondés sur le modèle en rapport de pente sont utilisées telles quelles. Comme les 2 premiers modèles sont d'emploi plus courant que celui à rapport de pente, c'est le symbole *M* représentant le logarithme de l'activité qui est utilisé dans les formules de cette section. En lisant *R* (rapport de pente) au lieu de *M*, l'expérimentateur pourra appliquer les mêmes formules pour calculer les résultats des titrages fondés sur le modèle en rapport de pente. Avant d'être combinées, toutes les estimations de l'activité doivent être corrigées de l'activité attribuée à chaque préparation à examiner.

## 6.2. COMBINAISON PONDÉRÉE DES RÉSULTATS

Cette méthode peut être utilisée si les conditions suivantes sont remplies :

1) les estimations de l'activité résultent de titrages indépendants,

2) pour chaque titrage, *C* est voisin de 1 (disons inférieur à 1,1)

3) le nombre de degrés de liberté des erreurs résiduelles individuelles est supérieur ou égal à 6 et de préférence supérieur à 15,

4) les estimations individuelles de l'activité forment une série homogène (voir section 6.2.2).

Si ces conditions ne sont pas satisfaites, cette méthode ne peut pas être appliquée. La méthode décrite dans la section 6.3 peut alors être utilisée pour obtenir la meilleure estimation de l'activité moyenne, pouvant être adoptée dans des dosages ultérieurs comme activité présumée.

### *6.2.1. CALCUL DES FACTEURS DE PONDÉRATION*

Il est présumé que les résultats de chacun des $n'$ titrages ont été analysés pour donner $n'$ valeurs de *M* avec les limites de confiance associées. Pour chaque titrage, l'intervalle de confiance logarithmique *L* est obtenu en soustrayant la limite inférieure de la limite supérieure. Un facteur de pondération *W* est calculé pour chaque valeur de *M* à l'aide de la formule 6.2.1.-1, où *t* prend la même valeur que celle utilisée dans le calcul des limites de confiance.

$$W = \frac{4t^2}{L^2} \qquad (6.2.1.\text{-}1)$$

### *6.2.2. HOMOGÉNÉITÉ DES ESTIMATIONS DE L'ACTIVITÉ*

En élevant au carré l'écart de chaque valeur de *M* par rapport à la moyenne pondérée, puis en multipliant chacun de ces écarts par le facteur de pondération approprié et en effectuant leur somme sur l'ensemble des titrages, on obtient une variable statistique dont la distribution suit approximativement une loi de $\chi^2$ (voir table 8.3) et qui peut être utilisée pour vérifier l'homogénéité d'une série d'estimations du logarithme de l'activité :

$$\chi^2 \approx \sum_{n'} W\left(M - \overline{M}\right)^2 \quad \text{où} \quad \overline{M} = \frac{\sum WM}{\sum W} \qquad (6.2.2.\text{-}1)$$

Si la valeur $\chi^2$ ainsi calculée est inférieure à la valeur de la table qui correspond à $(n' - 1)$ degrés de liberté, les activités sont homogènes et les valeurs obtenues dans la section 6.2.3 pour l'activité moyenne et les limites associées seront pertinentes.

Si la valeur $\chi^2$ calculée est supérieure à la valeur de la table, les activités sont hétérogènes. Ceci signifie que les variations entre estimations individuelles de *M* sont supérieures à ce que laisseraient prévoir les estimations des limites de confiance, c'est-à-dire qu'il existe une variabilité significative entre les

5. Textes généraux

titrages. Dans ces conditions, la condition 4 n'est pas satisfaite et les équations de la section 6.2.3 ne sont donc plus applicables, mais elles peuvent être remplacées par celles de la section 6.2.4.

*6.2.3. CALCUL DE LA MOYENNE PONDÉRÉE ET DES LIMITES DE CONFIANCE*

Les produits *WM* sont formés pour chaque titrage et leur somme est divisée par la somme des facteurs de pondération de tous les titrages, pour donner la moyenne logarithmique pondérée de l'activité.

$$\overline{M} = \frac{\sum WM}{\sum W} \qquad (6.2.3.\text{-}1)$$

L'erreur type sur ln(activité moyenne) est la racine carrée de l'inverse de la somme des facteurs de pondération :

$$s_{\overline{M}} = \sqrt{\frac{1}{\sum W}} \qquad (6.2.3.\text{-}2)$$

et les limites de confiance approximatives sont obtenues en prenant l'antilogarithme de la valeur donnée par l'expression :

$$\overline{M} \pm t \times s_{\overline{M}} \qquad (6.2.3.\text{-}3)$$

où le nombre de degrés de liberté associé à *t* est égal à la somme du nombre de degrés de liberté pour les carrés moyens de l'erreur dans les titrages individuels.

*6.2.4. CALCUL DE LA MOYENNE PONDÉRÉE ET DES LIMITES DE CONFIANCE SUR LA BASE DES VARIATIONS INTRA- ET INTER-TITRAGES*

Lorsque les résultats de plusieurs titrages répétés sont combinés, la valeur $\chi^2$ peut être significative. On considère alors que la variabilité observée comporte deux composantes :

– la variabilité intra-titrage $s_M^2 = 1/W$,

– la variabilité inter-titrages $s_{\overline{M}}^2 = \frac{\sum (M - \overline{M})^2}{n'(n'-1)}$

où $\overline{M}$ est la moyenne non pondérée. La première varie d'un titrage à l'autre tandis que la seconde est commune à toutes les valeurs *M*.

On calcule alors pour chaque valeur *M* un facteur de pondération :

$$W' = \frac{1}{s_M^2 + s_{\overline{M}}^2}$$

qui remplace *W* dans la section 6.2.3, où *t* prend approximativement la valeur 2.

6.3. COMBINAISON NON PONDÉRÉE DES RÉSULTATS

Pour combiner de la façon la plus simple les $n'$ estimations de *M* obtenues à partir des $n'$ dosages, on détermine leur moyenne puis on calcule une estimation de l'écart type associé d'après la formule :

$$s_{\overline{M}}^2 = \frac{\sum (M - \overline{M})^2}{n'(n'-1)} \qquad (6.3.\text{-}1)$$

Les limites de confiance sont alors données par

$$\overline{M} \pm t s_{\overline{M}} \qquad (6.3.\text{-}2)$$

où *t* possède $(n' - 1)$ degrés de liberté. Le nombre $n'$ d'estimations de *M* étant généralement petit, la valeur de *t* est relativement élevée.

6.4. EXEMPLE D'ACTIVITÉ MOYENNE PONDÉRÉE ET DE LIMITES DE CONFIANCE ASSOCIÉES

Dans le tableau 6.4.-I figurent 6 estimations indépendantes de l'activité de la même préparation, avec les limites de confiance à 95 pour cent et les nombres de degrés de liberté correspondants. Les conditions 1, 2 et 3 de la section 6.2. sont satisfaites. Les valeurs ln(activité) et les facteurs de pondération sont calculés comme décrit dans la section 6.2.

Tableau 6.4.-I. – *Estimations de l 'activité et intervalles de confiance pour 6 titrages indépendants*

| **Estimat. activité (UI/amp.)** | **Limite inférieure (UI/amp.)** | **Limite supérieure (UI/amp.)** | **Degrés de liberté** | **ln activité *M*** | **Pondé-ration *W*** |
|---|---|---|---|---|---|
| 18 367 | 17 755 | 19 002 | 20 | 9,8183 | 3777,7 |
| 18 003 | 17 415 | 18 610 | 20 | 9,7983 | 3951,5 |
| 18 064 | 17 319 | 18 838 | 20 | 9,8017 | 2462,5 |
| 17 832 | 17 253 | 18 429 | 20 | 9,7887 | 4003,0 |
| 18 635 | 17 959 | 19 339 | 20 | 9,8328 | 3175,6 |
| 18 269 | 17 722 | 18 834 | 20 | 9,8130 | 4699,5 |

L'homogénéité des estimations de l'activité est évaluée au moyen de la formule 6.2.2.-1, qui donne une valeur $\chi^2$ de 4,42 avec 5 degrés de liberté. Ce résultat n'étant pas significatif ($p$ = 0,49), l'ensemble des conditions sont satisfaites.

Le calcul de l'activité moyenne pondérée par la formule 6.2.3.-1 donne une valeur de 9,8085.

La formule 6.2.3.-2 donne un écart type de 0,00673 et les limites de confiance à 95 pour cent approximatives calculées par la formule 6.2.3.-3, où *t* possède 120 degrés de liberté, sont de 9,7951 et 9,8218.

En prenant l'antilogarithme de ces valeurs, on obtient une activité de 18 187 UI/ampoule avec un intervalle de confiance à 95 pour cent de 17 946-18 431 UI/ampoule.

## 7. POUR ALLER PLUS LOIN...

Il est impossible de présenter un exposé complet des méthodes statistiques dans un texte de pharmacopée, mais les méthodes décrites précédemment devraient normalement suffire pour la plupart des essais de pharmacopée. L'objectif de la présente section est d'essayer d'apporter une vision plus globale sur les méthodes alternatives ou plus générales qui ont été développées. Le lecteur qui y trouvera un intérêt est invité à approfondir le sujet en explorant la littérature existante. En tout état de cause, l'application de méthodes statistiques plus spécialisées devrait être laissée à des personnes qualifiées.

7.1. MODÈLES LINÉAIRES GÉNÉRAUX

Les méthodes décrites dans la présente annexe peuvent, globalement, être décrites comme des modèles linéaires généraux (ou « généralisés » pour inclure les méthodes des probits et des logits). Le principe général consiste à définir une matrice de structure linéaire *X* (ou matrice de planification) dont chaque ligne représente une observation et chaque colonne un effet linéaire (préparation, bloc, colonne, dose). Par exemple : l'essai en carré latin de l'exemple 5.1.2 pourrait être représenté par une matrice à 36 lignes et 13 colonnes : une colonne pour chaque préparation, une colonne pour les doses, cinq colonnes pour les blocs à l'exception du premier et cinq colonnes pour les lignes à l'exception de la première. Toutes les colonnes sauf celle des doses contiennent la valeur 0 ou 1 selon que l'observation se rapporte ou non à l'effet considéré. Un vecteur *Y* est construit avec les observations (transformées). Les effets sont estimés au moyen de la formule $(X'X)^{-1}X'Y$, et il est facile d'en déduire l'estimation de l'activité *m* en faisant le rapport des effets considérés. L'intervalle de confiance est calculé par le théorème de Fieller :

$$m_L, m_U = \frac{\left[ m - \frac{g v_{12}}{v_{22}} \pm \frac{ts}{b} \sqrt{v_{11} - 2 m v_{12} + m^2 v_{22} - g \left( v_{11} - \frac{v_{12}^2}{v_{22}} \right)} \right]}{(1 - g)}$$

où $g = \frac{t^2 s^2 v_{22}}{b^2}$

et $v_{11}$, $v_{22}$, $v_{12}$ représentent respectivement les multiplicateurs de variance pour le numérateur et le dénominateur et le multiplicateur de covariance. Il sont obtenus directement à partir de $(X^t X)^{-1}$ ou indirectement en posant :

$$\mathrm{Var}(a_1 - a_2) = \mathrm{Var}(a_1) + \mathrm{Var}(a_2) - 2\mathrm{Cov}(a_1, a_2)$$

$$\text{et } \mathrm{Cov}(a_1 - a_2, b) = \mathrm{Cov}(a_1, b) - \mathrm{Cov}(a_2, b)$$

Une analyse de variance complète impliquant une partition de toutes les composantes est légèrement plus complexe car elle implique une redéfinition de *X*, avec davantage de colonnes, pour vérifier les hypothèses de parallélisme et de linéarité, après quoi les hypothèses linéaires peuvent être testées. Pour les titrages fondés sur des réponses qualitatives, les effets linéaires (ordonnées à l'origine $a_S$, $a_T$ etc. et pente commune *b*) sont déterminés en maximisant la somme sur les traitements de $n \ln \Phi(a_i + bx) + (n - r) \ln(1 - \Phi(a_i + bx))$, où *x* est ln(dose), $\Phi$ représente la forme de la distribution et $i \in \{S, T, ...\}$.

### 7.2. HÉTÉROGÉNÉITÉ DE LA VARIANCE

Il n'est pas toujours possible de résoudre le problème d'hétérogénéité de la variance par simple transformation des réponses. Une approche possible consiste à utiliser une régression linéaire pondérée. Pour obtenir une estimation sans biais, on applique aux observations un facteur de pondération proportionnel à l'inverse des variances d'erreur. Comme la variance d'erreur vraie n'est pas toujours connue, on peut procéder par détermination itérative des pondérations. Néanmoins, le calcul de l'intervalle de confiance pose encore d'autres problèmes.

### 7.3. VALEURS ABERRANTES ET ROBUSTESSE DES MÉTHODES

La méthode des moindres carrés décrite dans la présente annexe comporte l'inconvénient d'être extrêmement sensible aux résultats aberrants. Un résultat nettement aberrant peut totalement fausser les calculs. On remédie souvent à ce problème en écartant ce type de résultats des données analysées. Cette pratique peut toutefois conduire au rejet arbitraire de données, et n'est pas toujours sans danger. Il n'est pas facile de proposer des règles générales sur la façon de décider si une observation spécifique constitue ou non un résultat aberrant, et cela a incité au développement de nombreuses méthodes plus robustes, c'est-à-dire moins sensibles à l'existence de résultats aberrants car donnant moins de poids aux observations qui s'écartent beaucoup de la valeur présumée. Ces méthodes posent cependant d'autres problèmes liés au calcul des intervalles de confiance ou à la définition d'une fonction d'ajustement satisfaisante.

### 7.4. ERREURS CORRÉLÉES

Une randomisation absolue n'est pas toujours réalisable ou vraiment souhaitable d'un point de vue pratique. Il est donc fréquent que les doses successives d'une série de dilutions présentent des erreurs corrélées et que, par voie de conséquence, les limites de confiance soient beaucoup trop étroites. Des méthodes permettant de prendre en compte cet effet d'autocorrélation ont été développées

### 7.5. COURBES DOSE-RÉPONSE NON LINÉAIRES ÉTENDUES

L'analyse de courbes dose-réponse non linéaires étendues soulève un certain nombre de problèmes statistiques qu'il est indispensable de prendre en considération, et au sujet desquels il est recommandé de consulter un statisticien. Certains d'entre eux sont succinctement exposés ci-après.

1) Un exemple utilisant la fonction logistique à 4 paramètres est décrit plus haut. Cependant, il est également possible d'utiliser des modèles fondés sur des fonctions donnant d'autres courbes sigmoïdes. L'emploi de modèles comportant des paramètres d'asymétrie supplémentaires a ainsi été proposé.

2) L'hétérogénéité de la variance est courante lorsque les réponses se distribuent sur un large intervalle. Si l'analyse ignore cette hétérogénéité, l'interprétation des résultats risque d'être incorrecte et les estimations biaisées. L'emploi de facteurs de pondération proportionnels à l'inverse des variances de l'erreur a peu de chance d'être fiable avec des nombres de réplicats limités. Une approche satisfaisante peut être de calculer une fonction exprimant une relation entre la variance et la réponse moyenne.

3) Les procédures statistiques d'ajustement de courbe peuvent donner des estimations différentes selon les hypothèses posées sur l'homogénéité de la variance et selon l'intervalle de réponses utilisé.

4) En principe, l'égalité des réponses maximale et minimale obtenues avec les différentes préparations incluses dans un dosage peut être directement vérifiée lors de chaque détermination. Toutefois, l'interprétation des résultats de ces tests statistiques peut ne pas être évidente. Les tests de linéarité et de parallélisme décrits dans la méthode d'analyse simplifiée (exemple 5.4.1) incluent indirectement des vérifications d'égalité et d'exactitude des limites inférieure et supérieure.

5) De nombreux dosages comprennent des « témoins » servant à identifier les réponses limites (inférieure et/ou supérieure). Cependant, ces valeurs peuvent ne pas coïncider avec les limites inférieure et supérieure obtenues par ajustement statistique à partir de la courbe dose-réponse étendue.

6) La méthode d'analyse simplifiée décrite dans l'exemple 5.4.1 fournit des intervalles de confiance approximatifs. D'autres méthodes peuvent également être utilisées pour ce calcul, par exemple celle fondée sur le manque d'ajustement du modèle complètement spécifié. Pour des données de dosage typiques, avec des réponses couvrant l'ensemble de l'intervalle pour chaque préparation examinée, toutes les méthodes donnent des résultats voisins.

### 7.6. NON-PARALLÉLISME DES COURBES DOSE-RÉPONSE

La similarité des relations dose-réponse est un critère fondamental pour décider si un dosage peut être considéré comme un dosage de dilution, donc si l'estimation de l'activité relative est valide (voir Section 3.1.1). L'approche suivie pour vérifier ce critère est souvent de démontrer que les courbes dose-réponse obtenues pour l'étalon et pour la préparation à examiner ne présentent pas d'écart de parallélisme significatif. Une sous-estimation de l'erreur résiduelle peut entraîner le rejet injustifié de dosages pour écart significatif de parallélisme et/ou de linéarité, alors que cet écart est souvent un artefact dû à l'inadéquation du plan d'essai ou de l'analyse statistique. Des modifications mineures apportées au plan d'essai peuvent dans de nombreux cas améliorer sensiblement l'estimation de l'erreur résiduelle. De même, une analyse tenant compte du niveau effectif de réplication peut également améliorer la situation. Si l'estimation adéquate de l'erreur résiduelle n'est pas réalisable pour un dosage particulier, par exemple en raison de l'impossibilité de créer des doses et/ou des répétitions indépendantes, il peut être possible d'obtenir une estimation plus correcte de l'erreur résiduelle dans le cadre de la validation du dosage. Il existe aussi parfois des cas où le système d'essai présente une fidélité suffisante pour détecter un non-parallélisme léger mais réel. Si l'existence d'un non-parallélisme est réelle, il est nécessaire de la reconnaître et de trouver une solution adéquate. Cette solution peut, par exemple, impliquer l'emploi d'un étalon approprié, de composition semblable à celle de la préparation à examiner et donnant par conséquent une courbe parallèle. Si le système d'essai répond de façon non spécifique à des composants étrangers présents dans l'étalon ou la solution à examiner, l'emploi d'un système d'essai plus spécifique ne répondant

pas à des composants non pertinents peut être la bonne solution. Il n'existe aucune solution statistique simple et d'application générale qui permette de résoudre ces problèmes fondamentaux. L'approche appropriée est à décider au cas par cas, et cette décision nécessite l'intervention de statisticiens.

# 8. TABLES ET MÉTHODES DE GÉNÉRATION

Les tables contenues dans cette section donnent les valeurs critiques correspondant aux nombres de degrés de liberté les plus usuels. Si une valeur critique n'y figure pas, il convient de se référer à des tables plus exhaustives. De nombreux logiciels informatiques comportent des fonctions statistiques, et leur emploi est préférable à celui des tables présentées ici. Une autre approche possible consiste à utiliser les méthodes de génération décrites à la suite de chaque table pour calculer la probabilité correspondant à une variable statistique et un nombre de degrés de liberté donnés.

## 8.1. LOI DE *F*

Si la valeur observée est supérieure à la valeur indiquée dans la table 8.1.-I, elle est considérée comme significative (lignes supérieures, $p$ = 0,05) ou hautement significative (lignes inférieures, $p$ = 0,01). *df*1 est le nombre de degrés de liberté du numérateur et *df*2 le nombre de degrés de liberté du dénominateur.

*Méthode de génération.* Soit `F` le rapport *F*, `df1` et `df2` les valeurs décrites ci-dessus, et `pi` = $\pi$ = 3,14159265358979... La méthode indiquée dans le tableau 8.1.-II permet de générer la valeur *p*.

## 8.2. LOI DE *t*

Si la valeur observée est supérieure à la valeur indiquée dans la table 8.2.-I, elle est considérée comme significative ($p$ = 0,05) ou hautement significative ($p$ = 0,01).

*Méthodes de génération.* La valeur *p* pour un *t* donné avec df degrés de liberté peut être obtenue par les méthodes décrites dans la section 8.1 en faisant `F` = $t^2$, `df1` = 1 et `df2` = df.

La valeur *t* ($p$ = 0,05) pour un nombre de degrés de liberté `df` peut être obtenue par la méthode indiquée dans le tableau 8.2.-II ; elle sera exacte jusqu'à 6 décimales.

## 8.3. LOI DE $\chi^2$

Si la valeur observée est supérieure à la valeur indiquée dans la table 8.3.-I, elle est considérée comme significative ($p$ = 0,05) ou hautement significative ($p$ = 0,01).

*Méthode de génération.* Soit `X2` la valeur de la variable $\chi^2$ et `df` le nombre tel que décrit ci-dessus. La méthode indiquée dans le tableau 8.3.-II permet de générer la valeur *p*.

`phi` est ici la loi normale réduite cumulative $\Phi$ (voir section 8.4).

Table 8.1.-I – *Valeurs critiques de la loi de F*

| df1 → <br> df2 ↓ | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 8 | 10 | 12 | 15 | 20 | ∞ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10 | 4,965 | 4,103 | 3,708 | 3,478 | 3,326 | 3,217 | 3,072 | 2,978 | 2,913 | 2,845 | 2,774 | 2,538 |
| | 10,044 | 7,559 | 6,552 | 5,994 | 5,636 | 5,386 | 5,057 | 4,849 | 4,706 | 4,558 | 4,405 | 3,909 |
| 12 | 4,747 | 3,885 | 3,490 | 3,259 | 3,106 | 2,996 | 2,849 | 2,753 | 2,687 | 2,617 | 2,544 | 2,296 |
| | 9,330 | 6,927 | 5,953 | 5,412 | 5,064 | 4,821 | 4,499 | 4,296 | 4,155 | 4,010 | 3,858 | 3,361 |
| 15 | 4,543 | 3,682 | 3,287 | 3,056 | 2,901 | 2,790 | 2,641 | 2,544 | 2,475 | 2,403 | 2,328 | 2,066 |
| | 8,683 | 6,359 | 5,417 | 4,893 | 4,556 | 4,318 | 4,004 | 3,805 | 3,666 | 3,522 | 3,372 | 2,868 |
| 20 | 4,351 | 3,493 | 3,098 | 2,866 | 2,711 | 2,599 | 2,447 | 2,348 | 2,278 | 2,203 | 2,124 | 1,843 |
| | 8,096 | 5,849 | 4,938 | 4,431 | 4,103 | 3,871 | 3,564 | 3,368 | 3,231 | 3,088 | 2,938 | 2,421 |
| 25 | 4,242 | 3,385 | 2,991 | 2,759 | 2,603 | 2,490 | 2,337 | 2,236 | 2,165 | 2,089 | 2,007 | 1,711 |
| | 7,770 | 5,568 | 4,675 | 4,177 | 3,855 | 3,627 | 3,324 | 3,129 | 2,993 | 2,850 | 2,699 | 2,169 |
| 30 | 4,171 | 3,316 | 2,922 | 2,690 | 2,534 | 2,421 | 2,266 | 2,165 | 2,092 | 2,015 | 1,932 | 1,622 |
| | 7,562 | 5,390 | 4,510 | 4,018 | 3,699 | 3,473 | 3,173 | 2,979 | 2,843 | 2,700 | 2,549 | 2,006 |
| 50 | 4,034 | 3,183 | 2,790 | 2,557 | 2,400 | 2,286 | 2,130 | 2,026 | 1,952 | 1,871 | 1,784 | 1,438 |
| | 7,171 | 5,057 | 4,199 | 3,720 | 3,408 | 3,186 | 2,890 | 2,698 | 2,563 | 2,419 | 2,265 | 1,683 |
| ∞ | 3,841 | 2,996 | 2,605 | 2,372 | 2,214 | 2,099 | 1,938 | 1,831 | 1,752 | 1,666 | 1,571 | 1,000 |
| | 6,635 | 4,605 | 3,782 | 3,319 | 3,017 | 2,802 | 2,511 | 2,321 | 2,185 | 2,039 | 1,878 | 1,000 |

Tableau 8.1.-II – *Méthode de génération pour la loi de F*

| df1 pair | df1 impair et df2 pair | df1 et df2 impairs |
|---|---|---|
| `x=df1/(df1+df2/F)` | `x=df2/(df2+df1*F)` | `x=atn(sqr(df1*F/df2))` |
| `s=1` | `s=1` | `cs=cos(x)` |
| `t=1` | `t=1` | `sn=sin(x)` |
| `for i=2 to (df1-2) step 2` | `for i=2 to (df2-2) step 2` | `x=x/2` |
| `t=t*x*(df2+i-2)/i` | `t=t*x*(df1+i-2)/i` | `s=0` |
| `s=s+t` | `s=s+t` | `t=sn*cs/2` |
| `next i` | `next i` | `v=0` |
| `p=s*(1-x)^(df2/2)` | `p=1-s*(1-x)^(df1/2)` | `w=1` |
| | | `for i=2 to (df2-1) step 2` |
| | | `s=s+t` |
| | | `t=t*i/(i+1)*cs*cs` |
| | | `next i` |
| | | `for i=1 to (df1-2) step 2` |
| | | `v=v+w` |
| | | `w=w*(df2+i)/(i+2)*sn*sn` |
| | | `next i` |
| | | `p=1+(t*df2*v-x-s)/pi*4` |

5. Textes généraux

Table 8.2.-I – *Valeurs critiques de la loi de t*

| df | *p* = 0,05 | *p* = 0,01 | df | *p* = 0,05 | *p* = 0,01 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 12,706 | 63,656 | 22 | 2,074 | 2,819 |
| 2 | 4,303 | 9,925 | 24 | 2,064 | 2,797 |
| 3 | 3,182 | 5,841 | 26 | 2,056 | 2,779 |
| 4 | 2,776 | 4,604 | 28 | 2,048 | 2,763 |
| 5 | 2,571 | 4,032 | 30 | 2,042 | 2,750 |
| 6 | 2,447 | 3,707 | 35 | 2,030 | 2,724 |
| 7 | 2,365 | 3,499 | 40 | 2,021 | 2,704 |
| 8 | 2,306 | 3,355 | 45 | 2,014 | 2,690 |
| 9 | 2,262 | 3,250 | 50 | 2,009 | 2,678 |
| 10 | 2,228 | 3,169 | 60 | 2,000 | 2,660 |
| 12 | 2,179 | 3,055 | 70 | 1,994 | 2,648 |
| 14 | 2,145 | 2,977 | 80 | 1,990 | 2,639 |
| 16 | 2,120 | 2,921 | 90 | 1,987 | 2,632 |
| 18 | 2,101 | 2,878 | 100 | 1,984 | 2,626 |
| 20 | 2,086 | 2,845 | ∞ | 1,960 | 2,576 |

Table 8.2.-II – *Méthode de génération pour la loi de t*

```
t   =  1.959964+
       2.37228/df+
       2.82202/df^2+
       2.56449/df^3+
       1.51956/df^4+
       1.02579/df^5+
       0.44210/df^7
```

Table 8.3.-I – *Valeurs critiques de la loi de* $\chi^2$

| df | *p* = 0,05 | *p* = 0,01 | df | *p* = 0,05 | *p* = 0,01 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 3,841 | 6,635 | 11 | 19,675 | 24,725 |
| 2 | 5,991 | 9,210 | 12 | 21,026 | 26,217 |
| 3 | 7,815 | 11,345 | 13 | 22,362 | 27,688 |
| 4 | 9,488 | 13,277 | 14 | 23,685 | 29,141 |
| 5 | 11,070 | 15,086 | 15 | 24,996 | 30,578 |
| 6 | 12,592 | 16,812 | 16 | 26,296 | 32,000 |
| 7 | 14,067 | 18,475 | 20 | 31,410 | 37,566 |
| 8 | 15,507 | 20,090 | 25 | 37,652 | 44,314 |
| 9 | 16,919 | 21,666 | 30 | 43,773 | 50,892 |
| 10 | 18,307 | 23,209 | 40 | 55,758 | 63,691 |

Tableau 8.3.-II – *Méthode de génération pour la loi de* $\chi^2$

| df pair | df impair |
|---|---|
| `s=0` | `x=sqr(x2)` |
| `t=exp(-x2/2)` | `s=0` |
| `for i=2 to df step 2` | `t=x*exp(-x2/2)/sqr(pi/2)` |
| `s=s+t` | `for i=3 to df step 2` |
| `t=t*x2/i` | `s=s+t` |
| `next i` | `t=t*x2/i` |
| `p=1-s` | `next i` |
| | `p=1-s-2*phi(x)` |

### 8.4. LOI DE Φ (LOI NORMALE CENTRÉE RÉDUITE)

Table 8.4.-I – *Valeurs de la loi de Φ*

| *x* | Φ | *x* | Φ | *x* | Φ |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,00 | 0,500 | 1,00 | 0,841 | 2,00 | 0,977 |
| 0,05 | 0,520 | 1,05 | 0,853 | 2,05 | 0,980 |
| 0,10 | 0,540 | 1,10 | 0,864 | 2,10 | 0,982 |
| 0,15 | 0,560 | 1,15 | 0,875 | 2,15 | 0,984 |
| 0,20 | 0,579 | 1,20 | 0,885 | 2,20 | 0,986 |
| 0,25 | 0,599 | 1,25 | 0,894 | 2,25 | 0,988 |
| 0,30 | 0,618 | 1,30 | 0,903 | 2,30 | 0,989 |
| 0,35 | 0,637 | 1,35 | 0,911 | 2,35 | 0,991 |
| 0,40 | 0,655 | 1,40 | 0,919 | 2,40 | 0,992 |
| 0,45 | 0,674 | 1,45 | 0,926 | 2,45 | 0,993 |
| 0,50 | 0,691 | 1,50 | 0,933 | 2,50 | 0,994 |
| 0,55 | 0,709 | 1,55 | 0,939 | 2,55 | 0,995 |
| 0,60 | 0,726 | 1,60 | 0,945 | 2,60 | 0,995 |
| 0,65 | 0,742 | 1,65 | 0,951 | 2,65 | 0,996 |
| 0,70 | 0,758 | 1,70 | 0,955 | 2,70 | 0,997 |
| 0,75 | 0,773 | 1,75 | 0,960 | 2,75 | 0,997 |
| 0,80 | 0,788 | 1,80 | 0,964 | 2,80 | 0,997 |
| 0,85 | 0,802 | 1,85 | 0,968 | 2,85 | 0,998 |
| 0,90 | 0,816 | 1,90 | 0,971 | 2,90 | 0,998 |
| 0,95 | 0,829 | 1,95 | 0,974 | 2,95 | 0,998 |

Pour les *x* négatifs, la valeur Φ s'obtient à partir de la table 8.4.-I en prenant $1 - \Phi(-x)$.

*Méthode de génération* : soit x la valeur de la variable *x*. La méthode indiquée dans le tableau 8.4.-II permet d'obtenir la valeur Φ correspondante si $0 \le x \le 8{,}15$. Si $x > 8{,}15$, on peut poser $\Phi = 1$. Si *x* est négative, on peut utiliser la formule indiquée ci-dessus. L'emploi de cette méthode suppose que l'ordinateur puisse représenter environ 15 décimales. Si le nombre de décimales représentées est inférieur ou supérieur à 15, la méthode nécessite quelques aménagements simples.

Tableau 8.4.-II – *Méthode de génération pour la loi de Φ*

```
s=0
t=x
i=1
repeat
s=s+t
i=i+2
t=t*x*x/i
until t<1E-16
phi=0.5+s*exp(-x*x/2)/sqr(2*pi)
```

### 8.5. PERMUTATIONS AU HASARD

Les permutations au hasard sont indispensables dans le cas des essais en blocs complets. L'algorithme représenté ci-après montre comment obtenir une permutation au hasard de *N* traitements au moyen de la fonction de génération d'un système informatique.

Etape 1. Inscrire en ligne les *N* traitements possibles.

Etape 2. Choisir au hasard un nombre entier *r* tel que $1 \le r \le N$.

Etape 3. Permuter le *r*-ème traitement et le *N*-ème traitement de la ligne.

Etape 4. Faire $N = N - 1$ et répéter les opérations 2 à 4 jusqu'à $N = 1$.

L'exemple suivant, à 6 traitements, illustre cet algorithme.

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | $N = 6$ | $S_1$ | $S_2$ | $S_3$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ |
| 2. | $r = 2$ | | → | | | | ← |
| 3. | | $S_1$ | $T_3$ | $S_3$ | $T_1$ | $T_2$ | $S_2$ |
| 4. | $N = 5$ | | | | | | |
| 2. | $r = 4$ | | | | → | ← | |
| 3. | | $S_1$ | $T_3$ | $S_3$ | $T_2$ | $T_1$ | $S_2$ |
| 4. | $N = 4$ | | | | | | |
| 2. | $r = 4$ | | | | ↓ | | |
| 3. | | $S_1$ | $T_3$ | $S_3$ | $T_2$ | $T_1$ | $S_2$ |
| 4. | $N = 3$ | | | | | | |
| 2. | $r = 1$ | → | | ← | | | |
| 3. | | $S_3$ | $T_3$ | $S_1$ | $T_2$ | $T_1$ | $S_2$ |
| 4. | $N = 2$ | | | | | | |
| 2. | $r = 1$ | → | ← | | | | |
| 3. | | $T_3$ | $S_3$ | $S_1$ | $T_2$ | $T_1$ | $S_2$ |
| 4. | $N = 1$ | | | | | | |

### 8.6. CARRÉS LATINS

L'exemple suivant montre comment utiliser 3 permutations indépendantes pour obtenir un carré latin.

1) Générer une permutation au hasard des *N* traitements possibles (voir section 8.5) :

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| $T_3$ | $S_3$ | $S_1$ | $T_2$ | $T_1$ | $S_2$ |

2) On peut construire un carré latin simple en procédant comme suit à une rotation vers la droite des termes de cette permutation. Inscrire dans la première ligne la permutation obtenue à l'étape 1. La seconde ligne se compose de la même permutation, mais dont tous les termes on été décalés vers la droite, le traitement situé à l'extrême droite venant occuper l'espace libre à l'extrême gauche. Répéter cette opération à chaque ligne jusqu'à ce que tous les traitements apparaissent une fois dans chaque colonne :

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| $T_3$ | $S_3$ | $S_1$ | $T_2$ | $T_1$ | $S_2$ |
| $S_2$ | $T_3$ | $S_3$ | $S_1$ | $T_2$ | $T_1$ |
| $T_1$ | $S_2$ | $T_3$ | $S_3$ | $S_1$ | $T_2$ |
| $T_2$ | $T_1$ | $S_2$ | $T_3$ | $S_3$ | $S_1$ |
| $S_1$ | $T_2$ | $T_1$ | $S_2$ | $T_3$ | $S_3$ |
| $S_3$ | $S_1$ | $T_2$ | $T_1$ | $S_2$ | $T_3$ |

3) Générer ensuite 2 permutations au hasard indépendantes des nombres 1 à $N$ :

– une pour les lignes :

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **2** | **3** | **6** | **1** | **4** | **5** |

– et une pour les colonnes :

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **3** | **4** | **6** | **2** | **5** | **1** |

4) Le carré latin randomisé peut alors être obtenu en réordonnant les lignes et les colonnes du carré latin simple selon les 2 permutations respectivement définies :

| | 3 | 4 | 6 | 2 | 5 | 1 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | $T_3$ | $S_3$ | $S_1$ | $T_2$ | $T_1$ | $S_2$ |
| 3 | $S_2$ | $T_3$ | $S_3$ | $S_1$ | $T_2$ | $T_1$ |
| 6 | $T_1$ | $S_2$ | $T_3$ | $S_3$ | $S_1$ | $T_2$ |
| 1 | $T_2$ | $T_1$ | $S_2$ | $T_3$ | $S_3$ | $S_1$ |
| 4 | $S_1$ | $T_2$ | $T_1$ | $S_2$ | $T_3$ | $S_3$ |
| 5 | $S_3$ | $S_1$ | $T_2$ | $T_1$ | $S_2$ | $T_3$ |

↓

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | $S_1$ | $T_3$ | $T_2$ | $T_1$ | $S_3$ | $S_2$ |
| 2 | $S_2$ | $T_2$ | $T_3$ | $S_3$ | $T_1$ | $S_1$ |
| 3 | $T_1$ | $S_1$ | $S_2$ | $T_3$ | $T_2$ | $S_3$ |
| 4 | $S_3$ | $S_2$ | $S_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $T_1$ |
| 5 | $T_3$ | $T_1$ | $S_3$ | $S_1$ | $S_2$ | $T_2$ |
| 6 | $T_2$ | $S_3$ | $T_1$ | $S_2$ | $S_1$ | $T_3$ |

# 9. SYMBOLES ET DÉFINITIONS

| Symbole | Définition |
|---|---|
| $a$ | Ordonnée à l'origine de la droite de régression des réponses en fonction de la dose ou de ln(dose) |
| $b$ | Pente de la droite de régression des réponses en fonction des doses ou du logarithme des doses |
| $d$ | Nombre de doses utilisées pour chaque préparation (à l'exclusion du blanc dans le modèle à rapport de pente) |
| $e$ | Base des logarithmes népériens (= 2,71828182845905...) |
| $g$ | Variable statistique utilisée dans le théorème de Fieller : $g = \frac{C-1}{C}$ |
| $h$ | Nombre de préparations incluses dans un titrage, préparation étalon comprise |
| $m$ | Estimation de l'activité obtenue en faisant le rapport des effets dans les modèles linéaires généraux |
| $n$ | Nombre de répétitions pour chaque traitement |

| Symbole | Définition |
|---|---|
| $p$ | Probabilité qu'une variable statistique prenne une valeur supérieure à la valeur observée (représente également le rapport $r/n$ dans la méthode des probits) |
| $r$ | Dans les titrages fondés sur des réponses qualitatives, nombre d'unités donnant une réponse par groupe de traitement |
| $s$ | Estimation de l'écart type ($= \sqrt{s^2}$) |
| $s^2$ | Estimation de la variance résiduelle correspondant au carré moyen de l'erreur dans l'analyse de variance |
| $t$ | Variable de Student (table 8.2.) |
| $u$ | Réponse observée en analyse à 4 paramètres |
| $v_{11}, v_{12}, v_{22}$ | Facteurs de (co)variance s'appliquant au numérateur et au dénominateur du quotient $m$ dans le théorème de Fieller |
| $w$ | Facteur de pondération |
| $x$ | ln(dose) |
| $y$ | Réponse individuelle ou réponse transformée |
| $A$ | Activité présumée d'une préparation inconnue, utilisée pour préparer les dilutions |
| $B$ | Réponse moyenne aux blancs dans le modèle à rapport de pente |
| $C$ | variable utilisée dans le calcul des intervalles de confiance : $C = \frac{1}{1-g}$ |
| $C_1, \ldots, C_n$ | Réponse moyenne de chaque colonne d'un carré latin |
| $D_1, D_2$ | Réponse moyenne au temps 1 ou au temps 2 dans un double essai croisé |
| $F$ | Rapport de 2 estimations indépendantes de la variance suivant une loi de $F$ (table 8.1.) |
| $G_S, G_T, \ldots$ | Valeurs des traitements utilisés dans une analyse de variance selon le modèle à rapport de pente |
| $H_P, H_L$ | Multiplicateurs utilisés dans une analyse de variance selon le modèle en lignes parallèles |
| $H_B, H_I$ | Multiplicateurs utilisés dans une analyse de variance selon le modèle en à rapport de pente |
| $I$ | Dans le modèle en lignes parallèles, logarithme du rapport entre doses adjacentes. Dans le modèle à rapport de pente, intervalle entre doses adjacentes |
| $J_S, J_T, \ldots$ | Valeurs de linéarité utilisées dans une analyse de variance selon le modèle à rapport de pente |

5. Textes généraux

| Symbole | Définition |
|---|---|
| $K$ | Facteur de correction utilisé dans le calcul des sommes de carrés de l'analyse de variance |
| $L$ | Etendue de l'intervalle de confiance en valeur logarithmique |
| $L_S$, $L_T$, ... | Contrastes linéaires de l'étalon et des préparations à titrer |
| $M'$ | ln(rapport d'activité) d'une préparation donnée |
| $N$ | Nombre total de traitements compris dans le titrage (= $dh$) |
| $P_S$, $P_T$, ... | Somme de l'étalon et des préparations à titrer |
| $R$ | Activité estimée d'une préparation à titrer |
| $R'$ | Rapport d'activité d'une préparation à titrer |
| $R_1$, ... , $R_n$ | Réponse moyenne de chacune des lignes 1 à $n$ d'un carré latin, ou de chacun des blocs d'un essai en blocs complets |
| $S$ | Préparation étalon |
| $S_1$, ... , $S_d$ | Réponse moyenne aux différentes doses d'une préparation étalon $S$, de la dose la plus faible (1) à la dose la plus forte ($d$) |
| $SS$ | Somme des carrés associée à une source de variation donnée |
| $T$, $U$, $V$, ... | Préparations à titrer |
| $T_1$, ... , $T_d$ | Réponse moyenne aux différentes doses d'une préparation à titrer $T$, de la dose la plus faible (1) à la dose la plus forte ($d$) |
| $V$ | Coefficient de variance dans le calcul des limites de confiance |
| $W$ | Facteur de pondération utilisé pour la combinaison de résultats de titrages |
| $X$ | Structure linéaire ou matrice de représentation utilisées dans les modèles linéaires généraux |
| $Y$ | Vecteur représentant les réponses (transformées) dans les modèles linéaires généraux |

| Symbole | Définition |
|---|---|
| $Z$ | Dérivée première de $\Phi$ |
| $\alpha$ | Asymptote supérieure de la courbe ln(dose)-réponse en analyse à 4 paramètres |
| $\beta$ | Facteur de pente de la courbe ln(dose)-réponse en analyse à 4 paramètres |
| $\gamma$ | ln(dose) donnant une réponse de 50 pour cent en analyse à 4 paramètres |
| $\delta$ | Asymptote inférieure de la courbe ln(dose)-réponse en analyse à 4 paramètres |
| $\pi$ | 3,141592653589793238... |
| $\Phi$ | Loi normale centrée réduite (table 8.4.) |
| $\chi^2$ | Variable chi carré (table 8.3.) |

## 10. LITTÉRATURE

*Cette section contient une liste de références bibliographiques dont la lecture est recommandée pour une étude plus approfondie du sujet.*


Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis,* 3rd Ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Nelder, J.A. & Wedderburn, R.W.M. (1972). Generalized linear models, *Journal of the Royal Statistical Society, Series* A 135, 370-384.

DeLean, A., Munson, P.J. & Rodbard, D. (1978). Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves : Application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves, *Am. J. Physiol.* 235(2) : E97-E102.

Finney, D.J. (1978). *Statistical Method in Biological Assay,* 3rd Ed. Griffin, London.

Sokal, R.R. & Rohlf, F.R. (1981). *Biometry: Principles and Practice of Statistics in Biological Research,* 2nd Ed. W.H. Freemann & CO, New York.

Peace, K.E. (1988). *Biopharmaceutical Statistics for Drug Development,* Marcel Dekker Inc., New York/Basel.

Bowerman, B.L. & O'Connell, R.T. (1990). *Linear Statistical Models an Applied Approach,* 2nd Ed. PWS-KENT Publishing Company, Boston.

Govindarajulu, Z. (2001). *Statistical Techniques in Bioassay,* 2nd revised and enlarged edition, Karger, New York.

# 5.4. SOLVANTS RÉSIDUELS

**01/2008:50400**

# 5.4. SOLVANTS RÉSIDUELS

## LIMITATION DES TAUX DE SOLVANTS RÉSIDUELS DANS LES SUBSTANCES ACTIVES, LES EXCIPIENTS ET LES MÉDICAMENTS

La Conférence Internationale sur l'Harmonisation (ICH) (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) a adopté un document intitulé « Impuretés : Note explicative relative aux solvants résiduels », qui prescrit les limites de teneur en solvants pouvant subsister dans les substances actives, les excipients et les médicaments après la fabrication. Cette note explicative, dont le texte est reproduit ci-après, exclut les produits déjà commercialisés. Cependant, la Pharmacopée Européenne applique aux substances actives, aux excipients et aux médicaments existants les principes énoncés dans la note explicative, que ceux-ci fassent ou non l'objet d'une monographie dans la Pharmacopée. Il convient de rechercher dans l'ensemble des substances et produits, d'éventuelles traces de solvants qui auraient pu subsister après la fabrication.

Lorsque les limites à appliquer sont conformes à celles données ci-après, des essais de solvants résiduels ne sont, en règle générale, pas mentionnés dans les monographies puisque les solvants utilisés peuvent différer d'un fabricant à l'autre et les exigences de ce chapitre sont mises en application au moyen de la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)*. L'Autorité compétente doit être informée des solvants utilisés pendant le processus de fabrication. Ces informations figurent également dans le dossier présenté lors de la demande d'obtention d'un certificat de conformité aux monographies de la Pharmacopée Européenne et sont mentionnées sur ledit certificat.

Lorsqu'il est fait emploi de solvants de classe 3, la substance peut être soumise à un essai de la perte à la dessiccation ou une détermination spécifique peut être effectuée. Si un solvant de classe 3 présente une limite justifiée et autorisée supérieure à 0,5 pour cent, il y a lieu de procéder à une détermination spécifique de ce solvant.

En cas d'utilisation de solvants résiduels qui relèvent des classes 1 ou 2 (voire de la classe 3 lorsque leur teneur est supérieure à 0,5 pour cent), il convient d'appliquer chaque fois que possible, la méthodologie énoncée dans la méthode générale (*2.4.24*). Dans les autres cas, le recours à une méthode validée s'impose.

Lorsqu'une détermination quantitative d'un solvant résiduel est effectuée, il est tenu compte du résultat dans le calcul de la teneur de la substance, sauf si un essai de perte à la dessiccation est également effectué.

## IMPURETÉS : NOTE EXPLICATIVE RELATIVE AUX SOLVANTS RÉSIDUELS (CSP/ICH/283/95)



### 1. INTRODUCTION

La présente note explicative a pour objectif de recommander les quantités de solvants résiduels admissibles dans les produits à usage pharmaceutique, en excluant tout risque pour la santé du patient. Elle préconise l'utilisation des solvants les moins toxiques et indique, pour quelques solvants, les taux résiduels jugés acceptables d'un point de vue toxicologique.

Les solvants résiduels utilisés dans les produits à usage pharmaceutique sont définis ici comme des produits chimiques organiques volatils, utilisés ou produits dans la fabrication de substances actives ou d'excipients, ou entrant dans la préparation de médicaments. Les procédés de fabrication courants ne permettent pas d'éliminer totalement les solvants. Le choix judicieux du solvant pour la synthèse de la substance active peut améliorer le rendement ou déterminer des paramètres tels que la forme cristalline, la pureté et la solubilité. Par conséquent, le solvant peut être parfois un élément critique du procédé de synthèse. La présente note explicative ne concerne ni les solvants exclusivement utilisés comme excipients, ni les solvates. Il convient toutefois d'évaluer et de justifier la teneur en solvants de tels produits.

Etant donné que les solvants résiduels ne présentent aucun avantage thérapeutique, il convient de les éliminer autant que possible pour satisfaire aux exigences de qualité (spécifications, Bonnes Pratiques de Fabrication ...). Les médicaments ne doivent pas présenter des taux de solvants résiduels supérieurs à ceux mentionnés par les données de sécurité. En raison du caractère inacceptable de leur toxicité, les solvants de la classe 1 (tableau 1) ne doivent pas être employés dans la fabrication de substances actives, d'excipients ou de médicaments, à moins

5. Textes généraux

que leur utilisation ne puisse être justifiée par une analyse satisfaisante du rapport risques/bénéfices. L'utilisation des solvants de classe 2 (tableau 2), dont la toxicité est moins importante, doit être limitée en vue de protéger les patients d'éventuelles réactions indésirables. Enfin, idéalement ce sont les solvants les moins toxiques (classe 3, tableau 3) qui doivent être utilisés chaque fois que possible. La liste complète des solvants figure en annexe 1 de la présente note explicative.

Les listes présentées dans ce document ne sont pas exhaustives ; aussi certains solvants utilisés à l'heure actuelle pourront-ils être ultérieurement ajoutés aux différentes listes. Les limites recommandées pour les solvants des classes 1 et 2 ou encore la classification des solvants sont susceptibles de varier en fonction de la mise à disposition de nouvelles données de sécurité. Les données de sécurité qui permettent d'étayer la demande de mise sur le marché d'un nouveau médicament contenant un nouveau solvant peuvent s'inspirer des informations présentées dans ce document, ou de celles du *Guideline ICH-Q3A* (« Impuretés dans les nouvelles substances actives »), du *Guideline ICH-Q3B* (« Impuretés dans les nouveaux médicaments »), ou encore des trois documents réunis.

## 2. PORTÉE DE LA PRÉSENTE NOTE EXPLICATIVE

Cette note fait l'inventaire des solvants résiduels présents dans les substances actives, les excipients et les médicaments. Par conséquent, la réalisation d'un essai des solvants résiduels doit être effectuée chaque fois qu'il est connu que les procédés de fabrication ou de purification entraînent la rémanence de tels solvants. La recherche ne portera que sur les solvants utilisés ou produits pendant la fabrication ou la purification de substances actives, d'excipients ou de médicaments. Même si les fabricants peuvent choisir d'effectuer la détermination sur le médicament, il est par ailleurs possible d'appliquer une méthode cumulative permettant de déterminer les taux de solvants résiduels présents dans le médicament à partir des taux existant dans ses différents éléments constitutifs. Si ce calcul donne un résultat inférieur ou égal au niveau de solvant indiqué dans cette note explicative, la détermination des solvants résiduels sur le médicament n'est pas exigée. En revanche, si le taux de solvants résiduels obtenu est supérieur au niveau recommandé, l'essai doit être réalisé sur le médicament pour attester que le taux des solvants résiduels a été ramené à des valeurs admissibles. Les médicaments doivent également être soumis à cet essai lorsqu'un solvant est utilisé pendant la fabrication.

La présente note explicative ne s'applique pas aux nouvelles substances actives, excipients ou médicaments potentiels utilisés aux stades du développement qui correspondent à la recherche clinique, ni aux médicaments déjà commercialisés.

La présente note explicative s'applique à toutes les formes pharmaceutiques et à toutes les voies d'administration. Des taux de solvants résiduels élevés sont toutefois admissibles dans certains cas, par exemple pour des traitements à court terme (30 jours ou moins) ou des applications locales. Ces taux devront faire l'objet d'une justification au cas par cas.

Voir l'annexe 2 pour un complément d'informations relatives aux solvants résiduels.

## 3. PRINCIPES GÉNÉRAUX

### *3.1. CLASSIFICATION DES SOLVANTS RÉSIDUELS EN FONCTION DE L'ÉVALUATION DU RISQUE*

L'*International Program on Chemical Safety* (*IPCS*) utilise l'expression « dose journalière tolérable » (DJT) (en anglais *TDI = tolerable daily intake*) pour décrire les limites d'une exposition aux produits chimiques toxiques. Pour ce même concept, l'OMS ainsi que d'autres autorités ou instituts (nationaux ou internationaux) de santé publique utilisent l'expression « dose journalière admissible » (DJA) (en anglais *ADI = acceptable daily intake*). L'exposition journalière admissible (EJA) (en anglais *PDE = Permitted daily exposure*) est la nouvelle expression consacrée par le présent document. Elle fait référence à la dose de solvants résiduels admissible du point de vue de l'usage pharmaceutique, ce qui permet d'éviter toute confusion entre les différentes valeurs de DJA pour une même substance.

L'annexe 1 fait l'inventaire des solvants résiduels dont il est question dans le présent document. Ils sont présentés sous forme de tableau (nom, formule développée et classe) et évalués en fonction du risque qu'ils présentent pour la santé du patient. Ils se subdivisent en trois classes :

Classe 1 : Solvants à éviter

Carcinogènes humains connus ou fortement suspectés, dangereux pour l'environnement.

Classe 2 : Solvants dont l'utilisation est soumise à limitation

Carcinogènes animaux non-génotoxiques ou éventuels agents causals d'autres effets toxiques irréversibles tels que la neurotoxicité ou la tératogénicité.

Solvants présumés être à l'origine d'autres effets toxiques importants mais réversibles.

Classe 3 : Solvants à faible potentiel toxique

Solvants à faible potentiel toxique pour l'homme ; aucune limite relative à l'exposition n'est exigée. Les solvants de classe 3 présentent des EJA de 50 mg ou plus.

### *3.2. MÉTHODES PERMETTANT D'ÉTABLIR LES LIMITES D'EXPOSITION*

La méthode utilisée pour l'établissement des EJA aux solvants résiduels est présentée dans l'Annexe 3. Les résumés des données de toxicité qui ont servi à établir ces valeurs sont publiées dans *Pharmeuropa*, Vol. 9, n°. 1, supplément du mois d'avril 1997.

### *3.3. OPTIONS PERMETTANT DE DÉCRIRE LES LIMITES DES SOLVANTS DE CLASSE 2*

Deux options permettent de fixer les limites qui s'appliquent aux solvants de classe 2.

**Option 1** : Les limites de concentration (en parties par million) indiquées dans le Tableau 2 peuvent être utilisées. Elles ont été déterminées à l'aide de l'équation (1) ci-après et prennent comme référence une dose de 10 g administrée quotidiennement.

$$\text{Concentration (ppm)} = \frac{1000 \times \text{EJA}}{\text{dose}} \qquad (1)$$

Dans ce cas, l'EJA est indiquée en mg/jour et la dose en g/jour.

Ces limites sont jugées acceptables pour toutes les substances, excipients, ou médicaments. Par conséquent, cette option peut être appliquée si la dose journalière est inconnue ou variable. Si l'ensemble des excipients et des substances actives d'une formulation satisfont aux limites de l'option 1, ces composants peuvent être utilisés dans n'importe quelles proportions. Aucun autre calcul ne s'impose à condition que la dose journalière ne dépasse pas 10 g. Les médicaments administrés à des doses supérieures à 10 g par jour relèvent de l'option 2.

**Option 2** : Il n'est pas jugé utile que chaque composant du médicament satisfasse aux limites indiquées dans l'option 1. L'EJA, exprimée en mg/jour, telle qu'indiquée dans le tableau 2 peut être utilisée avec la dose journalière maximale connue et l'équation (1) susmentionnée pour déterminer la concentration en solvant résiduel autorisée dans un médicament. De telles limites sont acceptables s'il a été démontré que la présence de solvant résiduel a été réduite au minimum possible. Les limites doivent être réalistes au regard de la précision analytique, de la faisabilité en cours de fabrication et d'une variation raisonnable du procédé de fabrication. Enfin, elles doivent refléter les standards de fabrication actuels.

Il est possible d'utiliser l'option 2 en additionnant les quantités de solvants résiduels présentes dans chacun des composants du médicament. La somme des quantités de solvants admissibles par jour doit être inférieure à celle indiquée par l'EJA.

A titre d'exemple, considérons l'application des options l et 2 à l'acétonitrile contenu dans un médicament. L'exposition journalière admissible à l'acétonitrile est de 4,1 mg/jour, par

conséquent la limite préconisée par l'option 1 est de 410 ppm. La quantité maximale de médicament administrée par jour est de 5,0 g et ce médicament contient deux excipients. La composition du médicament et le calcul de la teneur maximale en acétonitrile résiduel sont indiqués dans le tableau suivant :

| Composant | Quantité dans la formulation | Teneur en acétronitrile | Exposition journalière |
|---|---|---|---|
| Substance active | 0,3 g | 800 ppm | 0,24 mg |
| Excipient 1 | 0,9 g | 400 ppm | 0,36 mg |
| Excipient 2 | 3,8 g | 800 ppm | 3,04 mg |
| Médicament | 5,0 g | 728 ppm | 3,64 mg |

L'excipient 1 satisfait à la limite imposée par l'option 1, mais la substance active, l'excipient 2, et le médicament ne répondent pas aux exigences de cette limite. Néanmoins, le médicament satisfait à la limite de l'option 2 (4,1 mg par jour) et par conséquent aux recommandations contenues dans cette note explicative.

Considérons un second exemple d'acétonitrile résiduel. La quantité maximale d'un médicament administrée par jour est de 5,0 g et ce médicament contient deux excipients. La composition du médicament et le calcul de la teneur maximale en acétonitrile résiduel sont indiqués dans le tableau suivant :

| Composant | Quantité dans la formulation | Teneur en acétronitrile | Exposition journalière |
|---|---|---|---|
| Substance active | 0,3 g | 800 ppm | 0,24 mg |
| Excipient 1 | 0,9 g | 2000 ppm | 1,80 mg |
| Excipient 2 | 3,8 g | 800 ppm | 3,04 mg |
| Médicament | 5,0 g | 1016 ppm | 5,08 mg |

Dans ce cas, il apparaît que par la sommation des teneurs de chaque constituant, le médicament ne respecte ni la limite de l'option 1, ni celle de l'option 2. Le fabricant peut alors analyser le médicament en vue de déterminer si le procédé de fabrication du médicament a permis de réduire le taux d'acétonitrile. Si le taux d'acétonitrile n'a pas été ramené à la limite autorisée au cours de la fabrication, il appartient au fabricant d'engager d'autres mesures pour réduire la quantité d'acétonitrile contenue dans le médicament. Si toutes ces opérations ne permettent toujours pas de réduire le taux de solvant résiduel, le fabricant peut, à titre exceptionnel, faire état des mesures qu'il a prises en vue de réduire le taux de solvant jusqu'à la limite préconisée et fournir une analyse évaluant les risques et les bénéfices en faveur de l'utilisation d'un médicament dont la teneur en solvant résiduel est supérieure à la limite autorisée.

### *3.4. PROCÉDURES ANALYTIQUES*

Les teneurs en solvants résiduels sont habituellement déterminées par des techniques chromatographiques telles que la chromatographie en phase gazeuse. Pour déterminer les taux de solvants résiduels, il convient d'appliquer, dans la mesure du possible, les procédures harmonisées décrites dans les pharmacopées. En cas d'impossibilité, les fabricants peuvent choisir une procédure analytique validée et appropriée à une application particulière. En présence de solvants relevant exclusivement de la classe 3, une méthode non spécifique, telle que la perte à la dessiccation, peut être utilisée. La validation des méthodes permettant de déterminer les niveaux de solvants résiduels doivent répondre aux guidelines ICH suivants : *Text on Validation of Analytical Procedures* et *Extension of the ICH Text on Validation of Analytical Procedures.*

### *3.5. DÉCLARATION DE CONFORMITÉ DES LIMITES EN SOLVANTS RÉSIDUELS*

Afin de respecter les critères mentionnés dans cette note explicative, les fabricants de produits à usage pharmaceutique ont besoin d'informations sur les taux de solvants résiduels contenus dans les excipients ou les substances actives. Voici, à titre d'exemple les informations qu'un fabricant d'excipients ou de substances actives pourrait transmettre à un fabricant de médicaments ; l'une des expressions suivantes peut être choisie selon le cas :

– Seuls des solvants de classe 3 sont susceptibles d'être présents. Perte à la dessiccation inférieure à 0,5 %.
– Seuls les solvants de classe 2 X, Y, .... sont susceptibles d'être présents. Les taux sont tous inférieurs à la limite préconisée par l'option 1. (Dans ce cas, le fournisseur indiquerait le nom des solvants de classe 2 représentés par X, Y, ...).
– Seuls les solvants de classe 2 X, Y ... et des solvants de classe 3 sont susceptibles d'être présents. Les taux des solvants résiduels de classe 2 sont inférieurs à la limite préconisée par l'option 1 et ceux des solvants de classe 3 sont inférieurs à 0,5 %.

Si des solvants de classe 1 sont susceptibles d'être présents, ils doivent être identifiés et quantifiés. L'expression « ...susceptibles d'être présents » renvoie à la fois au solvant entrant dans l'étape finale de la fabrication et aux solvants utilisés au cours des étapes précédentes et qui ne sont pas éliminés systématiquement au moyen d'un procédé validé.

Si les solvants résiduels de classe 2 ou 3 atteignent un taux respectivement supérieur à la limite préconisée par l'option 1 ou à 0,5 %, ils doivent être identifiés et quantifiés.

## 4. LIMITES EN SOLVANTS RÉSIDUELS

### *4.1. SOLVANTS À ÉVITER*

Les solvants de la classe 1 ne doivent pas être utilisés dans la fabrication de substances actives, d'excipients et de médicaments en raison du caractère inacceptable de leur toxicité ou de leur effet nuisible à l'environnement. Toutefois, si l'utilisation de ces solvants est incontournable dans la production d'un médicament présentant une avance thérapeutique significative, leur taux ne doit en aucun cas dépasser les valeurs indiquées dans le tableau 1, sauf exception justifiée. Le 1,1,1-trichloroéthane figure au tableau 1 en raison de son effet nuisible à l'environnement. La limite de 1500 ppm est fondée sur l'évaluation des données de sécurité.

Tableau 1. – *Solvants de classe 1 dans les produits à usage pharmaceutique (solvants à éviter)*

| Solvant | Limite de concentration (ppm) | Risque |
|---|---|---|
| Benzène | 2 | Carcinogène |
| Tétrachlorure de carbone | 4 | Toxique et dangereux pour l'environnement |
| 1,2-Dichloroéthane | 5 | Toxique |
| 1,1-Dichloroéthène | 8 | Toxique |
| 1,1,1-Trichloroéthane | 1500 | Dangereux pour l'environnement |

### *4.2. SOLVANTS DONT L'UTILISATION EST LIMITÉE*

La présence dans des produits à usage pharmaceutique, de solvants du tableau 2 doit être limitée en raison de leur toxicité intrinsèque. Les EJA et les concentrations sont respectivement indiquées à 0,1 mg/jour et à 10 ppm près. Les valeurs présentées ne reflètent pas nécessairement la précision analytique de leur détermination. La précision doit être déterminée lors de la validation de la méthode.

Tableau 2. – *Solvants de classe 2 dans les produits à usage pharmaceutique*

| Solvant | EJA (mg/jour) | Limite de concentration (ppm) |
|---|---|---|
| Acétonitrile | 4,1 | 410 |
| Chlorobenzène | 3,6 | 360 |
| Chloroforme | 0,6 | 60 |
| Cyclohexane | 38,8 | 3880 |
| 1,2-Dichloroéthène | 18,7 | 1870 |
| Dichlorométhane | 6,0 | 600 |

| Solvant | EJA (mg/jour) | Limite de concentration (ppm) |
|---|---|---|
| 1,2-Diméthoxyéthane | 1,0 | 100 |
| *N,N*-Diméthylacétamide | 10,9 | 1090 |
| *N,N*-Diméthylformamide | 8,8 | 880 |
| 1,4-Dioxane | 3,8 | 380 |
| 2-Ethoxyéthanol | 1,6 | 160 |
| Ethylèneglycol | 6,2 | 620 |
| Formamide | 2,2 | 220 |
| Hexane | 2,9 | 290 |
| Méthanol | 30,0 | 3000 |
| 2-Méthoxyéthanol | 0,5 | 50 |
| Méthylbutylcétone | 0,5 | 50 |
| Méthylcyclohexane | 11,8 | 1180 |
| *N*-Méthylpyrrolidone | 5,3 | 530 |
| Nitrométhane | 0,5 | 50 |
| Pyridine | 2,0 | 200 |
| Sulfolane | 1,6 | 160 |
| Tétrahydrofurane | 7,2 | 720 |
| Tétraline | 1,0 | 100 |
| Toluène | 8,9 | 890 |
| 1,1,2-Trichloroéthène | 0,8 | 80 |
| Xylène* | 21,7 | 2170 |

*habituellement 60 pour cent de *m*-xylène, 14 pour cent de *p*-xylène, 9 pour cent d'*o*-xylène avec 17 pour cent d'éthylbenzène

### *4.3. SOLVANTS À FAIBLE POTENTIEL TOXIQUE*

Les solvants de la classe 3 (présentés dans le tableau 3) peuvent être considérés comme des solvants de moindre toxicité, ne présentant que peu de dangers pour la santé. La classe 3 ne contient aucun solvant connu pour présenter des risques pour la santé dans le respect des limites autorisées pour les produits à usage pharmaceutique. Il n'existe cependant pas d'études relatives à une toxicité à long terme ou à un effet carcinogène pour bon nombre de solvants de la classe 3. Les données existantes indiquent qu'ils s'avèrent être moins toxiques dans les études de toxicité aiguë (à forte dose) ou à court terme, et qu'ils présentent des résultats négatifs dans les études de génotoxicité. La limite admissible pour des solvants de cette classe est inférieure ou égale à 50 mg/jour (ce qui correspond à 5000 ppm ou 0,5 % selon l'option 1), sans justification particulière. Des taux plus élevés peuvent être tolérés à condition qu'ils soient réalistes en matière de faisabilité en cours de fabrication et de bonnes pratiques de fabrication.

Tableau 3. – *Solvants de classe 3 devant être limités par les BPF ou par d'autres exigences de qualité*

| | |
|---|---|
| Acide acétique | Heptane |
| Acétone | Acétate d'isobutyle |
| Anisole | Acétate d'isopropyle |
| 1-Butanol | Acétate de méthyle |
| 2-Butanol | 3-Méthyl-1-butanol |
| Acétate de butyle | Méthyléthylcétone |
| *tert*-Butylméthyléther | Méthylisobutylcétone |
| Cumène | 2-Méthyl-l-propanol |
| Diméthylsulfoxyde | Pentane |
| Ethanol | 1-Pentanol |
| Acétate d'éthyle | 1-Propanol |
| Ether éthylique | 2-Propanol |
| Formate d'éthyle | Acétate de propyle |
| Acide formique | |

### *4.4. SOLVANTS POUR LESQUELS LES DONNÉES TOXICOLOGIQUES FONT DÉFAUT*

Les solvants ci-après désignés (tableau 4) peuvent également présenter un intérêt pour les fabricants d'excipients, de substances actives ou de médicaments. Cependant, on ne dispose pas pour l'instant des données toxicologiques adéquates qui permettraient de déterminer une EJA. Les fabricants doivent fournir les justifications relatives aux teneurs résiduelles de ces solvants dans les produits à usage pharmaceutique.

Tableau 4. – *Solvants pour lesquels les données toxicologiques font défaut*

| | |
|---|---|
| 1,1-Diéthoxypropane | Méthylisopropylcétone |
| 1,1-Diméthoxyméthane | Méthyltétrahydrofurane |
| 2,2-Diméthoxypropane | Ether de pétrole |
| Isooctane | Acide trichloracétique |
| Ether isopropylique | Acide trifluoracétique |

## GLOSSAIRE

*Carcinogènes génotoxiques* : carcinogènes qui provoquent un cancer et atteignent les gènes ou les chromosomes.

*LOEL* : abréviation de « *lowest-observed effect level* ».

*Lowest-observed effect level* : dans le cadre d'une étude ou d'un groupe d'études, il s'agit de la plus faible dose de substance à l'origine d'augmentations sensibles d'un point de vue biologique, de la fréquence ou de la gravité d'un quelconque effet chez l'homme ou l'animal (« dose effective minimale »).

*Facteur de modification* : facteur déterminé par un toxicologue professionnel et appliqué aux résultats d'un dosage biologique pour obtenir la relation avec les données chez l'homme dans des conditions de sécurité satisfaisante.

*Neurotoxicité* : capacité d'une substance à provoquer des effets indésirables sur le système nerveux.

*NOEL* : abréviation de « *no-observed-effect level* ».

*No-observed-effect level* : dose de substance la plus forte pour laquelle on ne constate pas d'augmentations sensibles d'un point de vue biologique de la fréquence ou de la gravité d'un quelconque effet chez l'homme ou l'animal (« dose sans effet observable »).

*EJA* : abréviation de « exposition journalière admissible » (en anglais PDE = *permitted daily exposure*)

*Exposition journalière admissible* : dose maximale journalière de solvant résiduel admise dans un produit à usage pharmaceutique.

*Toxicité réversible* : disparition des effets nuisibles initialement causés par une substance, lorsque celle-ci n'est plus administrée.

*Carcinogène humain fortement suspecté* : substance pour laquelle les preuves épidémiologiques de carcinogenèse n'ont pu être établies, bien qu'il existe des données génotoxiques positives et des preuves évidentes de carcinogenèse chez les rongeurs.

*Tératogénicité* : apparition de malformations structurelles au cours du développement foetal lorsqu'une substance est administrée pendant la grossesse.

## ANNEXE 1. LISTE DES SOLVANTS INCLUS DANS CETTE NOTE EXPLICATIVE

| **Solvant** | **Autres désignations** | **Formule chimique** | **Classe** |
|---|---|---|---|
| Acide acétique | Acide éthanoïque | $CH_3COOH$ | Classe 3 |
| Acétone | 2-Propanone<br>Propan-2-one | $CH_3COCH_3$ | Classe 3 |
| Acétonitrile | | $CH_3CN$ | Classe 2 |
| Anisole | Méthoxybenzène | | Classe 3 |
| Benzène | Benzol | | Classe 1 |
| 1-Butanol | Alcool *n*-butylique<br>Butan-1-ol | $CH_3[CH_2]_3OH$ | Classe 3 |
| 2-Butanol | Alcool *sec*-butylique<br>Butan-2-ol | $CH_3CH_2CH(OH)CH_3$ | Classe 3 |
| Acétate de butyle | Ester butylique de l'acide acétique | $CH_3COO[CH_2]_3CH_3$ | Classe 3 |
| *tert*-Butylméthyléther | 2-Méthoxy-2-méthylpropane | $(CH_3)_3C\text{-}OCH_3$ | Classe 3 |
| Tétrachlorure de carbone | Tétrachlorométhane | $CCl_4$ | Classe 1 |
| Chlorobenzène | | | Classe 2 |
| Chloroforme | Trichlorométhane | $CHCl_3$ | Classe 2 |
| Cumène | Isopropylbenzène<br>(1-Méthyléthyl)benzène | | Classe 3 |
| Cyclohexane | Hexaméthylène | | Classe 2 |
| 1,2-Dichloroéthane | *sym*-Dichloroéthane<br>Dichlorure d'éthylène<br>Chlorure d'éthylène | $CH_2ClCH_2Cl$ | Classe 1 |
| 1,1-Dichloroéthène | 1,1-Dichloroéthylène<br>Chlorure de vinylidène | $H_2C{=}CCl_2$ | Classe 1 |
| 1,2-Dichloroéthène | 1,2-Dichloroéthylène<br>Dichlorure d'acéthylène | $ClHC{=}CHCl$ | Classe 2 |
| Dichlorométhane | Chlorure de méthylène | $CH_2Cl_2$ | Classe 2 |
| 1,2-Diméthoxyéthane | Ethylèneglycol diméthyl éther<br>Monoglyme<br>Diméthyl cellosolve | $H_3COCH_2CH_2OCH_3$ | Classe 2 |
| *N,N*-Diméthylacétamide | DMA | $CH_3CON(CH_3)_2$ | Classe 2 |
| *N,N*-Diméthylformamide | DMF | $HCON(CH_3)_2$ | Classe 2 |
| Diméthylsulfoxide | Méthylsulfinylméthane<br>Sulfoxyde de méthyle<br>DMSO | $(CH_3)_2SO$ | Classe 3 |
| 1,4-Dioxane | *p*-Dioxane<br>[1,4]Dioxane | | Classe 2 |
| Ethanol | Alcool éthylique | $CH_3CH_2OH$ | Classe 3 |
| 2-Ethoxyéthanol | Cellosolve | $CH_3CH_2OCH_2CH_2OH$ | Classe 2 |
| Acétate d'éthyle | Ester éthylique de l'acide acétique | $CH_3COOCH_2CH_3$ | Classe 3 |
| Ethylèneglycol | 1,2-Dihydroxyéthane<br>1,2-Ethanediol | $HOCH_2CH_2OH$ | Classe 2 |
| Ether éthylique | Ether diéthylique<br>Ethoxyéthane<br>1,1′-Oxybiséthane | $CH_3CH_2OCH_2CH_3$ | Classe 3 |
| Formate d'éthyle | Ester éthylique de l'acide formique | $HCOOCH_2CH_3$ | Classe 3 |
| Formamide | Méthanamide | $HCONH_2$ | Classe 2 |

| **Solvant** | **Autres désignations** | **Formule chimique** | **Classe** |
|---|---|---|---|
| Acide formique | | HCOOH | Classe 3 |
| Heptane | *n*-Heptane | $CH_3[CH_2]_5CH_3$ | Classe 3 |
| Hexane | *n*-Hexane | $CH_3[CH_2]_4CH_3$ | Classe 2 |
| Acétate d'isobutyle | Ester isobutylique de l'acide acétique | $CH_3COOCH_2CH(CH_3)_2$ | Classe 3 |
| Acétate d'isopropyle | Ester isopropylique de l'acide acétique | $CH_3COOCH(CH_3)_2$ | Classe 3 |
| Méthanol | Alcool méthylique | $CH_3OH$ | Classe 2 |
| 2-Methoxyéthanol | Méthyl cellosolve | $CH_3OCH_2CH_2OH$ | Classe 2 |
| Acétate de méthyle | Ester méthylique de l'acide acétique | $CH_3COOCH_3$ | Classe 3 |
| 3-Méthyl-1-butanol | Alcool isoamylique<br>Alcool isopentylique<br>3-Méthylbutan-1-ol | $(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$ | Classe 3 |
| Méthylbutylcétone | 2-Hexanone<br>Hexan-2-one | $CH_3[CH_2]_3COCH_3$ | Classe 2 |
| Méthylcyclohexane | Cyclohexylméthane | $CH_3$ | Classe 2 |
| Méthyléthylcétone | 2-Butanone<br>MEK<br>Butan-2-one | $CH_3CH_2COCH_3$ | Classe 3 |
| Méthylisobutylcétone | 4-Méthylpentan-2-one<br>4-Méthyl-2-pentanone<br>MIBK | $CH_3COCH_2CH(CH_3)_2$ | Classe 3 |
| 2-Méthyl-1-propanol | Alcool isobutylique<br>2-Méthylpropan-1-ol | $(CH_3)_2CHCH_2OH$ | Classe 3 |
| *N*-Méthylpyrrolidone | 1-Méthylpyrrolidin-2-one<br>1-Méthyl-2-pyrrolidinone | $CH_3$ N O | Classe 2 |
| Nitrométhane | | $CH_3NO_2$ | Classe 2 |
| Pentane | *n*-Pentane | $CH_3[CH_2]_3CH_3$ | Classe 3 |
| 1-Pentanol | Alcool amylique<br>Pentan-1-ol<br>Alcool pentylique | $CH_3[CH_2]_3CH_2OH$ | Classe 3 |
| 1-Propanol | Propan-1-ol<br>Alcool propylique | $CH_3CH_2CH_2OH$ | Classe 3 |
| 2-Propanol | Propan-2-ol<br>Alcool isopropylique | $(CH_3)_2CHOH$ | Classe 3 |
| Acétate de propyle | Ester propylique de l'acide acétique | $CH_3COOCH_2CH_2CH_3$ | Classe 3 |
| Pyridine | | N | Classe 2 |
| Sulfonane | 1,1-Dioxyde de tétrahydrothiophène | O O S | Classe 2 |
| Tétrahydrofurane | Oxyde de tétraméthylène<br>Oxacyclopentane | O | Classe 2 |
| Tétraline | 1,2,3,4-Tétrahydronaphthalène | | Classe 2 |
| Toluène | Méthylbenzène | $CH_3$ | Classe 2 |
| 1,1,1-Trichloroéthane | Méthylchloroforme | $CH_3CCl_3$ | Classe 1 |
| 1,1,2-Trichloroéthène | Trichloroéthène | $HClC{=}CCl_2$ | Classe 2 |
| Xylène* | Dimethybenzène<br>Xylol | $CH_3$ $H_3C$ | Classe 2 |

*habituellement 60 pour cent de *m*-xylène, 14 pour cent de *p*-xylène, 9 pour cent d'*o*-xylène avec 17 pour cent d'éthylbenzène.

ANNEXE 2. INFORMATIONS COMPLÉMENTAIRES

*A2.1. RÉGLEMENTATION : SOLVANTS ORGANIQUES VOLATILS ET ENVIRONNEMENT*

Un certain nombre des solvants résiduels couramment utilisés dans la fabrication de produits à usage pharmaceutique, sont considérés comme des substances toxiques dans les monographies EHC relatives aux critères de santé et d'environnement (*Environmental Health Criteria*) et dans le système IRIS (*Integrated Risk Information System*). Les objectifs des organismes tels que l'*International Programme on Chemical Safety* (IPCS), l'*United States Environmental Protection Agency* (USEPA) et l'*United States Food and Drug Administration* (USFDA) comprennent la détermination des taux d'exposition admissibles. Le but de cette détermination est de protéger la santé publique et de préserver l'environnement contre les éventuels effets nocifs de ces substances liés à une exposition de longue durée dans le milieu environnant. Les méthodes utilisées pour l'évaluation des limites maximales d'exposition sans effets nocifs reposent généralement sur des études menées à long terme. Si on ne dispose pas de résultats d'études à long terme, les résultats obtenus sur des études à court terme peuvent être exploités à condition que certains paramètres soient modifiés (l'utilisation de facteurs de sécurité plus élevés, par exemple). L'approche décrite ci-après repose sur une *exposition à long terme ou à vie de la population* dans son milieu environnant, à savoir l'air ambiant, l'alimentation, l'eau potable ainsi que d'autres milieux.

*A2.2. SOLVANTS RÉSIDUELS DANS LES PRODUITS PHARMACEUTIQUES*

Les limites d'exposition contenues dans cette note explicative sont définies à partir de méthodes et de données de toxicité présentées dans les monographies de l'EHC et de l'IRIS. Lors de l'établissement de telles limites, il convient toutefois de tenir compte de postulats particuliers, relatifs aux résidus des solvants utilisés dans la synthèse et la fabrication de produits à usage pharmaceutique. Ces postulats sont les suivants :

1) Seuls des patients (et non la population au sens large du terme) utilisent des produits à usage pharmaceutique dans le but de se soigner ou de prévenir des infections ou des maladies.

2) Pour la plupart des produits à usage pharmaceutique, le principe d'une exposition à vie du patient n'est pas nécessaire, mais peut servir d'hypothèse de travail visant à réduire les risques pour la santé.

3) Les solvants résiduels entrent inévitablement dans la fabrication de produits à usage pharmaceutique et font souvent partie intégrante de médicaments.

4) Exception faite de cas très particuliers, la teneur en solvants résiduels ne doit pas dépasser les limites prescrites.

5) Les résultats des études toxicologiques utilisées pour déterminer les teneurs acceptables en solvants résiduels doivent être issus de protocoles expérimentaux appropriés, tels que ceux décrits par l'OCDE et le « *Red Book* » de la FDA.

ANNEXE 3. MÉTHODES RELATIVES À L'ÉTABLISSEMENT DE LIMITES D'EXPOSITION

La méthode de Gaylor-Kodell, relative à l'évaluation du risque (*Gaylor, D. W. and Kodell, R.L. : Linear Interpolation algorithm for low dose assessment of toxic substance. J. Environ. Pathology, 4, 305, 1980*), est appropriée aux solvants carcinogènes de classe 1. Dans l'établissement de limites d'exposition, seules des données carcinogènes fiables peuvent justifier une extrapolation par application de modèles mathématiques. Les limites d'exposition applicables aux solvants de la classe 1 peuvent être déterminées en combinant des facteurs de sécurité élevés (ex. 10 000 à 100 000) et les données de *no-observed-effect level* (NOEL). La détection et la quantification de ces solvants doivent répondre aux derniers développements en matière de techniques analytiques.

Les taux d'exposition acceptables présentés dans cette note pour les solvants de la classe 2 ont été établis après calcul des valeurs d'EJA, selon les procédés permettant d'établir les limites applicables aux produits d'usage pharmaceutique (*Pharmacopeial Forum, Nov-Dec 1989*), et la méthode adoptée par l'IPCS pour l'évaluation du risque présenté par les substances chimiques (*Assessing Human Health Risk of Chemicals - Environmental Health Criteria 170, WHO, 1994*). Ces méthodes sont semblables à celles utilisées par l'USEPA (IRIS), l'USFDA (*Red Book*) et par d'autres organismes. La méthode est présentée dans l'objectif de faire comprendre l'origine des valeurs d'EJA. Il est inutile d'effectuer ces calculs pour utiliser les valeurs EJA indiquées au point 4 du présent document.

L'EJA est calculée à partir du *no-observed-effect level* (NOEL), ou encore du *lowest-observed effect level* (LOEL), obtenus dans l'étude la plus pertinente réalisée sur les animaux, à l'aide de l'expression :

$$\mathrm{EJA} = \frac{\mathrm{NOEL} \times \text{Ajustement pondéral}}{\mathrm{F1} \times \mathrm{F2} \times \mathrm{F3} \times \mathrm{F4} \times \mathrm{F5}}$$

Idéalement, l'EJA est dérivée du NOEL. Si le NOEL ne peut être obtenu, le LOEL peut être utilisé. Les facteurs de modification proposés ci-après, qui permettent d'appliquer aux êtres humains les données obtenues, s'apparentent aux « facteurs d'incertitude » utilisés dans les EHC (*Environmental Health Criteria 170, World Health Organisation, Geneva, 1994*), et aux « facteurs de modification » ou « facteurs de sécurité » mentionnés dans le *Pharmacopoeial Forum*. L'hypothèse d'une exposition systémique de 100 % est utilisée dans tous les calculs, sans distinction entre les différentes voies d'administration.

Les facteurs de modification sont les suivants :

F1 = un facteur permettant l'extrapolation entre les espèces

- F1 = 2 pour le passage du chien à l'homme
- F1 = 2,5 pour le passage du lapin à l'homme
- F1 = 3 pour le passage du singe à l'homme
- F1 = 5 pour le passage du rat à l'homme
- F1 = 10 pour le passage des autres animaux à l'homme
- F1 = 12 pour le passage de la souris à l'homme

F1 permet de prendre en compte les rapports comparatifs surface/masse corporelles pour les espèces concernées et pour l'homme. La surface (*S*) se calcule à l'aide de l'équation suivante :

$$S = km^{0,67}$$

où *m* correspond à la masse corporelle et *k* est une constante dont la valeur est fixée à 10. Les masses corporelles utilisées dans l'équation sont présentées dans le tableau A 3.-1 ci-après.

Tableau A 3.-1. – *Valeurs utilisées pour les calculs présentés dans ce document*

| | |
|---|---|
| Masse corporelle du rat : | 425 g |
| Masse corporelle d'une ratte gestante : | 330 g |
| Masse corporelle de la souris : | 28 g |
| Masse corporelle d'une souris gestante : | 30 g |
| Masse corporelle du cobaye : | 500 g |
| Masse corporelle du macaque Rhésus : | 2,5 kg |
| Masse corporelle du lapin (gestante ou non) : | 4 kg |
| Masse corporelle du chien beagle : | 11,5 kg |
| Volume respiratoire du rat : | 290 L/jour |

| | |
|---|---|
| Volume respiratoire de la souris : | 43 L/jour |
| Volume respiratoire du lapin : | 1440 L/jour |
| Volume respiratoire du cobaye : | 430 L/jour |
| Volume respiratoire d'un humain : | 28 800 L/jour |
| Volume respiratoire du chien : | 9000 L/jour |
| Volume respiratoire du singe : | 1150 L/jour |
| Consommation en eau de la souris : | 5 mL/jour |
| Consommation en eau du rat : | 30 mL/jour |
| Consommation alimentaire du rat : | 30 g/jour |

F2 = 10 et représente le facteur qui tient compte de la variabilité entre les individus. En règle générale, un facteur de 10 est indiqué pour l'ensemble des solvants organiques. Cette valeur est d'ailleurs systématiquement appliquée dans la présente note.

F3 = un facteur variable qui correspond aux études de toxicité relatives à une exposition à court terme.

- F3 = 1 pour des études dont la durée correspond au moins à une demi-longévité (1 an pour les rongeurs ou les lapins ; 7 ans pour les chats, les chiens et les singes).
- F3 = 1 pour les études relatives à la reproduction, au cours desquelles toute la période de l'organogénèse est couverte.
- F3 = 2 pour une étude de 6 mois sur les rongeurs ou de 3,5 ans sur les non rongeurs.
- F3 = 5 pour une étude de 3 mois sur les rongeurs ou de 2 ans sur les non rongeurs.
- F3 = 10 pour des études de plus courte durée.

Dans tous les cas de figures, le facteur le plus élevé a été retenu pour les études dont la durée se situe entre le début et la fin de la période déterminée, par ex. un facteur de 2 pour une étude de 9 mois sur les rongeurs.

F4 = un facteur qui peut être utilisé dans tous les cas de toxicité majeure, par ex. carcinogénécité non génotoxique, neurotoxicité ou tératogénicité. Dans les études de toxicité liée à la reproduction, il convient d'utiliser les facteurs ci-après indiqués :

- F4 = 1 pour la toxicité qui concerne le foetus et la mère
- F4 = 5 pour la toxicité qui concerne le foetus sans la mère
- F4 = 5 pour un effet tératogène avec effet toxique pour la mère
- F4 = 10 pour un effet tératogène sans effet toxique pour la mère

F5 = un facteur variable pouvant être utilisé si la dose sans effet (*no-effect level*) n'a pas été établie.

Lorsque le LOEL est seul disponible, un facteur pouvant aller jusqu'à 10, en fonction de la gravité de la toxicité, peut être utilisé.

L'ajustement pondéral se fonde sur une masse corporelle arbitraire de 50 kg pour un adulte de sexe masculin ou féminin. Ce poids, relativement faible, fournit une marge de sécurité supplémentaire par rapport au poids standard de 60 kg ou 70 kg, souvent utilisé dans ce type de calcul. On considère que l'accumulation des facteurs de sécurité dans la détermination de l'EJA permet de couvrir la catégorie des patients adultes dont le poids corporel est inférieur à 50 kg. Si le solvant est présent dans un médicament réservé à un usage pédiatrique, il est indiqué de procéder à un ajustement pondéral (poids inférieur).

Pour illustrer l'application de cette équation, prenons à titre d'exemple une étude de toxicité de l'acétonitrile chez la souris, qui est présentée dans le supplément d'avril 1997 de *Pharmeuropa*, Vol. 9, No. 1, page S24 (version anglaise). Le NOEL est estimé à 50,7 mg $kg^{-1}$ $jour^{-1}$. Dans ce cas particulier, l'EJA à l'acétonitrile est calculée comme suit :

$$\text{EJA} = \frac{50,7\text{mg kg}^{-1}\text{ jour}^{-1} \times 50\text{ kg}}{12 \times 10 \times 5 \times 1 \times 1} = 4,22\text{ mg jour}^{-1}$$

Dans cet exemple,

- F1 = 12 pour tenir compte de l'extrapolation de la souris à l'homme
- F2 = 10 pour tenir compte des différences entre les individus
- F3 = 5 car la durée de l'étude est limitée à 13 semaines seulement
- F4 = 1 car aucune toxicité grave n'est apparue
- F5 = 1 car la dose sans effet (*no-effect level*) a été déterminée

En ce qui concerne les concentrations de gaz utilisées dans les études d'inhalation, l'équation des gaz parfaits, $PV = nRT$, permet de convertir les unités ppm en unités de type mg/L ou mg/$m^3$. A titre d'exemple, l'étude de toxicité relative à la reproduction chez le rat par inhalation de tétrachlorure de carbone (masse moléculaire 153,84) est présentée dans le supplément d'avril 1997 de *Pharmeuropa*, Vol. 9, No. 1, page S9 .

$$\frac{n}{V} = \frac{P}{\text{R}T} = \frac{300 \times 10^{-6}\text{ atm} \times 153\,840\text{ mg mol}^{-1}}{0,082\text{ L atm K}^{-1}\text{mol}^{-1} \times 298\text{ K}}$$

$$= \frac{46,15\text{ mg}}{24,45\text{ L}} = 1,89\text{ mg/L}$$

La correspondance 1000 L = 1 $m^3$ est utilisée pour convertir le résultat en mg/$m^3$.

5. Textes généraux

# 5.5. TABLES ALCOOMÉTRIQUES

01/2008:50500

# 5.5. TABLES ALCOOMÉTRIQUES

La formule générale fixée par le Conseil des Communautés Européennes dans ses directives du 27 juillet 1976 sur l'alcoométrie, a servi de base pour établir les tables ci-après.

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m$^3$) |
|---|---|---|
| 0,0 | 0,0 | 998,20 |
| 0,1 | 0,08 | 998,05 |
| 0,2 | 0,16 | 997,90 |
| 0,3 | 0,24 | 997,75 |
| 0,4 | 0,32 | 997,59 |
| 0,5 | 0,40 | 997,44 |
| 0,6 | 0,47 | 997,29 |
| 0,7 | 0,55 | 997,14 |
| 0,8 | 0,63 | 996,99 |
| 0,9 | 0,71 | 996,85 |
| 1,0 | 0,79 | 996,70 |
| 1,1 | 0,87 | 996,55 |
| 1,2 | 0,95 | 996,40 |
| 1,3 | 1,03 | 996,25 |
| 1,4 | 1,11 | 996,11 |
| 1,5 | 1,19 | 995,96 |
| 1,6 | 1,27 | 995,81 |
| 1,7 | 1,35 | 995,67 |
| 1,8 | 1,43 | 995,52 |
| 1,9 | 1,51 | 995,38 |
| 2,0 | 1,59 | 995,23 |
| 2,1 | 1,67 | 995,09 |
| 2,2 | 1,75 | 994,94 |
| 2,3 | 1,82 | 994,80 |
| 2,4 | 1,90 | 994,66 |
| 2,5 | 1,98 | 994,51 |
| 2,6 | 2,06 | 994,37 |
| 2,7 | 2,14 | 994,23 |
| 2,8 | 2,22 | 994,09 |
| 2,9 | 2,30 | 993,95 |
| 3,0 | 2,38 | 993,81 |
| 3,1 | 2,46 | 993,66 |
| 3,2 | 2,54 | 993,52 |
| 3,3 | 2,62 | 993,38 |
| 3,4 | 2,70 | 993,24 |
| 3,5 | 2,78 | 993,11 |
| 3,6 | 2,86 | 992,97 |
| 3,7 | 2,94 | 992,83 |
| 3,8 | 3,02 | 992,69 |
| 3,9 | 3,10 | 992,55 |
| 4,0 | 3,18 | 992,41 |
| 4,1 | 3,26 | 992,28 |
| 4,2 | 3,34 | 992,14 |
| 4,3 | 3,42 | 992,00 |
| 4,4 | 3,50 | 991,87 |
| 4,5 | 3,58 | 991,73 |
| 4,6 | 3,66 | 991,59 |
| 4,7 | 3,74 | 991,46 |
| 4,8 | 3,82 | 991,32 |
| 4,9 | 3,90 | 991,19 |
| 5,0 | 3,98 | 991,06 |
| 5,1 | 4,06 | 990,92 |
| 5,2 | 4,14 | 990,79 |
| 5,3 | 4,22 | 990,65 |
| 5,4 | 4,30 | 990,52 |
| 5,5 | 4,38 | 990,39 |
| 5,6 | 4,46 | 990,26 |
| 5,7 | 4,54 | 990,12 |
| 5,8 | 4,62 | 989,99 |
| 5,9 | 4,70 | 989,86 |
| 6,0 | 4,78 | 989,73 |
| 6,1 | 4,86 | 989,60 |
| 6,2 | 4,95 | 989,47 |
| 6,3 | 5,03 | 989,34 |
| 6,4 | 5,11 | 989,21 |
| 6,5 | 5,19 | 989,08 |
| 6,6 | 5,27 | 988,95 |
| 6,7 | 5,35 | 988,82 |
| 6,8 | 5,43 | 988,69 |
| 6,9 | 5,51 | 988,56 |
| 7,0 | 5,59 | 988,43 |
| 7,1 | 5,67 | 988,30 |
| 7,2 | 5,75 | 988,18 |
| 7,3 | 5,83 | 988,05 |
| 7,4 | 5,91 | 987,92 |
| 7,5 | 5,99 | 987,79 |
| 7,6 | 6,07 | 987,67 |
| 7,7 | 6,15 | 987,54 |
| 7,8 | 6,23 | 987,42 |
| 7,9 | 6,32 | 987,29 |
| 8,0 | 6,40 | 987,16 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m³) |
|---|---|---|
| 8,1 | 6,48 | 987,04 |
| 8,2 | 6,56 | 986,91 |
| 8,3 | 6,64 | 986,79 |
| 8,4 | 6,72 | 986,66 |
| 8,5 | 6,80 | 986,54 |
| 8,6 | 6,88 | 986,42 |
| 8,7 | 6,96 | 986,29 |
| 8,8 | 7,04 | 986,17 |
| 8,9 | 7,12 | 986,05 |
| 9,0 | 7,20 | 985,92 |
| 9,1 | 7,29 | 985,80 |
| 9,2 | 7,37 | 985,68 |
| 9,3 | 7,45 | 985,56 |
| 9,4 | 7,53 | 985,44 |
| 9,5 | 7,61 | 985,31 |
| 9,6 | 7,69 | 985,19 |
| 9,7 | 7,77 | 985,07 |
| 9,8 | 7,85 | 984,95 |
| 9,9 | 7,93 | 984,83 |
| 10,0 | 8,01 | 984,71 |
| 10,1 | 8,10 | 984,59 |
| 10,2 | 8,18 | 984,47 |
| 10,3 | 8,26 | 984,35 |
| 10,4 | 8,34 | 984,23 |
| 10,5 | 8,42 | 984,11 |
| 10,6 | 8,50 | 983,99 |
| 10,7 | 8,58 | 983,88 |
| 10,8 | 8,66 | 983,76 |
| 10,9 | 8,75 | 983,64 |
| 11,0 | 8,83 | 983,52 |
| 11,1 | 8,91 | 983,40 |
| 11,2 | 8,99 | 983,29 |
| 11,3 | 9,07 | 983,17 |
| 11,4 | 9,15 | 983,05 |
| 11,5 | 9,23 | 982,94 |
| 11,6 | 9,32 | 982,82 |
| 11,7 | 9,40 | 982,70 |
| 11,8 | 9,48 | 982,59 |
| 11,9 | 9,56 | 982,47 |
| 12,0 | 9,64 | 982,35 |
| 12,1 | 9,72 | 982,24 |
| 12,2 | 9,80 | 982,12 |
| 12,3 | 9,89 | 982,01 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m³) |
|---|---|---|
| 12,4 | 9,97 | 981,89 |
| 12,5 | 10,05 | 981,78 |
| 12,6 | 10,13 | 981,67 |
| 12,7 | 10,21 | 981,55 |
| 12,8 | 10,29 | 981,44 |
| 12,9 | 10,37 | 981,32 |
| 13,0 | 10,46 | 981,21 |
| 13,1 | 10,54 | 981,10 |
| 13,2 | 10,62 | 980,98 |
| 13,3 | 10,70 | 980,87 |
| 13,4 | 10,78 | 980,76 |
| 13,5 | 10,87 | 980,64 |
| 13,6 | 10,95 | 980,53 |
| 13,7 | 11,03 | 980,42 |
| 13,8 | 11,11 | 980,31 |
| 13,9 | 11,19 | 980,19 |
| 14,0 | 11,27 | 980,08 |
| 14,1 | 11,36 | 979,97 |
| 14,2 | 11,44 | 979,86 |
| 14,3 | 11,52 | 979,75 |
| 14,4 | 11,60 | 979,64 |
| 14,5 | 11,68 | 979,52 |
| 14,6 | 11,77 | 979,41 |
| 14,7 | 11,85 | 979,30 |
| 14,8 | 11,93 | 979,19 |
| 14,9 | 12,01 | 979,08 |
| 15,0 | 12,09 | 978,97 |
| 15,1 | 12,17 | 978,86 |
| 15,2 | 12,26 | 978,75 |
| 15,3 | 12,34 | 978,64 |
| 15,4 | 12,42 | 978,53 |
| 15,5 | 12,50 | 978,42 |
| 15,6 | 12,59 | 978,31 |
| 15,7 | 12,67 | 978,20 |
| 15,8 | 12,75 | 978,09 |
| 15,9 | 12,83 | 977,98 |
| 16,0 | 12,91 | 977,87 |
| 16,1 | 13,00 | 977,76 |
| 16,2 | 13,08 | 977,65 |
| 16,3 | 13,16 | 977,55 |
| 16,4 | 13,24 | 977,44 |
| 16,5 | 13,32 | 977,33 |
| 16,6 | 13,41 | 977,22 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m$^3$) |
|---|---|---|
| 16,7 | 13,49 | 977,11 |
| 16,8 | 13,57 | 977,00 |
| 16,9 | 13,65 | 976,89 |
| 17,0 | 13,74 | 976,79 |
| 17,1 | 13,82 | 976,68 |
| 17,2 | 13,90 | 976,57 |
| 17,3 | 13,98 | 976,46 |
| 17,4 | 14,07 | 976,35 |
| 17,5 | 14,15 | 976,25 |
| 17,6 | 14,23 | 976,14 |
| 17,7 | 14,31 | 976,03 |
| 17,8 | 14,40 | 975,92 |
| 17,9 | 14,48 | 975,81 |
| 18,0 | 14,56 | 975,71 |
| 18,1 | 14,64 | 975,60 |
| 18,2 | 14,73 | 975,49 |
| 18,3 | 14,81 | 975,38 |
| 18,4 | 14,89 | 975,28 |
| 18,5 | 14,97 | 975,17 |
| 18,6 | 15,06 | 975,06 |
| 18,7 | 15,14 | 974,95 |
| 18,8 | 15,22 | 974,85 |
| 18,9 | 15,30 | 974,74 |
| 19,0 | 15,39 | 974,63 |
| 19,1 | 15,47 | 974,52 |
| 19,2 | 15,55 | 974,42 |
| 19,3 | 15,63 | 974,31 |
| 19,4 | 15,72 | 974,20 |
| 19,5 | 15,80 | 974,09 |
| 19,6 | 15,88 | 973,99 |
| 19,7 | 15,97 | 973,88 |
| 19,8 | 16,05 | 973,77 |
| 19,9 | 16,13 | 973,66 |
| 20,0 | 16,21 | 973,56 |
| 20,1 | 16,30 | 973,45 |
| 20,2 | 16,38 | 973,34 |
| 20,3 | 16,46 | 973,24 |
| 20,4 | 16,55 | 973,13 |
| 20,5 | 16,63 | 973,02 |
| 20,6 | 16,71 | 972,91 |
| 20,7 | 16,79 | 972,80 |
| 20,8 | 16,88 | 972,70 |
| 20,9 | 16,96 | 972,59 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m$^3$) |
|---|---|---|
| 21,0 | 17,04 | 972,48 |
| 21,1 | 17,13 | 972,37 |
| 21,2 | 17,21 | 972,27 |
| 21,3 | 17,29 | 972,16 |
| 21,4 | 17,38 | 972,05 |
| 21,5 | 17,46 | 971,94 |
| 21,6 | 17,54 | 971,83 |
| 21,7 | 17,62 | 971,73 |
| 21,8 | 17,71 | 971,62 |
| 21,9 | 17,79 | 971,51 |
| 22,0 | 17,87 | 971,40 |
| 22,1 | 17,96 | 971,29 |
| 22,2 | 18,04 | 971,18 |
| 22,3 | 18,12 | 971,08 |
| 22,4 | 18,21 | 970,97 |
| 22,5 | 18,29 | 970,86 |
| 22,6 | 18,37 | 970,75 |
| 22,7 | 18,46 | 970,64 |
| 22,8 | 18,54 | 970,53 |
| 22,9 | 18,62 | 970,42 |
| 23,0 | 18,71 | 970,31 |
| 23,1 | 18,79 | 970,20 |
| 23,2 | 18,87 | 970,09 |
| 23,3 | 18,96 | 969,98 |
| 23,4 | 19,04 | 969,87 |
| 23,5 | 19,13 | 969,76 |
| 23,6 | 19,21 | 969,65 |
| 23,7 | 19,29 | 969,54 |
| 23,8 | 19,38 | 969,43 |
| 23,9 | 19,46 | 969,32 |
| 24,0 | 19,54 | 969,21 |
| 24,1 | 19,63 | 969,10 |
| 24,2 | 19,71 | 968,99 |
| 24,3 | 19,79 | 968,88 |
| 24,4 | 19,88 | 968,77 |
| 24,5 | 19,96 | 968,66 |
| 24,6 | 20,05 | 968,55 |
| 24,7 | 20,13 | 968,43 |
| 24,8 | 20,21 | 968,32 |
| 24,9 | 20,30 | 968,21 |
| 25,0 | 20,38 | 968,10 |
| 25,1 | 20,47 | 967,99 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m$^3$) |
|---|---|---|
| 25,2 | 20,55 | 967,87 |
| 25,3 | 20,63 | 967,76 |
| 25,4 | 20,72 | 967,65 |
| 25,5 | 20,80 | 967,53 |
| 25,6 | 20,88 | 967,42 |
| 25,7 | 20,97 | 967,31 |
| 25,8 | 21,05 | 967,19 |
| 25,9 | 21,14 | 967,08 |
| 26,0 | 21,22 | 966,97 |
| 26,1 | 21,31 | 966,85 |
| 26,2 | 21,39 | 966,74 |
| 26,3 | 21,47 | 966,62 |
| 26,4 | 21,56 | 966,51 |
| 26,5 | 21,64 | 966,39 |
| 26,6 | 21,73 | 966,28 |
| 26,7 | 21,81 | 966,16 |
| 26,8 | 21,90 | 966,05 |
| 26,9 | 21,98 | 965,93 |
| 27,0 | 22,06 | 965,81 |
| 27,1 | 22,15 | 965,70 |
| 27,2 | 22,23 | 965,58 |
| 27,3 | 22,32 | 965,46 |
| 27,4 | 22,40 | 965,35 |
| 27,5 | 22,49 | 965,23 |
| 27,6 | 22,57 | 965,11 |
| 27,7 | 22,65 | 964,99 |
| 27,8 | 22,74 | 964,88 |
| 27,9 | 22,82 | 964,76 |
| 28,0 | 22,91 | 964,64 |
| 28,1 | 22,99 | 964,52 |
| 28,2 | 23,08 | 964,40 |
| 28,3 | 23,16 | 964,28 |
| 28,4 | 23,25 | 964,16 |
| 28,5 | 23,33 | 964,04 |
| 28,6 | 23,42 | 963,92 |
| 28,7 | 23,50 | 963,80 |
| 28,8 | 23,59 | 963,68 |
| 28,9 | 23,67 | 963,56 |
| 29,0 | 23,76 | 963,44 |
| 29,1 | 23,84 | 963,32 |
| 29,2 | 23,93 | 963,20 |
| 29,3 | 24,01 | 963,07 |
| 29,4 | 24,10 | 962,95 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m$^3$) |
|---|---|---|
| 29,5 | 24,18 | 962,83 |
| 29,6 | 24,27 | 962,71 |
| 29,7 | 24,35 | 962,58 |
| 29,8 | 24,44 | 962,46 |
| 29,9 | 24,52 | 962,33 |
| 30,0 | 24,61 | 962,21 |
| 30,1 | 24,69 | 962,09 |
| 30,2 | 24,78 | 961,96 |
| 30,3 | 24,86 | 961,84 |
| 30,4 | 24,95 | 961,71 |
| 30,5 | 25,03 | 961,59 |
| 30,6 | 25,12 | 961,46 |
| 30,7 | 25,20 | 961,33 |
| 30,8 | 25,29 | 961,21 |
| 30,9 | 25,38 | 961,08 |
| 31,0 | 25,46 | 960,95 |
| 31,1 | 25,55 | 960,82 |
| 31,2 | 25,63 | 960,70 |
| 31,3 | 25,72 | 960,57 |
| 31,4 | 25,80 | 960,44 |
| 31,5 | 25,89 | 960,31 |
| 31,6 | 25,97 | 960,18 |
| 31,7 | 26,06 | 960,05 |
| 31,8 | 26,15 | 959,92 |
| 31,9 | 26,23 | 959,79 |
| 32,0 | 26,32 | 959,66 |
| 32,1 | 26,40 | 959,53 |
| 32,2 | 26,49 | 959,40 |
| 32,3 | 26,57 | 959,27 |
| 32,4 | 26,66 | 959,14 |
| 32,5 | 26,75 | 959,01 |
| 32,6 | 26,83 | 958,87 |
| 32,7 | 26,92 | 958,74 |
| 32,8 | 27,00 | 958,61 |
| 32,9 | 27,09 | 958,47 |
| 33,0 | 27,18 | 958,34 |
| 33,1 | 27,26 | 958,20 |
| 33,2 | 27,35 | 958,07 |
| 33,3 | 27,44 | 957,94 |
| 33,4 | 27,52 | 957,80 |
| 33,5 | 27,61 | 957,66 |
| 33,6 | 27,69 | 957,53 |
| 33,7 | 27,78 | 957,39 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m$^3$) |
|---|---|---|
| 33,8 | 27,87 | 957,26 |
| 33,9 | 27,95 | 957,12 |
| 34,0 | 28,04 | 956,98 |
| 34,1 | 28,13 | 956,84 |
| 34,2 | 28,21 | 956,70 |
| 34,3 | 28,30 | 956,57 |
| 34,4 | 28,39 | 956,43 |
| 34,5 | 28,47 | 956,29 |
| 34,6 | 28,56 | 956,15 |
| 34,7 | 28,65 | 956,01 |
| 34,8 | 28,73 | 955,87 |
| 34,9 | 28,82 | 955,73 |
| 35,0 | 28,91 | 955,59 |
| 35,1 | 28,99 | 955,45 |
| 35,2 | 29,08 | 955,30 |
| 35,3 | 29,17 | 955,16 |
| 35,4 | 29,26 | 955,02 |
| 35,5 | 29,34 | 954,88 |
| 35,6 | 29,43 | 954,73 |
| 35,7 | 29,52 | 954,59 |
| 35,8 | 29,60 | 954,44 |
| 35,9 | 29,69 | 954,30 |
| 36,0 | 29,78 | 954,15 |
| 36,1 | 29,87 | 954,01 |
| 36,2 | 29,95 | 953,86 |
| 36,3 | 30,04 | 953,72 |
| 36,4 | 30,13 | 953,57 |
| 36,5 | 30,21 | 953,42 |
| 36,6 | 30,30 | 953,28 |
| 36,7 | 30,39 | 953,13 |
| 36,8 | 30,48 | 952,98 |
| 36,9 | 30,56 | 952,83 |
| 37,0 | 30,65 | 952,69 |
| 37,1 | 30,74 | 952,54 |
| 37,2 | 30,83 | 952,39 |
| 37,3 | 30,92 | 952,24 |
| 37,4 | 31,00 | 952,09 |
| 37,5 | 31,09 | 951,94 |
| 37,6 | 31,18 | 951,79 |
| 37,7 | 31,27 | 951,63 |
| 37,8 | 31,35 | 951,48 |
| 37,9 | 31,44 | 951,33 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m$^3$) |
|---|---|---|
| 38,0 | 31,53 | 951,18 |
| 38,1 | 31,62 | 951,02 |
| 38,2 | 31,71 | 950,87 |
| 38,3 | 31,79 | 950,72 |
| 38,4 | 31,88 | 950,56 |
| 38,5 | 31,97 | 950,41 |
| 38,6 | 32,06 | 950,25 |
| 38,7 | 32,15 | 950,10 |
| 38,8 | 32,24 | 949,94 |
| 38,9 | 32,32 | 949,79 |
| 39,0 | 32,41 | 949,63 |
| 39,1 | 32,50 | 949,47 |
| 39,2 | 32,59 | 949,32 |
| 39,3 | 32,68 | 949,16 |
| 39,4 | 32,77 | 949,00 |
| 39,5 | 32,86 | 948,84 |
| 39,6 | 32,94 | 948,68 |
| 39,7 | 33,03 | 948,52 |
| 39,8 | 33,12 | 948,37 |
| 39,9 | 33,21 | 948,21 |
| 40,0 | 33,30 | 948,05 |
| 40,1 | 33,39 | 947,88 |
| 40,2 | 33,48 | 947,72 |
| 40,3 | 33,57 | 947,56 |
| 40,4 | 33,66 | 947,40 |
| 40,5 | 33,74 | 947,24 |
| 40,6 | 33,83 | 947,08 |
| 40,7 | 33,92 | 946,91 |
| 40,8 | 34,01 | 946,75 |
| 40,9 | 34,10 | 946,58 |
| 41,0 | 34,19 | 946,42 |
| 41,1 | 34,28 | 946,26 |
| 41,2 | 34,37 | 946,09 |
| 41,3 | 34,46 | 945,93 |
| 41,4 | 34,55 | 945,76 |
| 41,5 | 34,64 | 945,59 |
| 41,6 | 34,73 | 945,43 |
| 41,7 | 34,82 | 945,26 |
| 41,8 | 34,91 | 945,09 |
| 41,9 | 35,00 | 944,93 |
| 42,0 | 35,09 | 944,76 |
| 42,1 | 35,18 | 944,59 |
| 42,2 | 35,27 | 944,42 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m³) |
|---|---|---|
| 42,3 | 35,36 | 944,25 |
| 42,4 | 35,45 | 944,08 |
| 42,5 | 35,54 | 943,91 |
| 42,6 | 35,63 | 943,74 |
| 42,7 | 35,72 | 943,57 |
| 42,8 | 35,81 | 943,40 |
| 42,9 | 35,90 | 943,23 |
| 43,0 | 35,99 | 943,06 |
| 43,1 | 36,08 | 942,88 |
| 43,2 | 36,17 | 942,71 |
| 43,3 | 36,26 | 942,54 |
| 43,4 | 36,35 | 942,37 |
| 43,5 | 36,44 | 942,19 |
| 43,6 | 36,53 | 942,02 |
| 43,7 | 36,62 | 941,84 |
| 43,8 | 36,71 | 941,67 |
| 43,9 | 36,80 | 941,49 |
| 44,0 | 36,89 | 941,32 |
| 44,1 | 36,98 | 941,14 |
| 44,2 | 37,07 | 940,97 |
| 44,3 | 37,16 | 940,79 |
| 44,4 | 37,25 | 940,61 |
| 44,5 | 37,35 | 940,43 |
| 44,6 | 37,44 | 940,26 |
| 44,7 | 37,53 | 940,08 |
| 44,8 | 37,62 | 939,90 |
| 44,9 | 37,71 | 939,72 |
| 45,0 | 37,80 | 939,54 |
| 45,1 | 37,89 | 939,36 |
| 45,2 | 37,98 | 939,18 |
| 45,3 | 38,08 | 939,00 |
| 45,4 | 38,17 | 938,82 |
| 45,5 | 38,26 | 938,64 |
| 45,6 | 38,35 | 938,46 |
| 45,7 | 38,44 | 938,28 |
| 45,8 | 38,53 | 938,10 |
| 45,9 | 38,62 | 937,91 |
| 46,0 | 38,72 | 937,73 |
| 46,1 | 38,81 | 937,55 |
| 46,2 | 38,90 | 937,36 |
| 46,3 | 38,99 | 937,18 |
| 46,4 | 39,08 | 937,00 |
| 46,5 | 39,18 | 936,81 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m³) |
|---|---|---|
| 46,6 | 39,27 | 936,63 |
| 46,7 | 39,36 | 936,44 |
| 46,8 | 39,45 | 936,26 |
| 46,9 | 39,54 | 936,07 |
| 47,0 | 39,64 | 935,88 |
| 47,1 | 39,73 | 935,70 |
| 47,2 | 39,82 | 935,51 |
| 47,3 | 39,91 | 935,32 |
| 47,4 | 40,00 | 935,14 |
| 47,5 | 40,10 | 934,95 |
| 47,6 | 40,19 | 934,76 |
| 47,7 | 40,28 | 934,57 |
| 47,8 | 40,37 | 934,38 |
| 47,9 | 40,47 | 934,19 |
| 48,0 | 40,56 | 934,00 |
| 48,1 | 40,65 | 933,81 |
| 48,2 | 40,75 | 933,62 |
| 48,3 | 40,84 | 933,43 |
| 48,4 | 40,93 | 933,24 |
| 48,5 | 41,02 | 933,05 |
| 48,6 | 41,12 | 932,86 |
| 48,7 | 41,21 | 932,67 |
| 48,8 | 41,30 | 932,47 |
| 48,9 | 41,40 | 932,28 |
| 49,0 | 41,49 | 932,09 |
| 49,1 | 41,58 | 931,90 |
| 49,2 | 41,68 | 931,70 |
| 49,3 | 41,77 | 931,51 |
| 49,4 | 41,86 | 931,31 |
| 49,5 | 41,96 | 931,12 |
| 49,6 | 42,05 | 930,92 |
| 49,7 | 42,14 | 930,73 |
| 49,8 | 42,24 | 930,53 |
| 49,9 | 42,33 | 930,34 |
| 50,0 | 42,43 | 930,14 |
| 50,1 | 42,52 | 929,95 |
| 50,2 | 42,61 | 929,75 |
| 50,3 | 42,71 | 929,55 |
| 50,4 | 42,80 | 929,35 |
| 50,5 | 42,90 | 929,16 |
| 50,6 | 42,99 | 928,96 |
| 50,7 | 43,08 | 928,76 |
| 50,8 | 43,18 | 928,56 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m$^3$) |
|---|---|---|
| 50,9 | 43,27 | 928,36 |
| 51,0 | 43,37 | 928,16 |
| 51,1 | 43,46 | 927,96 |
| 51,2 | 43,56 | 927,77 |
| 51,3 | 43,65 | 927,57 |
| 51,4 | 43,74 | 927,36 |
| 51,5 | 43,84 | 927,16 |
| 51,6 | 43,93 | 926,96 |
| 51,7 | 44,03 | 926,76 |
| 51,8 | 44,12 | 926,56 |
| 51,9 | 44,22 | 926,36 |
| 52,0 | 44,31 | 926,16 |
| 52,1 | 44,41 | 925,95 |
| 52,2 | 44,50 | 925,75 |
| 52,3 | 44,60 | 925,55 |
| 52,4 | 44,69 | 925,35 |
| 52,5 | 44,79 | 925,14 |
| 52,6 | 44,88 | 924,94 |
| 52,7 | 44,98 | 924,73 |
| 52,8 | 45,07 | 924,53 |
| 52,9 | 45,17 | 924,32 |
| 53,0 | 45,26 | 924,12 |
| 53,1 | 45,36 | 923,91 |
| 53,2 | 45,46 | 923,71 |
| 53,3 | 45,55 | 923,50 |
| 53,4 | 45,65 | 923,30 |
| 53,5 | 45,74 | 923,09 |
| 53,6 | 45,84 | 922,88 |
| 53,7 | 45,93 | 922,68 |
| 53,8 | 46,03 | 922,47 |
| 53,9 | 46,13 | 922,26 |
| 54,0 | 46,22 | 922,06 |
| 54,1 | 46,32 | 921,85 |
| 54,2 | 46,41 | 921,64 |
| 54,3 | 46,51 | 921,43 |
| 54,4 | 46,61 | 921,22 |
| 54,5 | 46,70 | 921,01 |
| 54,6 | 46,80 | 920,80 |
| 54,7 | 46,90 | 920,59 |
| 54,8 | 46,99 | 920,38 |
| 54,9 | 47,09 | 920,17 |
| 55,0 | 47,18 | 919,96 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m$^3$) |
|---|---|---|
| 55,1 | 47,28 | 919,75 |
| 55,2 | 47,38 | 919,54 |
| 55,3 | 47,47 | 919,33 |
| 55,4 | 47,57 | 919,12 |
| 55,5 | 47,67 | 918,91 |
| 55,6 | 47,77 | 918,69 |
| 55,7 | 47,86 | 918,48 |
| 55,8 | 47,96 | 918,27 |
| 55,9 | 48,06 | 918,06 |
| 56,0 | 48,15 | 917,84 |
| 56,1 | 48,25 | 917,63 |
| 56,2 | 48,35 | 917,42 |
| 56,3 | 48,45 | 917,20 |
| 56,4 | 48,54 | 916,99 |
| 56,5 | 48,64 | 916,77 |
| 56,6 | 48,74 | 916,56 |
| 56,7 | 48,84 | 916,35 |
| 56,8 | 48,93 | 916,13 |
| 56,9 | 49,03 | 915,91 |
| 57,0 | 49,13 | 915,70 |
| 57,1 | 49,23 | 915,48 |
| 57,2 | 49,32 | 915,27 |
| 57,3 | 49,42 | 915,05 |
| 57,4 | 49,52 | 914,83 |
| 57,5 | 49,62 | 914,62 |
| 57,6 | 49,72 | 914,40 |
| 57,7 | 49,81 | 914,18 |
| 57,8 | 49,91 | 913,97 |
| 57,9 | 50,01 | 913,75 |
| 58,0 | 50,11 | 913,53 |
| 58,1 | 50,21 | 913,31 |
| 58,2 | 50,31 | 913,09 |
| 58,3 | 50,40 | 912,87 |
| 58,4 | 50,50 | 912,65 |
| 58,5 | 50,60 | 912,43 |
| 58,6 | 50,70 | 912,22 |
| 58,7 | 50,80 | 912,00 |
| 58,8 | 50,90 | 911,78 |
| 58,9 | 51,00 | 911,55 |
| 59,0 | 51,10 | 911,33 |
| 59,1 | 51,19 | 911,11 |
| 59,2 | 51,29 | 910,89 |
| 59,3 | 51,39 | 910,67 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m$^3$) |
|---|---|---|
| 59,4 | 51,49 | 910,45 |
| 59,5 | 51,59 | 910,23 |
| 59,6 | 51,69 | 910,01 |
| 59,7 | 51,79 | 909,78 |
| 59,8 | 51,89 | 909,56 |
| 59,9 | 51,99 | 909,34 |
| 60,0 | 52,09 | 909,11 |
| 60,1 | 52,19 | 908,89 |
| 60,2 | 52,29 | 908,67 |
| 60,3 | 52,39 | 908,44 |
| 60,4 | 52,49 | 908,22 |
| 60,5 | 52,59 | 908,00 |
| 60,6 | 52,69 | 907,77 |
| 60,7 | 52,79 | 907,55 |
| 60,8 | 52,89 | 907,32 |
| 60,9 | 52,99 | 907,10 |
| 61,0 | 53,09 | 906,87 |
| 61,1 | 53,19 | 906,64 |
| 61,2 | 53,29 | 906,42 |
| 61,3 | 53,39 | 906,19 |
| 61,4 | 53,49 | 905,97 |
| 61,5 | 53,59 | 905,74 |
| 61,6 | 53,69 | 905,51 |
| 61,7 | 53,79 | 905,29 |
| 61,8 | 53,89 | 905,06 |
| 61,9 | 53,99 | 904,83 |
| 62,0 | 54,09 | 904,60 |
| 62,1 | 54,19 | 904,37 |
| 62,2 | 54,30 | 904,15 |
| 62,3 | 54,40 | 903,92 |
| 62,4 | 54,50 | 903,69 |
| 62,5 | 54,60 | 903,46 |
| 62,6 | 54,70 | 903,23 |
| 62,7 | 54,80 | 903,00 |
| 62,8 | 54,90 | 902,77 |
| 62,9 | 55,00 | 902,54 |
| 63,0 | 55,11 | 902,31 |
| 63,1 | 55,21 | 902,08 |
| 63,2 | 55,31 | 901,85 |
| 63,3 | 55,41 | 901,62 |
| 63,4 | 55,51 | 901,39 |
| 63,5 | 55,61 | 901,15 |
| 63,6 | 55,72 | 900,92 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m$^3$) |
|---|---|---|
| 63,7 | 55,82 | 900,69 |
| 63,8 | 55,92 | 900,46 |
| 63,9 | 56,02 | 900,23 |
| 64,0 | 56,12 | 899,99 |
| 64,1 | 56,23 | 899,76 |
| 64,2 | 56,33 | 899,53 |
| 64,3 | 56,43 | 899,29 |
| 64,4 | 56,53 | 899,06 |
| 64,5 | 56,64 | 898,83 |
| 64,6 | 56,74 | 898,59 |
| 64,7 | 56,84 | 898,36 |
| 64,8 | 56,94 | 898,12 |
| 64,9 | 57,05 | 897,89 |
| 65,0 | 57,15 | 897,65 |
| 65,1 | 57,25 | 897,42 |
| 65,2 | 57,36 | 897,18 |
| 65,3 | 57,46 | 896,94 |
| 65,4 | 57,56 | 896,71 |
| 65,5 | 57,67 | 896,47 |
| 65,6 | 57,77 | 896,23 |
| 65,7 | 57,87 | 896,00 |
| 65,8 | 57,98 | 895,76 |
| 65,9 | 58,08 | 895,52 |
| 66,0 | 58,18 | 895,28 |
| 66,1 | 58,29 | 895,05 |
| 66,2 | 58,39 | 894,81 |
| 66,3 | 58,49 | 894,57 |
| 66,4 | 58,60 | 894,33 |
| 66,5 | 58,70 | 894,09 |
| 66,6 | 58,81 | 893,85 |
| 66,7 | 58,91 | 893,61 |
| 66,8 | 59,01 | 893,37 |
| 66,9 | 59,12 | 893,13 |
| 67,0 | 59,22 | 892,89 |
| 67,1 | 59,33 | 892,65 |
| 67,2 | 59,43 | 892,41 |
| 67,3 | 59,54 | 892,17 |
| 67,4 | 59,64 | 891,93 |
| 67,5 | 59,74 | 891,69 |
| 67,6 | 59,85 | 891,45 |
| 67,7 | 59,95 | 891,20 |
| 67,8 | 60,06 | 890,96 |
| 67,9 | 60,16 | 890,72 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m³) |
|---|---|---|
| 68,0 | 60,27 | 890,48 |
| 68,1 | 60,37 | 890,23 |
| 68,2 | 60,48 | 889,99 |
| 68,3 | 60,58 | 889,75 |
| 68,4 | 60,69 | 889,50 |
| 68,5 | 60,80 | 889,26 |
| 68,6 | 60,90 | 889,01 |
| 68,7 | 61,01 | 888,77 |
| 68,8 | 61,11 | 888,52 |
| 68,9 | 61,22 | 888,28 |
| 69,0 | 61,32 | 888,03 |
| 69,1 | 61,43 | 887,79 |
| 69,2 | 61,54 | 887,54 |
| 69,3 | 61,64 | 887,29 |
| 69,4 | 61,75 | 887,05 |
| 69,5 | 61,85 | 886,80 |
| 69,6 | 61,96 | 886,55 |
| 69,7 | 62,07 | 886,31 |
| 69,8 | 62,17 | 886,06 |
| 69,9 | 62,28 | 885,81 |
| 70,0 | 62,39 | 885,56 |
| 70,1 | 62,49 | 885,31 |
| 70,2 | 62,60 | 885,06 |
| 70,3 | 62,71 | 884,82 |
| 70,4 | 62,81 | 884,57 |
| 70,5 | 62,92 | 884,32 |
| 70,6 | 63,03 | 884,07 |
| 70,7 | 63,13 | 883,82 |
| 70,8 | 63,24 | 883,57 |
| 70,9 | 63,35 | 883,32 |
| 71,0 | 63,46 | 883,06 |
| 71,1 | 63,56 | 882,81 |
| 71,2 | 63,67 | 882,56 |
| 71,3 | 63,78 | 882,31 |
| 71,4 | 63,89 | 882,06 |
| 71,5 | 63,99 | 881,81 |
| 71,6 | 64,10 | 881,55 |
| 71,7 | 64,21 | 881,30 |
| 71,8 | 64,32 | 881,05 |
| 71,9 | 64,43 | 880,79 |
| 72,0 | 64,53 | 880,54 |
| 72,1 | 64,64 | 880,29 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m³) |
|---|---|---|
| 72,2 | 64,75 | 880,03 |
| 72,3 | 64,86 | 879,78 |
| 72,4 | 64,97 | 879,52 |
| 72,5 | 65,08 | 879,27 |
| 72,6 | 65,19 | 879,01 |
| 72,7 | 65,29 | 878,75 |
| 72,8 | 65,40 | 878,50 |
| 72,9 | 65,51 | 878,24 |
| 73,0 | 65,62 | 877,99 |
| 73,1 | 65,73 | 877,73 |
| 73,2 | 65,84 | 877,47 |
| 73,3 | 65,95 | 877,21 |
| 73,4 | 66,06 | 876,96 |
| 73,5 | 66,17 | 876,70 |
| 73,6 | 66,28 | 876,44 |
| 73,7 | 66,39 | 876,18 |
| 73,8 | 66,50 | 875,92 |
| 73,9 | 66,61 | 875,66 |
| 74,0 | 66,72 | 875,40 |
| 74,1 | 66,83 | 875,14 |
| 74,2 | 66,94 | 874,88 |
| 74,3 | 67,05 | 874,62 |
| 74,4 | 67,16 | 874,36 |
| 74,5 | 67,27 | 874,10 |
| 74,6 | 67,38 | 873,84 |
| 74,7 | 67,49 | 873,58 |
| 74,8 | 67,60 | 873,32 |
| 74,9 | 67,71 | 873,06 |
| 75,0 | 67,82 | 872,79 |
| 75,1 | 67,93 | 872,53 |
| 75,2 | 68,04 | 872,27 |
| 75,3 | 68,15 | 872,00 |
| 75,4 | 68,26 | 871,74 |
| 75,5 | 68,38 | 871,48 |
| 75,6 | 68,49 | 871,21 |
| 75,7 | 68,60 | 870,95 |
| 75,8 | 68,71 | 870,68 |
| 75,9 | 68,82 | 870,42 |
| 76,0 | 68,93 | 870,15 |
| 76,1 | 69,04 | 869,89 |
| 76,2 | 69,16 | 869,62 |
| 76,3 | 69,27 | 869,35 |
| 76,4 | 69,38 | 869,09 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m$^3$) |
|---|---|---|
| 76,5 | 69,49 | 868,82 |
| 76,6 | 69,61 | 868,55 |
| 76,7 | 69,72 | 868,28 |
| 76,8 | 69,83 | 868,02 |
| 76,9 | 69,94 | 867,75 |
| 77,0 | 70,06 | 867,48 |
| 77,1 | 70,17 | 867,21 |
| 77,2 | 70,28 | 866,94 |
| 77,3 | 70,39 | 866,67 |
| 77,4 | 70,51 | 866,40 |
| 77,5 | 70,62 | 866,13 |
| 77,6 | 70,73 | 865,86 |
| 77,7 | 70,85 | 865,59 |
| 77,8 | 70,96 | 865,32 |
| 77,9 | 71,07 | 865,05 |
| 78,0 | 71,19 | 864,78 |
| 78,1 | 71,30 | 864,50 |
| 78,2 | 71,41 | 864,23 |
| 78,3 | 71,53 | 863,96 |
| 78,4 | 71,64 | 863,69 |
| 78,5 | 71,76 | 863,41 |
| 78,6 | 71,87 | 863,14 |
| 78,7 | 71,98 | 862,86 |
| 78,8 | 72,10 | 862,59 |
| 78,9 | 72,21 | 862,31 |
| 79,0 | 72,33 | 862,04 |
| 79,1 | 72,44 | 861,76 |
| 79,2 | 72,56 | 861,49 |
| 79,3 | 72,67 | 861,21 |
| 79,4 | 72,79 | 860,94 |
| 79,5 | 72,90 | 860,66 |
| 79,6 | 73,02 | 860,38 |
| 79,7 | 73,13 | 860,10 |
| 79,8 | 73,25 | 859,83 |
| 79,9 | 73,36 | 859,55 |
| 80,0 | 73,48 | 859,27 |
| 80,1 | 73,60 | 858,99 |
| 80,2 | 73,71 | 858,71 |
| 80,3 | 73,83 | 858,43 |
| 80,4 | 73,94 | 858,15 |
| 80,5 | 74,06 | 857,87 |
| 80,6 | 74,18 | 857,59 |
| 80,7 | 74,29 | 857,31 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m$^3$) |
|---|---|---|
| 80,8 | 74,41 | 857,03 |
| 80,9 | 74,53 | 856,75 |
| 81,0 | 74,64 | 856,46 |
| 81,1 | 74,76 | 856,18 |
| 81,2 | 74,88 | 855,90 |
| 81,3 | 74,99 | 855,62 |
| 81,4 | 75,11 | 855,33 |
| 81,5 | 75,23 | 855,05 |
| 81,6 | 75,34 | 854,76 |
| 81,7 | 75,46 | 854,48 |
| 81,8 | 75,58 | 854,19 |
| 81,9 | 75,70 | 853,91 |
| 82,0 | 75,82 | 853,62 |
| 82,1 | 75,93 | 853,34 |
| 82,2 | 76,05 | 853,05 |
| 82,3 | 76,17 | 852,76 |
| 82,4 | 76,29 | 852,48 |
| 82,5 | 76,41 | 852,19 |
| 82,6 | 76,52 | 851,90 |
| 82,7 | 76,64 | 851,61 |
| 82,8 | 76,76 | 851,32 |
| 82,9 | 76,88 | 851,03 |
| 83,0 | 77,00 | 850,74 |
| 83,1 | 77,12 | 850,45 |
| 83,2 | 77,24 | 850,16 |
| 83,3 | 77,36 | 849,87 |
| 83,4 | 77,48 | 849,58 |
| 83,5 | 77,60 | 849,29 |
| 83,6 | 77,72 | 848,99 |
| 83,7 | 77,84 | 848,70 |
| 83,8 | 77,96 | 848,41 |
| 83,9 | 78,08 | 848,11 |
| 84,0 | 78,20 | 847,82 |
| 84,1 | 78,32 | 847,53 |
| 84,2 | 78,44 | 847,23 |
| 84,3 | 78,56 | 846,93 |
| 84,4 | 78,68 | 846,64 |
| 84,5 | 78,80 | 846,34 |
| 84,6 | 78,92 | 846,05 |
| 84,7 | 79,04 | 845,75 |
| 84,8 | 79,16 | 845,45 |
| 84,9 | 79,28 | 845,15 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m³) |
|---|---|---|
| 85,0 | 79,40 | 844,85 |
| 85,1 | 79,53 | 844,55 |
| 85,2 | 79,65 | 844,25 |
| 85,3 | 79,77 | 843,95 |
| 85,4 | 79,89 | 843,65 |
| 85,5 | 80,01 | 843,35 |
| 85,6 | 80,14 | 843,05 |
| 85,7 | 80,26 | 842,75 |
| 85,8 | 80,38 | 842,44 |
| 85,9 | 80,50 | 842,14 |
| 86,0 | 80,63 | 841,84 |
| 86,1 | 80,75 | 841,53 |
| 86,2 | 80,87 | 841,23 |
| 86,3 | 81,00 | 840,92 |
| 86,4 | 81,12 | 840,62 |
| 86,5 | 81,24 | 840,31 |
| 86,6 | 81,37 | 840,00 |
| 86,7 | 81,49 | 839,70 |
| 86,8 | 81,61 | 839,39 |
| 86,9 | 81,74 | 839,08 |
| 87,0 | 81,86 | 838,77 |
| 87,1 | 81,99 | 838,46 |
| 87,2 | 82,11 | 838,15 |
| 87,3 | 82,24 | 837,84 |
| 87,4 | 82,36 | 837,52 |
| 87,5 | 82,49 | 837,21 |
| 87,6 | 82,61 | 836,90 |
| 87,7 | 82,74 | 836,59 |
| 87,8 | 82,86 | 836,27 |
| 87,9 | 82,99 | 835,96 |
| 88,0 | 83,11 | 835,64 |
| 88,1 | 83,24 | 835,32 |
| 88,2 | 83,37 | 835,01 |
| 88,3 | 83,49 | 834,69 |
| 88,4 | 83,62 | 834,37 |
| 88,5 | 83,74 | 834,05 |
| 88,6 | 83,87 | 833,73 |
| 88,7 | 84,00 | 833,41 |
| 88,8 | 84,13 | 833,09 |
| 88,9 | 84,25 | 832,77 |
| 89,0 | 84,38 | 832,45 |
| 89,1 | 84,51 | 832,12 |
| 89,2 | 84,64 | 831,80 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m³) |
|---|---|---|
| 89,3 | 84,76 | 831,48 |
| 89,4 | 84,89 | 831,15 |
| 89,5 | 85,02 | 830,82 |
| 89,6 | 85,15 | 830,50 |
| 89,7 | 85,28 | 830,17 |
| 89,8 | 85,41 | 829,84 |
| 89,9 | 85,54 | 829,51 |
| 90,0 | 85,66 | 829,18 |
| 90,1 | 85,79 | 828,85 |
| 90,2 | 85,92 | 828,52 |
| 90,3 | 86,05 | 828,19 |
| 90,4 | 86,18 | 827,85 |
| 90,5 | 86,31 | 827,52 |
| 90,6 | 86,44 | 827,18 |
| 90,7 | 86,57 | 826,85 |
| 90,8 | 86,71 | 826,51 |
| 90,9 | 86,84 | 826,17 |
| 91,0 | 86,97 | 825,83 |
| 91,1 | 87,10 | 825,49 |
| 91,2 | 87,23 | 825,15 |
| 91,3 | 87,36 | 824,81 |
| 91,4 | 87,49 | 824,47 |
| 91,5 | 87,63 | 824,13 |
| 91,6 | 87,76 | 823,78 |
| 91,7 | 87,89 | 823,44 |
| 91,8 | 88,02 | 823,09 |
| 91,9 | 88,16 | 822,74 |
| 92,0 | 88,29 | 822,39 |
| 92,1 | 88,42 | 822,04 |
| 92,2 | 88,56 | 821,69 |
| 92,3 | 88,69 | 821,34 |
| 92,4 | 88,83 | 820,99 |
| 92,5 | 88,96 | 820,63 |
| 92,6 | 89,10 | 820,28 |
| 92,7 | 89,23 | 819,92 |
| 92,8 | 89,37 | 819,57 |
| 92,9 | 89,50 | 819,21 |
| 93,0 | 89,64 | 818,85 |
| 93,1 | 89,77 | 818,49 |
| 93,2 | 89,91 | 818,12 |
| 93,3 | 90,05 | 817,76 |
| 93,4 | 90,18 | 817,40 |
| 93,5 | 90,32 | 817,03 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m³) |
|---|---|---|
| 93,6 | 90,46 | 816,66 |
| 93,7 | 90,59 | 816,30 |
| 93,8 | 90,73 | 815,93 |
| 93,9 | 90,87 | 815,55 |
| | | |
| 94,0 | 91,01 | 815,18 |
| 94,1 | 91,15 | 814,81 |
| 94,2 | 91,29 | 814,43 |
| 94,3 | 91,43 | 814,06 |
| 94,4 | 91,56 | 813,68 |
| 94,5 | 91,70 | 813,30 |
| 94,6 | 91,84 | 812,92 |
| 94,7 | 91,98 | 812,54 |
| 94,8 | 92,13 | 812,15 |
| 94,9 | 92,27 | 811,77 |
| | | |
| 95,0 | 92,41 | 811,38 |
| 95,1 | 92,55 | 810,99 |
| 95,2 | 92,69 | 810,60 |
| 95,3 | 92,83 | 810,21 |
| 95,4 | 92,98 | 809,82 |
| 95,5 | 93,12 | 809,42 |
| 95,6 | 93,26 | 809,02 |
| 95,7 | 93,41 | 808,63 |
| 95,8 | 93,55 | 808,23 |
| 95,9 | 93,69 | 807,82 |
| | | |
| 96,0 | 93,84 | 807,42 |
| 96,1 | 93,98 | 807,01 |
| 96,2 | 94,13 | 806,61 |
| 96,3 | 94,27 | 806,20 |
| 96,4 | 94,42 | 805,78 |
| 96,5 | 94,57 | 805,37 |
| 96,6 | 94,71 | 804,96 |
| 96,7 | 94,86 | 804,54 |
| 96,8 | 95,01 | 804,12 |

| % *V/V* | % *m/m* | $\rho_{20}$ (kg/m³) |
|---|---|---|
| 96,9 | 95,16 | 803,70 |
| | | |
| 97,0 | 95,31 | 803,27 |
| 97,1 | 95,45 | 802,85 |
| 97,2 | 95,60 | 802,42 |
| 97,3 | 95,75 | 801,99 |
| 97,4 | 95,90 | 801,55 |
| 97,5 | 96,05 | 801,12 |
| 97,6 | 96,21 | 800,68 |
| 97,7 | 96,36 | 800,24 |
| 97,8 | 96,51 | 799,80 |
| 97,9 | 96,66 | 799,35 |
| | | |
| 98,0 | 96,81 | 798,90 |
| 98,1 | 96,97 | 798,45 |
| 98,2 | 97,12 | 798,00 |
| 98,3 | 97,28 | 797,54 |
| 98,4 | 97,43 | 797,08 |
| 98,5 | 97,59 | 796,62 |
| 98,6 | 97,74 | 796,15 |
| 98,7 | 97,90 | 795,68 |
| 98,8 | 98,06 | 795,21 |
| 98,9 | 98,22 | 794,73 |
| | | |
| 99,0 | 98,38 | 794,25 |
| 99,1 | 98,53 | 793,77 |
| 99,2 | 98,69 | 793,28 |
| 99,3 | 98,86 | 792,79 |
| 99,4 | 99,02 | 792,30 |
| 99,5 | 99,18 | 791,80 |
| 99,6 | 99,34 | 791,29 |
| 99,7 | 99,50 | 790,79 |
| 99,8 | 99,67 | 790,28 |
| 99,9 | 99,83 | 789,76 |
| | | |
| 100,0 | 100,0 | 789,24 |

# 5.6. TITRAGE DES INTERFÉRONS

**01/2008:50600**

# 5.6. TITRAGE DES INTERFÉRONS

*Le chapitre suivant est publié à titre d'information.*

## 1. INTRODUCTION

Les monographies relatives aux interférons humains comportent généralement un titrage biologique reposant sur l'action inhibitrice, exercée par les interférons, sur l'effet cytopathogène d'un virus sur une culture cellulaire. Toutefois, elles ne donnent pas en général de spécifications détaillées concernant le virus, la lignée cellulaire et le mode opératoire à utiliser, afin de permettre une certaine flexibilité, indispensable dans les cas où la monographie couvre plusieurs sous-classes d'interféron.

Le présent texte a pour but de fournir à l'analyste des indications générales sur la mise au point, l'optimisation et la validation de ce type d'essais dès lors qu'a été choisie une combinaison appropriée de lignée cellulaire et de virus cytopathogène. Il décrit dans le détail, à titre d'exemple de méthode appropriée, une procédure analytique applicable à un titrage d'activité antivirale particulier, tout en fournissant des informations sur d'autres combinaisons virus-lignée cellulaire et des indications sur les modalités d'adaptation et de validation de la procédure pour ces autres combinaisons.

## 2. TITRAGE D'ACTIVITÉ ANTIVIRALE (RÉDUCTION DE L'EFFET CYTOPATHOGÈNE)

Le titrage d'activité antivirale des interférons humains repose sur la mesure de la réponse induite dans des cellules humaines par les interférons, qui suppriment ou réduisent l'effet cytopathogène produit sur ces cellules par un virus infectieux. L'activité de l'interféron est estimée par comparaison de sa capacité à protéger des cellules de l'action cytopathogène d'un virus avec celle d'une préparation de référence appropriée, étalonnée en Unités Internationales.

## 3. TITRAGE D'UN INTERFÉRON AU MOYEN DE CELLULES Hep2c ET DU VIRUS DE L'ENCÉPHALOMYOCARDITE INFECTIEUSE

La méthode de titrage qui est décrite ici à titre d'exemple repose sur la réduction d'un effet cytopathogène. Elle utilise des cellules humaines Hep2c, que l'on infecte avec le virus de l'encéphalomyocardite infectieuse (EMC) dans le but de mesurer l'activité de différentes préparations d'interféron humain. Cette méthode a été employée lors des études collaboratives conduites par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour l'établissement d'étalons internationaux des interférons humains alpha, bêta et gamma et sa sensibilité, sa fiabilité et sa reproductibilité pour l'estimation de l'activité de ces différents types d'interférons humains ont été démontrées à plusieurs reprises.

Pour les cultures de cellules de mammifères, toutes les opérations sont conduites selon les procédures opératoires standardisées établies pour ces cultures cellulaires. Les volumes de réactifs à utiliser sont indiqués ici pour des cultures effectuées en flacons de 75 cm$^2$ ; d'autres types de récipients (flacons ou boîtes de culture) peuvent être utilisés, mais les volumes doivent alors être adaptés en conséquence.

### *3.1. CULTURE ET PRÉPARATION DES CELLULES Hep2c*

Les cellules Hep2c sont maintenues et repiquées dans le milieu de culture A.

Les cellules sont conservées sous forme congelée en suivant des procédures opératoires standardisées. Les cellules peuvent être maintenues en culture jusqu'à 30 passages maximum, après quoi de nouvelles cultures sont établies à partir des stocks congelés.

En début de titrage, procédez à la récolte des cellules lorsque les tapis cellulaires présentent une confluence à 90 pour cent, par la méthode de traitement à la trypsine décrite ci-après.

- Videz le milieu de culture contenu dans les flacons.
- Ajoutez dans chaque flacon 5 mL d'une solution de trypsine chauffée à 37 °C, préparée extemporanément par dilution au 1/50 avec du tampon salin phosphate à partir d'une solution mère concentrée contenant 4 mg/mL de *trypsine R* et 4 mg/mL d'*édétate de sodium R*. Bouchez le flacon et agitez circulairement pour laver le tapis cellulaire. Eliminez l'excès de solution de trypsine.
- Placez les flacons en incubateur à 37 °C pendant 5-10 min. Procédez à un examen visuel ou microscopique pour observer les signes de détachement des cellules. Au microscope, celles-ci apparaissent soit agglutinées soit séparées et flottant librement. Agitez énergiquement les flacons pour détacher toutes les cellules, puis ajoutez 5 mL environ de milieu de culture A. Agitez énergiquement pour obtenir une suspension de cellules dissociées.
- Pour préparer les suspensions cellulaires en vue du titrage, dispersez les cellules avec précaution en aspirant et refoulant à la pipette pour rompre les agrégats cellulaires, puis dénombrez les cellules et ajustez la concentration des suspensions à $6 \times 10^5$ cellules par millilitre.

### *3.2 MULTIPLICATION DU VIRUS EMC*

Le virus EMC est multiplié dans des cellules L-929 de souris, de façon à donner une suspension mère du virus. Le maintien des cultures de cellules L-929 est effectué par traitement à la trypsine et repiquage comme décrit pour les cellules Hep2c (*NOTE : en cas de croissance cellulaire médiocre, il peut être nécessaire de remplacer le sérum de veau nouveau-né par du sérum foetal de veau*).

Prenez plusieurs flacons contenant des cultures confluentes de cellules L-929. Videz le milieu contenu dans les flacons. Introduisez dans chaque flacon 2 mL de suspension du virus EMC, préalablement diluée jusqu'à une concentration de $2{,}5 \times 10^8$ UFP/mL environ avec du milieu de culture B. Chaque flacon contenant $4\text{-}6 \times 10^7$ cellules L-929, la multiplicité d'infection sera approximativement de 10 UFP/cellule. Dispersez avec précaution la suspension virale sur la surface du tapis cellulaire, en agitant circulairement, puis replacez les flacons en incubateur pendant 1 h environ. Maintenez le pH du milieu à 7,4-7,8.

Après adsorption du virus EMC, ajoutez dans chaque flacon 40 mL environ de milieu de culture B, puis replacez en incubateur à 37 °C pendant 30 h environ. Maintenez le pH du milieu à 7,4-7,8 pour obtenir un rendement maximal en virus. Prélevez le surnageant de culture et conservez-le à environ 4 °C.

Placez les flacons à – 20 °C pour congeler les tapis cellulaires, puis ramenez à température ambiante. Ajoutez environ 5 mL de milieu de culture et agitez pour rompre les membranes cellulaires. Transvasez le contenu de chaque flacon dans le récipient contenant le surnageant de culture, puis transférez ce mélange dans des tubes à centrifugation en plastique de 50 mL et centrifugez à environ 500 *g* pendant approximativement 10 min, pour séparer les débris cellulaires. Répartissez le surnageant limpide dans des tubes de verre à capuchon vissé, par fractions de 20 mL, 10 mL, 5 mL, 1 mL, 0,5 mL ou 0,2 mL par tube, selon les besoins. Conservez à – 70 °C. Les volumes importants peuvent être décongelés, puis divisés en quantités plus petites et recongelés si nécessaire. Il convient toutefois de noter que cette suspension mère du virus EMC ne conserve son

5. Textes généraux

titre initial que si elle est conservée sans interruption à – 70 °C environ ; des cycles de congélation-décongélation répétés ou la conservation à des températures plus élevées (par exemple de l'ordre de – 20 °C) entraînent une perte progressive de titre.

*3.3. MÉTHODE DE TITRAGE*

**3.3.1. Détermination de l'intervalle de mesure**

*Préparation des solutions d'interféron*

Diluez l'étalon d'interféron approprié (par exemple un étalon OMS d'un sous-type d'interféron spécifique) dans le milieu de culture A de façon à obtenir une série de dilutions de raison 10 couvrant l'intervalle de doses 1000-0,001 UI/mL. Utilisez des plaques de microtitrage à 96 puits. Introduisez dans chaque puits 100 µL de milieu de culture A. Ajoutez ensuite dans tous les puits, à l'exception de ceux qui serviront de témoins « virus », environ 100 µL d'une des dilutions de la préparation de référence. Mélangez soigneusement le contenu des puits avec une pipette multicanaux réglée sur 100 µL.

*Distribution de la suspension cellulaire*

Versez dans une boîte de Pétri stérile la suspension de cellules Hep2c ajustée de façon à contenir environ $6 \times 10^5$ cellules par millilitre de milieu de culture A, puis répartissez le contenu de la boîte de Pétri dans les puits des plaques de microtitrage en utilisant une pipette multicanaux réglée sur 100 µL.

Placez les plaques en incubateur à 37 °C, sous atmosphère contenant 5 pour cent de $CO_2$, pendant environ 24 h.

*Infection par le virus*

A cette étape, vérifiez sous un microscope inversé que les tapis de cellules Hep2c sont confluents, qu'ils présentent une distribution cellulaire relativement uniforme, que leur morphologie est correcte et que les cellules sont saines.

Videz alors la plus grande partie du milieu de culture contenu dans les puits, en procédant comme suit : renversez la plaque, secouez-la et épongez avec du papier absorbant (on procédera toujours de la même manière, par la suite, pour vider le liquide contenu dans les puits). Diluez la suspension mère de virus EMC avec du milieu de culture A frais de façon à obtenir un titre infectieux d'environ $3 \times 10^7$ UFP/mL (*NOTE : il faut environ 20 mL de virus dilué pour chaque plaque, plus 5-10 pour cent de volume supplémentaire*). Placez la suspension diluée dans une boîte de Pétri stérile de 9 cm puis, au moyen d'une pipette multicanaux réglée sur 200 µL, répartissez le contenu de la boîte dans tous les puits (y compris ceux servant de témoins « virus »), à l'exception de ceux prévus comme témoins « cellules » ; dans ces derniers, ajoutez environ 200 µL de milieu de culture A ne contenant pas de virus.

Replacez les plaques en incubateur à 37 °C, sous atmosphère contenant 5 pour cent de $CO_2$, pendant environ 24 h.

*Coloration*

Examinez les plaques au microscope pour confirmer l'effet cytopathogène produit par le virus EMC sur les témoins « virus ». Le temps nécessaire pour obtenir un effet cytopathogène maximal peut varier d'un titrage à l'autre en raison de la variabilité intrinsèque de la réaction des cellules Hep2c à l'épreuve virale sur une période donnée de culture en continu.

Videz la plus grande partie du milieu de culture contenu dans les puits dans une solution décontaminante appropriée (par exemple de l'hypochlorite de sodium). Ajoutez dans les puits de la *solution saline tamponnée phosphate pH 7,4 R*, puis videz-la dans une solution décontaminante. Introduisez dans chaque puits 150 µL de solution de coloration et laissez la coloration des cellules s'effectuer pendant environ 30 min, à température ambiante, puis videz la solution de coloration dans une solution décontaminante. Ajoutez dans les puits environ 150 µL de solution de fixation, laissez agir pendant 10 min à température ambiante, puis videz la solution de fixation dans une solution décontaminante. Lavez les tapis cellulaires en plaçant les plaques dans un bac en plastique sous l'eau courante. Jetez l'eau et séchez superficiellement les plaques avec du papier absorbant. Séchez les plaques à une température comprise entre 20 °C et 37 °C jusqu'à évaporation totale de l'humidité. Ajoutez dans chaque puits 150 µL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M*. Eluez le colorant en agitant doucement les plaques ou en les tapotant sur la paume de la main. Assurez-vous que la répartition de la coloration est uniforme dans l'ensemble des puits, avant de procéder aux mesures spectrophotométriques.

Mesurez l'absorbance à 610-620 nm, au moyen d'un lecteur de plaques de microtitrage, en utilisant comme blanc un puits, ou une rangée de puits, ne contenant pas de cellules mais environ 150 µL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M*.

Estimez les concentrations de l'étalon d'interféron qui correspondent respectivement aux réductions maximale et minimale de l'effet cytopathogène. Ces concentrations définissent l'intervalle de mesure qui sera utilisé pour le titrage.

**3.3.2. Titrage**

Effectuez le titrage selon la procédure décrite ci-dessus, en utilisant :

– comme solutions à examiner, une série de dilutions au 1/2 de la substance à examiner dans le milieu de culture A, dont les concentrations nominales couvrent l'intervalle de mesure du titrage,
– comme solutions de référence, une série de dilutions au 1/2 dans le milieu de culture A de l'étalon approprié (par exemple un étalon OMS d'un sous-type d'interféron spécifique), dont les concentrations nominales couvrent l'intervalle de mesure du titrage.

**3.3.3. Analyse des résultats**

Les résultats des titrages d'activité antivirale suivent généralement une courbe dose-réponse de type sigmoïde, lorsque l'on trace le graphe de la concentration en interféron (logarithme de l'inverse de la dilution) en fonction de l'absorbance.

Tracez le graphe de la concentration en interféron (logarithme de l'inverse de la dilution) en fonction de l'absorbance mesurée, pour les solutions de référence et pour les solutions à examiner. En ne considérant que la partie linéaire de la courbe, calculez la teneur en interféron de l'échantillon par comparaison des réponses respectivement obtenues avec les solutions à examiner et avec les solutions de référence, selon les méthodes statistiques habituelles pour les essais en lignes parallèles.

4. VALIDATION D'AUTRES PROCÉDURES

*4.1. CHOIX DE LA LIGNÉE CELLULAIRE ET DU VIRUS*

Un certain nombre d'autres combinaisons lignée cellulaire/virus sont utilisées pour le titrage d'activité antivirale des interférons, par exemple le virus EMC avec des cellules d'épithéliome pulmonaire A549, le virus de la forêt de Semliki (virus SF) ou le virus Sindbis avec des fibroblastes humains, le virus de la stomatite vésiculaire avec des fibroblastes diploïdes humains, la lignée cellulaire amniotique humaine WISH ou la lignée de cellules rénales bovines de Madin-Darby. La combinaison lignée cellulaire/virus choisie sera, en général, celle dont la réponse à la préparation d'interféron à titrer présente la sensibilité maximale et qui permet d'obtenir des réponses parallèles avec la préparation à examiner et l'étalon d'interféron.

*4.2. CHOIX DE LA TECHNIQUE DE COLORATION VITALE*

La technique de coloration décrite plus haut permet de mesurer le nombre résiduel de cellules viables. D'autres techniques sont également utilisées, notamment la coloration au violet de méthyle ou au violet cristallisé, ou la méthode de conversion du bleu de thiazolyl (MTT). Dans tous les cas, le critère de choix de la méthode sera l'obtention, entre la coloration et le nombre de cellules viables, d'une relation présentant une linéarité et une sensibilité satisfaisantes.

*4.3. VALIDATION STATISTIQUE*

Comme tous les titrages biologiques effectués suivant le modèle en lignes parallèles, le titrage d'activité antivirale doit satisfaire aux conditions statistiques habituelles de linéarité de la réponse, de parallélisme et de variance.

*4.4. VALIDATION DU PLAN D'ESSAI*

Comme pour tous les titrages sur plaques de microtitrage, une validation du plan d'essai utilisé est nécessaire. Il est notamment important de déceler les éventuelles erreurs résultant d'un ordre de distribution non aléatoire dans les puits ou de l'effet de bordure de plaque, et de les éliminer en effectuant une randomisation du plan de titrage ou en évitant d'utiliser les puits de bordure.

RÉACTIFS ET MILIEUX DE CULTURE

*Milieu de culture A (sérum de veau nouveau-né : 10 pour cent)*

| | |
|---|---|
| Milieu de culture RPMI 1640 si nécessaire additionné d'antibiotiques (pénicilline 10 000 UI/mL ; streptomycine 10 ng/mL) | 450 mL |
| L-Glutamine, 200 mM, stérile | 5 mL |
| Sérum de veau nouveau-né | 50 mL |

*Milieu de culture B (sérum foetal de veau : 2 pour cent)*

| | |
|---|---|
| Milieu de culture RPMI 1640 si nécessaire additionné d'antibiotiques (pénicilline 10 000 UI/mL ; streptomycine 10 ng/mL) | 490 mL |
| L-Glutamine, 200 mM, stérile | 5 mL |
| Sérum foetal de veau | 10 mL |

*Solution de coloration*

| | |
|---|---|
| Noir de naphtalène | 0,5 g |
| Acide acétique glacial | 90 mL |
| Acétate de sodium anhydre | 8,2 g |
| Eau *q.s.p.* | 1000 mL |

*Solution de fixation*

| | |
|---|---|
| Formaldéhyde à 40 pour cent | 100 mL |
| Acide acétique glacial | 90 mL |
| Acétate de sodium anhydre | 8,2 g |
| Eau *q.s.p.* | 1000 mL |

# 5.7. TABLEAU DES CARACTÉRISTIQUES DES RADIONUCLÉIDES MENTIONNÉS DANS LA PHARMACOPÉE EUROPÉENNE

**01/2008:50700**

# 5.7. TABLEAU DES CARACTÉRISTIQUES DES RADIONUCLÉIDES MENTIONNÉS DANS LA PHARMACOPÉE EUROPÉENNE

Le tableau suivant est donné pour compléter la monographie générale *Préparations radiopharmaceutiques (0125).*

Les valeurs sont obtenues à partir de la base de données du National Nuclear Data Center (NNDC) situé au Brookhaven National Laboratory, Upton, N.Y., Etats-Unis, directement accessible par Internet à l'adresse : http ://www.nndc.bnl.gov/nndc/nudat/radform.html.

Si une autre source d'informations est préférée (valeurs plus récentes), elle est mentionnée explicitement.

Autres sources de données :

* DAMRI (Département des Applications et de la Métrologie des Rayonnements Ionisants, CEA Gif-sur-Yvette, France),

** PTB (Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Braunschweig, Allemagne),

*** NPL (National Physical Laboratory, Teddington, Middlesex, Royaume-Uni).

L'incertitude de la période est donnée entre parenthèses. En principe, le nombre entre parenthèses est la valeur numérique de l'incertitude-type qui porte sur les derniers chiffres correspondants de la valeur indiquée (« Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure », organisation internationale de normalisation (ISO), 1995, ISBN 92-67-20188-3).

Les abréviations suivantes sont utilisées :

$e_A$ = électrons Auger,

$e_c$ = électrons de conversion,

$\beta^-$ = électrons,

$\beta^+$ = positons,

$\gamma$ = rayonnements gamma,

X = rayonnements X.



| Radionucléide | Période | Emission électronique | | | Emission photonique | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Type | Energie (MeV) | Probabilité d'émission (par 100 désintégrations) | Type | Energie (MeV) | Probabilité d'émission (par 100 désintégrations) |
| Tritium ($^3H$) | *12,33 (6) ans | *$\beta^-$ | *0,006 (I) (max : 0,019) | *100 | | | |
| Carbone-11 ($^{11}C$) | 20,385 (20) min | $\beta^+$ | 0,386 (I) (max : 0,960) | 99,8 | $\gamma$ | 0,511 | 199,5 (II) |
| Azote-13 ($^{13}N$) | 9,965 (4) min | $\beta^+$ | 0,492 (I) (max : 1,198) | 99,8 | $\gamma$ | 0,511 | 199,6 (II) |
| Oxygène-15 ($^{15}O$) | 122,24 (16) s | $\beta^+$ | 0,735 (I) (max : 1,732) | 99,9 | $\gamma$ | 0,511 | 199,8 (II) |
| Fluor-18($^{18}F$) | 109,77 (5) min | $\beta^+$ | 0,250 (I) (max : 0,633) | 96,7 | $\gamma$ | 0,511 | 193,5 (II) |
| Phosphore-32 ($^{32}P$) | 14,26 (4) jours | $\beta^-$ | 0,695 (I) (max : 1,71) | 100 | | | |
| Phosphore-33 ($^{33}P$) | 25,34 (12) jours | $\beta^-$ | 0,076 (I) (max : 0,249) | 100 | | | |
| Soufre-35 ($^{35}S$) | 87,51 (12) jours | $\beta^-$ | 0,049 (I) (max : 0,167) | 100 | | | |
| Chrome-51 ($^{51}Cr$) | 27,7025 (24) jours | $e_A$ | 0,004 | 67 | X | 0,005 | 22,3 |
| | | | | | $\gamma$ | 0,320 | 9,9 |
| Cobalt-56 ($^{56}Co$) | 77,27 (3) jours | $e_A$ | 0,006 | 47 | X | 0,006-0,007 | 25 |
| | | $\beta^+$ | 0,179 (I) | 0,9 | $\gamma$ | 0,511 | 38,0 (II) |
| | | | 0,631 (I) | 18,1 | | 0,847 | 100,0 |
| | | | | | | 1,038 | 14,1 |
| | | | | | | 1,175 | 2,2 |
| | | | | | | 1,238 | 66,1 |
| | | | | | | 1,360 | 4,3 |
| | | | | | | 1,771 | 15,5 |
| | | | | | | 2,015 | 3,0 |
| | | | | | | 2,035 | 7,8 |
| | | | | | | 2,598 | 17,0 |
| | | | | | | 3,202 | 3,1 |
| | | | | | | 3,253 | 7,6 |

(I) Energie moyenne du spectre β.
(II) Probabilité d'émission maximum correspondant à une annihilation totale dans la source par 100 désintégrations.

| Radionucléide | Période | Emission électronique | | | Emission photonique | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Type | Energie (MeV) | Probabilité d'émission (par 100 désintégrations) | Type | Energie (MeV) | Probabilité d'émission (par 100 désintégrations) |
| Cobalt-57 ($^{57}$Co) | 271,79 (9) jours | $e_A$+$e_c$ | 0,006-0,007 | 177,4 | X | 0,006-0,007 | 57 |
| | | $e_c$ | 0,014 | 7,4 | γ | 0,014 | 9,2 |
| | | | 0,115 | 1,8 | | 0,122 | 85,6 |
| | | | 0,129 | 1,3 | | 0,136 | 10,7 |
| | | | | | | 0,692 | 0,15 |
| | 70,86 (7) jours | $e_A$ | 0,006 | 49,4 | X | 0,006-0,007 | 26,3 |
| | | $\beta^+$ | 0,201 (I) | 14,9 | γ | 0,511 | 29,9 (II) |
| | | | | | | 0,811 | 99,4 |
| | | | | | | 0,864 | 0,7 |
| | | | | | | 1,675 | 0,5 |
| Cobalt-60 ($^{60}$Co) | 5,2714 (5) ans | $\beta^-$ | 0,096 (I) (max : 0,318) | 99,9 | γ | 1,173 | 100,0 |
| | | | | | | 1,333 | 100,0 |
| Gallium-66 ($^{66}$Ga) | 9,49 (7) heures | $e_A$ | 0,008 | 21 | X | 0,009-0,010 | 19,1 |
| | | $\beta^+$ | 0,157 (I) | 1 | γ | 0,511 | 112 (II) |
| | | | 0,331 (I) | 0,7 | | 0,834 | 5,9 |
| | | | 0,397 (I) | 3,8 | | 1,039 | 37 |
| | | | 0,782 (I) | 0,3 | | 1,333 | 1,2 |
| | | | 1,90 (I) | 50 | | 1,919 | 2,1 |
| | | | | | | 2,190 | 5,6 |
| | | | | | | 2,423 | 1,9 |
| | | | | | | 2,752 | 23,4 |
| | | | | | | 3,229 | 1,5 |
| | | | | | | 3,381 | 1,5 |
| | | | | | | 3,792 | 1,1 |
| | | | | | | 4,086 | 1,3 |
| | | | | | | 4,295 | 4,1 |
| | | | | | | 4,807 | 1,8 |
| Gallium-67 ($^{67}$Ga) | 3,2612 (6) jours | $e_A$ | 0,008 | 62 | X | 0,008-0,010 | 57 |
| | | $e_c$ | 0,082-0,084 | 30,4 | γ | 0,091-0,093 | 42,4 |
| | | | 0,090-0,092 | 3,6 | | 0,185 | 21,2 |
| | | | 0,175 | 0,3 | | 0,209 | 2,4 |
| | | | | | | 0,300 | 16,8 |
| | | | | | | 0,394 | 4,7 |
| | | | | | | 0,888 | 0,15 |
| Germanium-68 ($^{68}$Ge) en équilibre avec Gallium 68 ($^{68}$Ga) | 270,82 (27) jours | $e_A$ | 0,008 | 42,4 | X | 0,009-0,010 | 44,1 |
| | | $\beta^+$ | 0,353 (I) | 1,2 | γ | 0,511 | 178,3 |
| | ($^{68}$Ga : 67,629 (24) min) | | 0,836 (I) | 88,0 | | 1,077 | 3,0 |

(I) Energie moyenne du spectre β.
(II) Probabilité d'émission maximum correspondant à une annihilation totale dans la source par 100 désintégrations.

| Radionucléide | Période | Emission électronique | | | Emission photonique | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Type | Energie (MeV) | Probabilité d'émission (par 100 désintégrations) | Type | Energie (MeV) | Probabilité d'émission (par 100 désintégrations) |
| Gallium-68 ($^{68}$Ga) | 67,629 (24) min | $e_A$ | 0,008 | 5,1 | X | 0,009-0,010 | 4,7 |
| | | $\beta^+$ | 0,353 [(I)] | 1,2 | $\gamma$ | 0,511 | 178,3 |
| | | | 0,836 [(I)] | 88,0 | | 1,077 | 3,0 |
| Krypton-81m ($^{81m}$Kr) | 13,10 (3) s | $e_C$ | 0,176 | 26,4 | X | 0,012-0,014 | 17,0 |
| | | | 0,189 | 4,6 | | | |
| | | | | | $\gamma$ | 0,190 | 67,6 |
| Rubidium-81 ($^{81}$Rb) en équilibre avec Krypton-81m ($^{81m}$Kr) | 4,576 (5) heures | $e_A$ | 0,011 | 31,3 | X | 0,013-0,014 | 57,2 |
| | | $e_C$ | 0,176 | 25,0 | $\gamma$ | 0,190 | 64 |
| | | | 0,188 | 4,3 | | 0,446 | 23,2 |
| | | | | | | 0,457 | 3,0 |
| | | $\beta^+$ | 0,253 [(I)] | 1,8 | | 0,510 | 5,3 |
| | | | 0,447 [(I)] | 25,0 | | 0,511 | 54,2 |
| | ($^{81m}$Kr : 13,10 (3) s) | | | | | 0,538 | 2,2 |
| Strontium-89 ($^{89}$Sr) en équilibre avec Yttrium-89m ($^{89m}$Y) | 50,53 (7) jours<br>($^{89m}$Y : 16,06 (4) s) | $\beta^-$ | 0,583 [(I)] (max : 1,492) | 99,99 | $\gamma$ | 0,909 | 0,01 |
| Strontium-90 ($^{90}$Sr) en équilibre avec Yttrium-90 ($^{90}$Y) | 28,74 (4) ans<br>($^{90}$Y : 64,10 (8) heures) | $\beta^-$ | 0,196 [(I)] (max : 0,546) | 100 | | | |
| Yttrium-90 ($^{90}$Y) | 64,10 (8) heures | $\beta^-$ | 0,934 [(I)] (max : 2,280) | 100 | | | |
| Molybdène-99 ($^{99}$Mo) en équilibre avec le Technétium-99m ($^{99m}$Tc) | 65,94 (1) heures | $\beta^-$ | 0,133 [(I)] | 16,4 | X | 0,018-0,021 | 3,6 |
| | | | 0,290 [(I)] | 1,1 | | | |
| | | | 0,443 [(I)] | 82,4 | $\gamma$ | 0,041 | 1,1 |
| | | | | | | 0,141 | 4,5 |
| | | | | | | 0,181 | 6 |
| | | | | | | 0,366 | 1,2 |
| | ($^{99m}$Tc : 6,01 (1) heures) | | | | | 0,740 | 12,1 |
| | | | | | | 0,778 | 4,3 |
| Technétium-99m ($^{99m}$Tc) | 6,01 (1) heures | $e_C$ | 0,002 | 74 | X | 0,018-0,021 | 7,3 |
| | | $e_A$ | 0,015 | 2,1 | $\gamma$ | 0,141 | 89,1 |
| | | $e_C$ | 0,120 | 9,4 | | | |
| | | | 0,137-0,140 | 1,3 | | | |
| Technétium-99 ($^{99}$Tc) | $2,11 \times 10^5$ ans | $\beta^-$ | 0,085 [(I)] (max : 0,294) | 100 | | | |

(I) Energie moyenne du spectre β.
(II) Probabilité d'émission maximum correspondant à une annihilation totale dans la source par 100 désintégrations.

5. Textes généraux

| Radionucléide | Période | Emission électronique | | | Emission photonique | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Type | Energie (MeV) | Probabilité d'émission (par 100 désintégrations) | Type | Energie (MeV) | Probabilité d'émission (par 100 désintégrations) |
| Ruthénium-103 ($^{103}$Ru) en équilibre avec le Rhodium-103m ($^{103m}$Rh) | 39,26 (2) jours | $e_A$+$e_c$ | 0,017 | 12 | X | 0,020-0,023 | 9,0 |
| | | $e_c$ | 0,030-0,039 | 88,3 | γ | 0,497 | 91 |
| | | | | | | 0,610 | 5,8 |
| | | $\beta^-$ | 0,031 [I] | 6,6 | | | |
| | ($^{103m}$Rh : 56,114 (20) min) | | 0,064 [I] | 92,2 | | | |
| Indium-110 ($^{110}$In) | 4,9 (1) heures | $e_A$ | 0,019 | 13,4 | X | 0,023-0,026 | 70,5 |
| | | | | | γ | 0,642 | 25,9 |
| | | | | | | 0,658 | 98,3 |
| | | | | | | 0,885 | 92,9 |
| | | | | | | 0,938 | 68,4 |
| | | | | | | 0,997 | 10,5 |
| Indium-110m ($^{110m}$In) | 69,1 (5) min | $e_A$ | 0,019 | 5,3 | X | 0,023-0,026 | 27,8 |
| | | $\beta^+$ | 1,015 [I] | 61 | γ | 0,511 | 123,4 [II] |
| | | | | | | 0,658 | 97,8 |
| | | | | | | 2,129 | 2,1 |
| Indium-111 ($^{111}$In) | 2,8047 (5) jours | $e_A$ | 0,019 | 15,6 | X | 0,003 | 6,9 |
| | | | | | | 0,023-0,026 | 82,3 |
| | | $e_c$ | 0,145 | 7,8 | | | |
| | | | 0,167-0,171 | 1,3 | γ | 0,171 | 90,2 |
| | | | 0,219 | 4,9 | | 0,245 | 94,0 |
| | | | 0,241-0,245 | 1,0 | | | |
| Indium-114m ($^{114m}$In) en équilibre avec Indium-114 ($^{114}$In) | 49,51 (1) jours | $e_c$ | 0,162 | 40 | X | 0,023-0,027 | 36,3 |
| | | | 0,186-0,190 | 40 | | | |
| | | | | | γ | 0,190 | 15,6 |
| | | *$\beta^-$ | 0,777 [I] (max : 1,985) | 95 | | 0,558 | 3,2 |
| | ($^{114}$In : 71,9 (1) s) | | | | | 0,725 | 3,2 |
| Tellure-121m ($^{121m}$Te) en équilibre avec Tellure-121 ($^{121}$Te) | 154,0 (7) jours | $e_A$ | 0,003 | 88,0 | X | 0,026-0,031 | 50,5 |
| | | | 0,022-0,023 | 7,4 | | | |
| | | | | | γ | 0,212 | 81,4 |
| | | $e_c$ | 0,050 | 33,2 | | 1,102 | 2,5 |
| | ($^{121}$Te : 19,16 (5) jours) | | 0,077 | 40,0 | | | |
| | | | 0,180 | 6,1 | | | |
| Tellure-121 ($^{121}$Te) | **19,16 (5) jours | $e_A$ | 0,022 | 11,6 | X | 0,026-0,030 | 75,6 |
| | | | | | γ | 0,470 | 1,4 |
| | | | | | | 0,508 | 17,7 |
| | | | | | | 0,573 | 80,3 |

(I) Energie moyenne du spectre β.
(II) Probabilité d'émission maximum correspondant à une annihilation totale dans la source par 100 désintégrations.

| **Radionucléide** | **Période** | **Emission électronique** | | | **Emission photonique** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Type** | **Energie (MeV)** | **Probabilité d'émission (par 100 désintégrations)** | **Type** | **Energie (MeV)** | **Probabilité d'émission (par 100 désintégrations)** |
| Iode-123 ($^{123}I$) | 13,27 (8) heures | $e_A$ | 0,023 | 12,3 | X | 0,004 | 9,3 |
| | | | | | | 0,027-0,031 | 86,6 |
| | | $e_c$ | 0,127 | 13,6 | | | |
| | | | 0,154 | 1,8 | γ | 0,159 | 83,3 |
| | | | 0,158 | 0,4 | | 0,346 | 0,1 |
| | | | | | | 0,440 | 0,4 |
| | | | | | | 0,505 | 0,3 |
| | | | | | | 0,529 | 1,4 |
| | | | | | | 0,538 | 0,4 |
| Iode-125 ($^{125}I$) | 59,402 (14) jours | $e_A$+$e_c$ | 0,004 | 80 | X | 0,004 | 15,5 |
| | | | 0,023-0,035 | 33 | | 0,027 | 114 |
| | | | | | | 0,031 | 26 |
| | | | | | γ | 0,035 | 6,7 |
| Iode-126 ($^{126}I$) | 13,11 (5) jours | $e_A$ | 0,023 | 6 | X | 0,027-0,031 | 42,2 |
| | | $e_c$ | 0,354 | 0,5 | γ | 0,388 | 34 |
| | | | 0,634 | 0,1 | | 0,491 | 2,9 |
| | | | | | | 0,511 | 2,3 (II) |
| | | $\beta^-$ | 0,109 (I) | 3,6 | | 0,666 | 33 |
| | | | 0,290 (I) | 32,1 | | 0,754 | 4,2 |
| | | | 0,459 (I) | 8,0 | | 0,880 | 0,8 |
| | | | | | | 1,420 | 0,3 |
| | | $\beta^+$ | 0,530 (I) | 1 | | | |
| Iode-131 ($^{131}I$) | 8,02070 (11) jours | $e_c$ | 0,46 | 3,5 | X | 0,029-0,030 | 3,9 |
| | | | 0,330 | 1,6 | | | |
| | | | | | γ | 0,080 | 2,6 |
| | | $\beta^-$ | 0,069 (I) | 2,1 | | 0,284 | 6,1 |
| | | | 0,097 (I) | 7,3 | | 0,365 | 81,7 |
| | | | 0,192 (I) | 89,9 | | 0,637 | 7,2 |
| | | | | | | 0,723 | 1,8 |
| Xénon-131m ($^{131m}Xe$) | 11,84 (7) jours | $e_A$ | 0,025 | 6,8 | X | 0,004 | 8,3 |
| | | | | | | 0,030 | 44,0 |
| | | $e_c$ | 0,129 | 61 | | 0,034 | 10,2 |
| | | | 0,159 | 28,5 | | | |
| | | | 0,163 | 8,3 | γ | 0,164 | 2,0 |
| Iode-133 ($^{133}I$) (génère le Xénon-133 radioactif) | 20,8 (1) heures | $\beta^-$ | 0,140 (I) | 3,8 | γ | 0,530 | 87 |
| | | | 0,162 (I) | 3,2 | | 0,875 | 4,5 |
| | | | 0,299 (I) | 4,2 | | 1,298 | 2,4 |
| | | | 0,441 (I) | 83 | | | |

(I) Energie moyenne du spectre β.
(II) Probabilité d'émission maximum correspondant à une annihilation totale dans la source par 100 désintégrations.

| Radionucléide | Période | Emission électronique | | | Emission photonique | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Type | Energie (MeV) | Probabilité d'émission (par 100 désintégrations) | Type | Energie (MeV) | Probabilité d'émission (par 100 désintégrations) |
| Xénon-133 ($^{133}$Xe) | 5,243 (1) jours | $e_A$ | 0,026 | 5,8 | X | 0,004 | 6,3 |
| | | | | | | 0,031 | 40,3 |
| | | $e_c$ | 0,045 | 55,1 | | 0,035 | 9,4 |
| | | | 0,075-0,080 | 9,9 | | | |
| | | | | | $\gamma$ | 0,080 | 38,3 |
| | | $\beta^-$ | 0,101 (I) | 99,0 | | | |
| Xénon-133m ($^{133m}$Xe) (génère le Xénon-133 radioactif) | 2,19 (1) jours | $e_A$ | 0,025 | 7 | X | 0,004 | 7,8 |
| | | | | | | 0,030 | 45,9 |
| | | $e_c$ | 0,199 | 64,0 | | 0,034 | 10,6 |
| | | | 0,228 | 20,7 | | | |
| | | | 0,232 | 4,6 | $\gamma$ | 0,233 | 10,0 |
| Iode-135 ($^{135}$I) (génère le Xénon-135 radioactif) | 6,57 (2) heures | $\beta^-$ | 0,140 (I) | 7,4 | $\gamma$ | *0,527 | 13,8 |
| | | | 0,237 (I) | 8 | | 0,547 | 7,2 |
| | | | 0,307 (I) | 8,8 | | 0,837 | 6,7 |
| | | | 0,352 (I) | 21,9 | | 1,039 | 8,0 |
| | | | 0,399 (I) | 8 | | 1,132 | 22,7 |
| | | | 0,444 (I) | 7,5 | | 1,260 | 28,9 |
| | | | 0,529 (I) | 23,8 | | 1,458 | 8,7 |
| | | | | | | 1,678 | 9,6 |
| | | | | | | 1,791 | 7,8 |
| Xénon-135 ($^{135}$Xe) | 9,14 (2) heures | $e_c$ | 0,214 | 5,5 | X | 0,031-0,035 | 5,0 |
| | | $\beta^-$ | 0,171 | 3,1 | $\gamma$ | 0,250 | 90,2 |
| | | | 0,308 | 96,0 | | 0,608 | 2,9 |
| Césium-137($^{137}$Cs) en équilibre avec Barium-137m ($^{137m}$Ba) | 30,04 (3) ans | $e_A$ | 0,026 | 0,8 | X | 0,005 | 1 |
| | | | | | | 0,032-0,036 | 7 |
| | | $e_c$ | 0,624 | 8,0 | | | |
| | | | 0,656 | 1,4 | $\gamma$ | 0,662 | 85,1 |
| | | $\beta^-$ | 0,174 (I) | 94,4 | | | |
| | ($^{137m}$Ba : 2,552 (1) min) | | 0,416 (I) | 5,6 | | | |
| Thallium-200 ($^{200}$Tl) | 26,1 (1) heures | $e_c$ | 0,285 | 3,4 | X | 0,010 | 32,0 |
| | | | 0,353 | 1,4 | | 0,069-0,071 | 63,3 |
| | | | | | | 0,08 | 17,5 |
| | | $\beta^+$ | 0,495 (I) | 0,3 | | | |
| | | | | | $\gamma$ | 0,368 | 87,2 |
| | | | | | | 0,579 | 13,8 |
| | | | | | | 0,828 | 10,8 |
| | | | | | | 1,206 | 29,9 |
| | | | | | | 1,226 | 3,4 |
| | | | | | | 1,274 | 3,3 |
| | | | | | | 1,363 | 3,4 |
| | | | | | | 1,515 | 4,0 |

(I) Energie moyenne du spectre β.
(II) Probabilité d'émission maximum correspondant à une annihilation totale dans la source par 100 désintégrations.

| Radionucléide | Période | Emission électronique | | | Emission photonique | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Type | Energie (MeV) | Probabilité d'émission (par 100 désintégrations) | Type | Energie (MeV) | Probabilité d'émission (par 100 désintégrations) |
| Plomb-201 ($^{201}Pb$) (génère le Thallium-201 radioactif) | 9,33 (3) heures | $e_A$ | 0,055 | 3 | X | 0,070-0,073 | 69 |
| | | | | | | 0,083 | 19 |
| | | $e_c$ | 0,246 | 8,5 | | | |
| | | | 0,276 | 2 | γ | 0,331 | 79 |
| | | | 0,316 | 2,3 | | 0,361 | 9,9 |
| | | | | | | 0,406 | 2,0 |
| | | | | | | 0,585 | 3,6 |
| | | | | | | 0,692 | 4,3 |
| | | | | | | 0,767 | 3,2 |
| | | | | | | 0,826 | 2,4 |
| | | | | | | 0,908 | 5,7 |
| | | | | | | 0,946 | 7,9 |
| | | | | | | 1,099 | 1,8 |
| | | | | | | 1,277 | 1,6 |
| Thallium-201 ($^{201}Tl$) | 72,912 (17) heures | $e_c$ | 0,016-0,017 | 17,7 | X | 0,010 | 46,0 |
| | | | 0,027-0,029 | 4,1 | | 0,069-0,071 | 73,7 |
| | | | 0,052 | 7,2 | | 0,080 | 20,4 |
| | | | 0,084 | 15,4 | | | |
| | | | 0,153 | 2,6 | γ | 0,135 | 2,6 |
| | | | | | | 0,167 | 10,0 |
| Thallium-202 ($^{202}Tl$) | 12,23 (2) jours | $e_A$ | 0,054 | 2,8 | X | 0,010 | 31,0 |
| | | | | | | 0,069-0,071 | 61,6 |
| | | $e_c$ | 0,357 | 2,4 | | 0,080 | 17,1 |
| | | | | | γ | 0,440 | 91,4 |
| Plomb-203 ($^{203}Pb$) | 51,873 (9) heures | $e_A$ | 0,055 | 3,0 | X | 0,010 | 37,0 |
| | | | | | | 0,071-0,073 | 69,6 |
| | | $e_c$ | 0,194 | 13,3 | | 0,083 | 19,4 |
| | | | | | γ | 0,279 | 80,8 |
| | | | | | | 0,401 | 3,4 |

(I) Energie moyenne du spectre β.
(II) Probabilité d'émission maximum correspondant à une annihilation totale dans la source par 100 désintégrations.

# 5.8. HARMONISATION DES PHARMACOPÉES

**01/2011:50800**

# 5.8. HARMONISATION DES PHARMACOPÉES

*Ce chapitre général est pour information seulement. Il contient des indications sur le degré d'harmonisation de divers chapitres généraux et monographies de la Pharmacopée des Etats-Unis, de la Pharmacopée Européenne et de la Pharmacopée Japonaise. Il ne modifie en rien le statut des monographies et des chapitres généraux, qui font autorité en cas de doute ou de litige lorsque la conformité à la Pharmacopée Européenne est requise.*

La Commission européenne de Pharmacopée reconnaît l'utilité d'une coopération avec les autres organismes de pharmacopée pour l'élaboration de monographies et de chapitres généraux harmonisés. Cette harmonisation est totalement compatible avec les objectifs de la Commission et présente divers avantages dont la simplification et la rationalisation des méthodes de contrôle qualité et des procédures d'enregistrement. Par ailleurs, cette harmonisation profite aux travaux de la Conférence Internationale sur l'Harmonisation (ICH) et de la Coopération Internationale sur l'Harmonisation Vétérinaire (VICH) dans la mesure où certaines notes explicatives dépendent des chapitres généraux de la Pharmacopée pour leur application.

Les travaux d'harmonisation sont réalisés d'une manière bien définie mais informelle au sein du Groupe de Discussion des Pharmacopées (PDG), qui associe la Pharmacopée des Etats-Unis, la Pharmacopée Européenne et la Pharmacopée Japonaise. Des informations sur les points qui ont été traités par le PDG figurent dans le présent chapitre.

L'harmonisation des chapitres généraux vise à l'obtention de méthodes ou de normes interchangeables ; ceci implique que la conformité établie à l'aide de l'une des pharmacopées le serait tout autant si le chapitre correspondant de l'une quelconque des autres pharmacopées avait été utilisé. Quand une déclaration formelle d'interchangeabilité a été recommandée par ICH, elle sera indiquée dans le présent chapitre. Toute différence résiduelle entre les chapitres généraux harmonisés est décrite dans le présent chapitre.

L'harmonisation des monographies vise à l'obtention de normes identiques pour toutes les caractéristiques d'une substance. L'harmonisation intégrale de certaines monographies peut se révéler difficile, en raison, par exemple, de différences de statut juridique ou d'interprétations divergentes. Dans ce cas, le PDG a décidé d'approuver et de publier des monographies dont le plus grand nombre possible d'éléments auront été harmonisés. Les éléments divergents subsistant dans les monographies harmonisées sont décrits dans le présent chapitre.

Les 3 pharmacopées ont décidé de ne pas modifier unilatéralement les monographies et chapitres généraux harmonisés ; les révisions seront effectuées simultanément par les 3 pharmacopées selon la procédure convenue.

## 2.2.31. ÉLECTROPHORÈSE

La comparaison ci-après se rapporte aux textes *23. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* de la Pharmacopée Japonaise XV et <1056> *Biotechnology-derived Articles – Polyacrylamide Gel Electrophoresis* de la Pharmacopée des Etats-Unis USP31 NF26 2[e] Supplément, et au chapitre *2.2.31. Electrophorèse* de la Pharmacopée Européenne.

Dans la Ph. Eur., le chapitre harmonisé constitue une section intitulée Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE), au sein d'un chapitre plus général intitulé Electrophorèse. Les parties suivantes : Principes généraux, Electrophorèse libre ou de frontière, Electrophorèse de zone utilisant un support et Electrophorèse sur gel de polyacrylamide cylindrique font également partie du chapitre général, mais sont en dehors du champ d'application de l'harmonisation des pharmacopées. Les parties correspondantes figurent entre des losanges noirs (♦ ♦).

Les différences ci-dessus figurant dans le texte de la Ph. Eur. n'affectent pas l'harmonisation car elles fournissent des informations supplémentaires.

Les textes des 3 pharmacopées sont donc considérés comme harmonisés.

## 2.2.47. ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

A la suite d'une évaluation des textes *4. Capillary Electrophoresis* de la Pharmacopée Japonaise XV et <1053> *Biotechnology-derived articles – Capillary Electrophoresis* de la Pharmacopée des Etats-Unis USP33 NF28, et du chapitre *2.2.47. Electrophorèse capillaire* de la Pharmacopée Européenne, les textes des 3 pharmacopées sont considérés comme harmonisés.

## 2.2.54. FOCALISATION ISOÉLECTRIQUE

A la suite d'une évaluation des textes *9. Isoelectric Focusing* de la Pharmacopée Japonaise XV et <1054> *Biotechnology-derived articles – Isoelectric Focusing* de la Pharmacopée des Etats-Unis USP33 NF28, et du chapitre *2.2.54. Focalisation isoélectrique* de la Pharmacopée Européenne, les textes des 3 pharmacopées sont considérés comme harmonisés.



## 2.2.55. CARTOGRAPHIE PEPTIDIQUE

La comparaison ci-après se rapporte aux textes *15. Peptide Mapping* de la Pharmacopée Japonaise XV et <1055> *Biotechnology-derived Articles – Peptide Mapping* de la Pharmacopée des Etats-Unis USP31 NF26 2[e] Supplément, et au chapitre *2.2.55. Cartographie peptidique* de la Pharmacopée Européenne.

**Validation (USP)**. L'USP a intitulé cette partie Conformité du système. Cette terminologie a été acceptée par les 3 pharmacopées.

**L'utilisation de la cartographie peptidique pour l'évaluation de la stabilité génétique (USP)**. Cette section supplémentaire est sans impact sur l'harmonisation car elle ne sert qu'en développement.

Les différences dans le texte de l'USP mentionnées ci-dessus n'affectent pas l'harmonisation.

Les textes des 3 pharmacopées sont donc considérés comme harmonisés.

## 2.2.56. ANALYSE DES ACIDES AMINÉS

La comparaison ci-après se rapporte aux textes *1. Amino Acid Analysis* de la Pharmacopée Japonaise XV et <1052> *Biotechnology-derived Articles – Amino Acid Analysis* de la Pharmacopée des Etats-Unis USP31 NF26 1[er] Supplément, et au chapitre *2.2.56. Analyse des acides aminés* de la Pharmacopée Européenne.

**Méthodes d'analyse des acides aminés : principes généraux (USP)**. L'USP a remplacé « le carbamate de 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyle ou l'*o*-phtalaldéhyde » par « le carbonate de 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyle ».

Ces réactifs sont différents mais compatibles et l'utilisation de l'un ou l'autre est sans effet sur l'harmonisation.

L'USP a ajouté un exemple détaillé pour décrire chacune des méthodes suivantes :

- Méthode 1 : détection post-colonne par la ninhydrine,
- Méthode 2 : dérivatisation post-colonne par l'OPA,
- Méthode 3 : dérivatisation précolonne par le PITC,
- Méthode 4 : dérivatisation précolonne par l'AQC,
- Méthode 5 : dérivatisation précolonne par l'OPA,
- Méthode 6 : dérivatisation précolonne par le DABS-Cl,
- Méthode 7 : dérivatisation précolonne par le FMOC-Cl,
- Méthode 8 : dérivatisation précolonne par le NBD-F.

Les exemples ci-dessus sont donnés à titre d'information supplémentaire et n'affectent pas l'harmonisation.

Les textes des 3 pharmacopées sont donc considérés comme harmonisés.

2.4.14. CENDRES SULFURIQUES

La comparaison ci-après se rapporte aux textes *2.44 Residue on Ignition Test* de la Pharmacopée Japonaise XV et <281> *Residue on Ignition* de la Pharmacopée des Etats-Unis USP32 NF27 1er Supplément, et au chapitre *2.4.14. Cendres sulfuriques* de la Pharmacopée Européenne.

La JP a ajouté en début de chapitre une partie introductive non harmonisée, signalée par des losanges noirs. Celle-ci ne figure dans le texte que pour plus ample information et n'affecte pas l'harmonisation.

Le texte de l'USP autorise la réalisation de l'essai à une température de calcination autre que 600 ± 50 °C si une monographie spécifique le prescrit. Il autorise de même l'utilisation d'un échantillon de masse autre que la masse usuelle de 1-2 g si une monographie spécifique le prescrit.

L'USP a par ailleurs ajouté une section, signalée par des losanges noirs, sur la réalisation de l'essai dans un four à moufle et sur la calibration de l'instrument.

Ces différences constatées dans le texte de l'USP n'affectent pas l'harmonisation.

Les textes des 3 pharmacopées sont donc considérés comme harmonisés.

NOTE : l'ICH a déclaré cette méthode interchangeable dans les régions impliquées dans le processus ICH.

2.6.12. CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE DES PRODUITS NON STÉRILES : ESSAIS DE DÉNOMBREMENT MICROBIEN

A la suite d'une évaluation des textes *4.05 Microbiological Examination of Non-sterile Products : I. Microbiological Examination of Non-sterile Products – Microbial Enumeration Tests* de la Pharmacopée Japonaise XV 1er Supplément et <61> *Microbiological Examination of Non-sterile Products : Microbial Enumeration Tests* de la Pharmacopée des Etats-Unis USP30 NF25, et du chapitre *2.6.12. Contrôle microbiologique des produits non stériles : essais de dénombrement microbien* de la Pharmacopée Européenne, les textes des 3 pharmacopées sont considérés comme harmonisés.

NOTE : l'ICH a déclaré cette méthode interchangeable dans les régions impliquées dans le processus ICH.

2.6.13. CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE DES PRODUITS NON STÉRILES : RECHERCHE DE MICROORGANISMES SPÉCIFIÉS

A la suite d'une évaluation des textes *4.05 Microbiological Examination of Non-sterile Products : II. Microbiological Examination of Non-sterile Products – Test for Specified Micro-organisms* de la Pharmacopée Japonaise XV 1er Supplément et <62> *Microbiological Examination of Non-sterile Products : Test for Specified Micro-organisms* de la Pharmacopée des Etats-Unis USP30 NF25, et du chapitre *2.6.13. Contrôle microbiologique des produits non stériles : recherche de microorganismes spécifiés* de la Pharmacopée Européenne, les textes des 3 pharmacopées sont considérés comme harmonisés.

NOTE : l'ICH a déclaré cette méthode interchangeable dans les régions impliquées dans le processus ICH.

2.9.7. FRIABILITÉ DES COMPRIMÉS NON ENROBÉS

A la suite d'une évaluation des textes *26. Tablet Friability Test* de la Pharmacopée Japonaise XV et <1216> *Tablet Friability* de la Pharmacopée des Etats-Unis USP31 NF26 1er Supplément, et du chapitre *2.9.7. Friabilité des comprimés non enrobés* de la Pharmacopée Européenne, les textes des 3 pharmacopées sont considérés comme harmonisés.

2.9.17. ESSAI DU VOLUME EXTRACTIBLE POUR LES PRÉPARATIONS PARENTÉRALES

La comparaison ci-après se rapporte aux textes *6.05 Test for Extractable Volume of Parenteral Preparations* de la Pharmacopée Japonaise XV et <1> *Injections* de la Pharmacopée américaine USP32 NF27 1er Supplément, et au chapitre *2.9.17. Essai du volume extractible pour les préparations parentérales* de la Pharmacopée Européenne.

La JP a ajouté en début de chapitre une partie introductive non harmonisée, signalée par des losanges noirs. Celle-ci ne figure dans le texte que pour plus ample information et n'affecte pas l'harmonisation.

L'USP a intégré le texte dans le chapitre général <1> *Injections*, dont il forme une partie spécifique intitulée *Determination of Volume of Injection in Containers*. Ceci n'affecte pas l'harmonisation.

Les textes des 3 pharmacopées sont donc considérés comme harmonisés.

NOTE : l'ICH a déclaré cette méthode interchangeable dans les régions impliquées dans le processus ICH.

2.9.26. SURFACE SPÉCIFIQUE PAR ADSORPTION GAZEUSE

La comparaison ci-après se rapporte aux textes *3.02 Specific Surface Area by Gas Adsorption* de la Pharmacopée Japonaise XV et <846> *Specific Surface Area* de la Pharmacopée des Etats-Unis USP31 NF26 1er Supplément, et au chapitre *2.9.26. Surface spécifique par adsorption gazeuse* de la Pharmacopée Européenne.

La JP a choisi d'exprimer toutes les températures de ce chapitre en degrés Celsius.

**Détermination multipoints (JP)**. La JP n'indique pas la signification de la constante 22400 dans la définition de la surface spécifique $S$ et n'exige pas d'essai de linéarité de la méthode.

**Détermination monopoint (JP)**. La JP n'indique pas la quantité équivalente de gaz correspondant à la valeur de $P/P_0$, qui est d'ailleurs moins précise (0,30) que dans les autres pharmacopées (0,300).

La JP ne suppose pas invariable la constante $C$ du produit.

**Mesure (JP)**. La JP ne spécifie de température nécessaire à la réalisation de l'essai pour aucun des 2 procédés.

La JP restreint sa mesure volumétrique aux appareils classiques et ne tient pas compte d'autres appareillages.

Les différences dans le texte de la JP mentionnées ci-dessus sont susceptibles d'affecter l'harmonisation.

Seuls sont donc considérés comme harmonisés les textes de la Ph. Eur. et de l'USP.

2.9.36. APTITUDE À L'ÉCOULEMENT DES POUDRES

La comparaison ci-après se rapporte aux textes *18. Powder Flow* de la Pharmacopée Japonaise XV et <1174> *Powder Flow* de la Pharmacopée des Etats-Unis USP31 NF26 1er Supplément, et au chapitre *2.9.36. Aptitude à l'écoulement des poudres* de la Pharmacopée Européenne.

**Ecoulement à travers un orifice (JP)**. La JP restreint l'utilisation aux orifices classiques et n'autorise pas l'emploi de vibrateurs ni d'orifices mobiles. Le résultat d'un essai utilisant la méthode de la JP sera compatible avec la Ph. Eur et l'USP. Un résultat d'essai répondant aux exigences de la Ph. Eur. ou de l'USP ne sera pas conforme à la JP en cas d'utilisation d'un vibrateur ou d'un orifice mobile.

2.9.37. MICROSCOPIE OPTIQUE

A la suite d'une évaluation des textes *3.04 Particle Size Determination* de la Pharmacopée Japonaise XV et <776> *Optical Microscopy* de la Pharmacopée des Etats-Unis USP31 NF26 2e Supplément, et du chapitre *2.9.37. Microscopie optique* de la Pharmacopée Européenne, les textes des 3 pharmacopées sont considérés comme harmonisés.

2.9.38. ESTIMATION DE LA DISTRIBUTION GRANULOMÉTRIQUE PAR TAMISAGE ANALYTIQUE

La comparaison ci-après se rapporte aux textes *3.04 Particle Size Determination* de la Pharmacopée Japonaise XV et <786> *Particle-size Distribution Determination by Analytical Sieving* de la Pharmacopée des Etats-Unis USP31 NF26 1[er] Supplément, et au chapitre *2.9.38. Estimation de la distribution granulométrique par tamisage analytique* de la Phamacopée Européenne.

**Mode opératoire − Tamisage à sec (JP)**. La JP permet de brosser la poudre présente sur la surface inférieure du tamis et de la combiner avec la fraction du tamis suivant.

Cette différence dans le texte de la JP est susceptible d'affecter l'harmonisation.

Seuls sont donc considérés comme harmonisés les textes de la Ph. Eur. et de l'USP.

5.1.4. QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE DES PRÉPARATIONS PHARMACEUTIQUES ET DES SUBSTANCES POUR USAGE PHARMACEUTIQUE NON STÉRILES

La comparaison ci-après se rapporte aux textes *12. Microbial Attributes of Non-sterile Pharmaceutical Products* de la Pharmacopée Japonaise XV 1[er] Supplément et <1111> *Microbiological Attributes of Non-sterile Pharmaceutical Products* de la Pharmacopée des Etats-Unis USP30 NF25, et du chapitre *5.1.4. Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles* de la Pharmacopée Européenne.

Une disposition spéciale, propre à la Ph. Eur., figure dans le tableau 5.1.4.-1 pour les préparations pour administration par voie orale contenant des matières premières d'origine naturelle. Le texte de la Ph. Eur. renvoie par ailleurs au chapitre *5.1.8*, où sont donnés les critères d'acceptation recommandés pour la qualité microbiologique des médicaments à base de plantes pour usage oral. Les parties correspondantes, qui n'entrent pas dans le champ de l'harmonisation des pharmacopées, figurent entre des losanges noirs (♦♦).

Ces différences dans le texte de la Ph. Eur. n'affectent pas l'harmonisation.

Les textes des 3 pharmacopées sont donc considérés comme harmonisés.

NOTE : l'ICH a déclaré ces textes interchangeables dans les régions impliquées dans le processus ICH.

# 5.9. POLYMORPHISME

**01/2008:50900**

# 5.9. POLYMORPHISME

Le polymorphisme (ou polymorphisme cristallin) est l'aptitude d'un composé à l'état solide à se présenter sous plusieurs formes cristallines différentes alors que sa composition chimique ne varie pas. L'état solide d'une molécule peut se présenter également sous une forme non cristalline désignée sous le terme d'amorphe.

Lorsque le phénomène est observé pour un corps simple (soufre par exemple), au terme de polymorphisme se substitue celui d'allotropie.

Le terme de pseudopolymorphisme est utilisé pour les solvates (dont les hydrates), dans lesquels un solvant participe à la maille cristalline en proportions stoechiométriques ; parfois, par extension, ce terme est employé également pour les composés d'inclusion, dans lesquels le solvant est emprisonné dans la maille en proportions variables. Toutefois, le terme « pseudopolymorphisme » est ambigu en raison de son utilisation dans des situations différentes ; il est donc préférable de ne retenir que les termes « solvates » et « hydrates ».

Lorsqu'une monographie indique qu'une substance présente le phénomène du polymorphisme, il peut s'agir d'un polymorphisme cristallin vrai, de l'existence de solvate, d'allotropie ou de l'existence d'une forme amorphe.

La constance de la composition chimique implique que toutes les formes cristallines et la forme amorphe d'une espèce donnée présentent un comportement chimique identique en solution ou en fusion ; en revanche, leurs caractéristiques physicochimiques et physiques (solubilité, dureté, compressibilité, masse volumique, point de fusion, etc.) et, par voie de conséquence, leur réactivité et leur biodisponibilité pourront être différentes à l'état solide.

Lorsqu'une molécule présente le phénomène du polymorphisme, la forme la plus stable thermodynamiquement est celle dont l'enthalpie libre est minimale à une température et une pression données. Les autres formes sont dites à l'état métastable. Aux conditions normales de température et de pression, une forme à l'état métastable peut rester inchangée ou peut présenter une transition vers une forme thermodynamiquement plus stable.

S'il existe plusieurs formes cristallines, l'une d'entre elles est thermodynamiquement plus stable à une pression et une température données. Une forme cristalline donnée peut constituer une phase qui est susceptible de se trouver en équilibre avec d'autres phases solides, et aussi avec les phases liquide et gazeuse.

Si chacune des formes cristallines est la plus stable dans un domaine donné de température, le passage de l'une à l'autre est réversible ; dans ce cas, la transition est dite énantiotrope. Au contraire, si seule une des formes est stable dans tout le domaine de température, la transition est irréversible ou monotrope. Le passage d'une phase à une autre est un équilibre de variance 1, ce qui explique qu'à une pression donnée cet état est caractérisé par une température dite de transition.

Les formes cristallines différentes ou solvates peuvent être générées par variation des conditions de cristallisation (température, pression, solvant, concentration, vitesse de cristallisation, ensemencement du milieu de cristallisation, présence et concentration d'impuretés, etc.).

L'étude du polymorphisme peut être réalisée en utilisant les techniques suivantes :

– diffraction des rayons X des poudres (*2.9.33*),
– diffraction des rayons X par un seul cristal,
– analyse thermique (*2.2.34*) (calorimétrie différentielle, thermogravimétrie, thermomicroscopie),
– microcalorimétrie,
– analyse de l'absorption de l'eau,
– microscopies optique et électronique,
– résonance magnétique nucléaire de l'état solide,
– spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*),
– spectrométrie Raman (*2.2.48*),
– mesure de la solubilité et de la vitesse intrinsèque de dissolution,
– mesure de la masse volumique.

Ces techniques sont souvent complémentaires et il est indispensable d'en utiliser plusieurs.

Les diagrammes pression/température et énergie/température basés sur des données analytiques sont des outils utiles pour connaître les relations énergétiques (énantiotropisme, monotropisme) et la stabilité thermodynamique de chaque modification d'un composé polymorphique.

Dans le cas des solvates, l'analyse calorimétrique différentielle et la thermogravimétrie doivent être privilégiées, associées à des mesures de solubilité et de vitesse intrinsèque de dissolution et à la diffraction des rayons X.

Dans le cas des hydrates, l'établissement des isothermes d'absorption/désorption d'eau doit être effectué afin de connaître les zones de stabilité relative.

En général, les hydrates sont moins solubles dans l'eau que les formes anhydres et les solvates sont moins solubles dans leur solvant que les formes non solvatées.

# 5.10. CONTRÔLE DES IMPURETÉS DANS LES SUBSTANCES POUR USAGE PHARMACEUTIQUE

01/2008:51000
corrigé 6.5

# 5.10. CONTRÔLE DES IMPURETÉS DANS LES SUBSTANCES POUR USAGE PHARMACEUTIQUE

**Préambule**

Les monographies de substances pour usage pharmaceutique de la Pharmacopée Européenne ont pour objectif d'assurer une qualité acceptable de ces substances pour les utilisateurs. Compte tenu du rôle que joue la Pharmacopée en matière de protection de la santé publique, il est indispensable que ses monographies permettent un contrôle adéquat des impuretés. Les exigences de qualité sont établies sur la base de considérations d'ordre scientifique, technique et réglementaire.

Les exigences relatives aux impuretés figurent d'une part dans les monographies spécifiques et d'autre part dans la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)*, qui sont complémentaires : les monographies spécifiques fixent les critères d'acceptation des impuretés, tandis que la monographie générale définit les exigences relatives à la qualification, l'identification et la déclaration des impuretés organiques éventuellement présentes dans les *substances actives*.

Les seuils de déclaration, d'identification et de qualification spécifiés dans la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)* s'appliquent à toutes les substances apparentées. Cependant, si une monographie ne comporte pas d'essai des substances apparentées fondé sur une méthode quantitative, la présence d'impuretés nouvelles à teneur supérieure à un des seuils risque de passer inaperçue car l'essai ne permet pas de les détecter.

Les exigences de la rubrique Substances apparentées de la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)*, notamment en ce qui concerne les seuils, ne s'appliquent pas aux excipients, de même que sont exclus des dispositions de cette rubrique les produits biologiques ou biotechnologiques, les oligonucléotides, les produits radiopharmaceutiques, les produits de fermentation et produits hémisynthétiques dérivés, les produits à base de plantes et les produits bruts d'origine animale ou végétale. Si les seuils indiqués dans la monographie générale ne s'appliquent pas, les concepts généraux de déclaration, d'identification (dans la mesure du possible) et de qualification des impuretés sont en revanche également valables pour ces classes de substances.

**Bases de l'élaboration des monographies de la Pharmacopée Européenne**

L'élaboration des monographies de la Pharmacopée Européenne concerne des substances présentes dans des médicaments ayant été autorisés par les autorités compétentes des Parties à la *Convention relative à l'élaboration d'une Pharmacopée Européenne*. Ces monographies ne couvrent donc pas nécessairement toutes les sources de substances pour usage pharmaceutique présentes sur le marché mondial.

Les impuretés organiques et inorganiques présentes dans les substances ayant été évaluées par les autorités compétentes sont de ce fait qualifiées du point de vue de leur innocuité à la teneur maximale autorisée (à la dose journalière maximale), à moins que de nouvelles données d'innocuité, postérieures à l'évaluation, ne justifient des limites plus basses.

Les monographies de substances pour usage pharmaceutique de la Pharmacopée Européenne sont élaborées au sein de groupes d'experts et de groupes de travail, qui travaillent en collaboration avec les autorités nationales de pharmacopée, les autorités compétentes en matière d'autorisation de mise sur le marché, les laboratoires de contrôle nationaux et le laboratoire de la Pharmacopée Européenne ; ils sont également assistés dans leur tâche par les producteurs de ces substances et/ou les fabricants de l'industrie pharmaceutique qui les utilisent.

**Contrôle des impuretés dans les substances pour usage pharmaceutique**

La qualité des substances, en ce qui concerne les impuretés, est contrôlée par un ensemble d'essais prescrits dans les monographies. Ces essais visent à couvrir les impuretés organiques et inorganiques pertinentes au vu des sources dont proviennent les substances actives contenues dans les médicaments autorisés.

Le contrôle des solvants résiduels fait l'objet de dispositions contenues dans la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)* et dans le chapitre général *5.4. Solvants résiduels*. Le certificat de conformité à une monographie de la Pharmacopée Européenne indique, pour une substance d'une source donnée, quels sont les solvants résiduels contrôlés ainsi que les critères d'acceptation spécifiés et la méthode de contrôle validée si elle diffère de celles décrites dans le chapitre général *2.4.24. Identification et contrôle des solvants résiduels*.

Les monographies de substances chimiques organiques comportent généralement un essai intitulé « Substances apparentées » qui couvre les impuretés organiques pertinentes. Il peut être complété par d'autres essais, spécifiques, lorsque l'essai de portée générale ne permet pas de contrôler une impureté donnée ou lorsque des raisons particulières (par exemple en rapport avec l'innocuité) justifient de prescrire un contrôle spécial.

Lorsqu'une monographie ne comporte pas d'essai « Substances apparentées » (ou équivalent) mais seulement des essais spécifiques, l'utilisateur d'une substance doit néanmoins s'assurer que le contrôle des impuretés organiques est satisfaisant ; celles dont la teneur est supérieure au seuil d'identification doivent être identifiées (dans la mesure du possible) et celles dont la teneur est supérieure au seuil de qualification doivent, sauf justification, être qualifiées (voir également ci-après sous Recommandations aux utilisateurs de monographies de substances actives).

Lorsque la monographie couvre des substances présentant des profils d'impuretés différents, elle peut soit contenir un essai des substances apparentées unique couvrant toutes les impuretés mentionnées dans la rubrique Impuretés, soit comporter plusieurs essais permettant le contrôle de tous les profils d'impuretés. Il est alors possible de vérifier la conformité à la monographie en appliquant seulement ceux des essais qui sont pertinents au vu du profil d'impuretés connu, pour la substance et la source considérées.

Des instructions relatives au contrôle des impuretés peuvent aussi figurer dans la rubrique Production d'une monographie, par exemple lorsque la seule méthode d'analyse appropriée au contrôle d'une impureté donnée doit être mise en oeuvre par le fabricant parce qu'elle est techniquement trop complexe pour être d'un usage général ou ne peut être appliquée à la substance pharmaceutique finale et/ou lorsque la validation du procédé de production (y compris l'étape de purification) constitue une garantie de contrôle suffisante.

**Rubrique Impuretés des monographies de substances actives**

La rubrique Impuretés d'une monographie donne la liste des impuretés (avec structure et dénomination chimiques dans la mesure du possible), généralement organiques, dont on sait qu'elles sont détectées par les essais prescrits dans la monographie. Cette information est basée sur les données disponibles lors de l'élaboration ou de la révision de la monographie, et n'est pas nécessairement exhaustive. La rubrique comprend les impuretés spécifiées et, si cela est indiqué, les autres impuretés décelables.

A toutes les *impuretés spécifiées* est associé un critère d'acceptation qui n'est pas supérieur à celui autorisé par les autorités compétentes.

Les *autres impuretés décelables* sont des impuretés potentielles de structure définie qui ne sont normalement pas présentes au-delà du seuil d'identification dans les substances entrant

5. Textes généraux

dans la composition de médicaments autorisés par les autorités compétentes des parties à la Convention. Elles sont citées pour information dans la rubrique Impuretés.

Si une impureté autre que spécifiée est détectée dans une substance active, il incombe à l'utilisateur de la substance de vérifier, en fonction de la teneur et de la nature de cette impureté ainsi que de la dose journalière maximale et du seuil d'identification/qualification approprié, si son identification/qualification est ou non requise aux termes de la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)*, rubrique Substances apparentées.

Il est à noter que des seuils spécifiques sont appliqués aux substances à usage exclusivement vétérinaire.

**Interprétation de l'essai des substances apparentées dans les monographies de substances actives**

Toute monographie spécifique portant sur une substance pour usage pharmaceutique doit être lue et interprétée conjointement avec la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)*.

Lorsqu'une monographie spécifie, pour les impuretés, un critère d'acceptation général (« toute autre impureté », « autres impuretés », « toute impureté ») qui équivaut à une teneur nominale supérieure au seuil d'identification applicable pour la substance considérée (voir monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)*), cette limite s'applique uniquement aux impuretés spécifiées citées dans la rubrique Impuretés. Si d'autres impuretés sont présentes, il convient de déterminer à la lumière des dispositions de la monographie générale s'il est nécessaire de les identifier (dans la mesure du possible), de les déclarer, de les spécifier et de les qualifier. Il incombe à l'utilisateur de la substance de déterminer la validité des critères d'acceptation pour les impuretés non citées sous la rubrique Impuretés ou citées comme autres impuretés décelables.

Les critères d'acceptation de l'essai des substances apparentées sont présentés de différentes façons dans les monographies existantes ; l'arbre de décision (figure 5.10.-1) peut être utilisé en tant qu'aide pour l'interprétation des critères généraux d'acceptation et de leur relation avec la section Impuretés de la monographie.

Les critères généraux d'acceptation applicables aux « autres » impuretés sont exprimés de diverses façons dans les monographies : « toute autre impureté », « autres impuretés », « toute impureté », « autres taches », « autres bandes », etc. Selon la nature de la substance active et le seuil d'identification qui lui est applicable, les critères généraux d'acceptation s'appliquent soit uniquement à certaines impuretés spécifiées, soit aux impuretés non spécifiées et à certaines impuretés spécifiées. En attendant l'adaptation rédactionnelle des monographies déjà publiées, pour y éliminer les ambiguïtés de terminologie, l'arbre de décision (figure 5.10.-1) peut être utilisé pour déterminer le critère d'acceptation à appliquer.

**Recommandations aux utilisateurs de monographies de substances actives**

Les monographies fournissent des spécifications visant à garantir que les substances dont les profils d'impuretés correspondent à ceux pris en compte lors de l'élaboration et/ou de la révision de la monographie sont de qualité appropriée. Il incombe à l'utilisateur de la substance de vérifier si la monographie permet un contrôle adéquat des impuretés pour une substance d'une source donnée, notamment par le biais de la procédure de certification de conformité aux monographies de la Pharmacopée Européenne.

Une monographie comportant un essai des substances apparentées fondé sur une méthode quantitative (par exemple, la chromatographie liquide, la chromatographie en phase gazeuse et l'électrophorèse capillaire) assure un contrôle adéquat des impuretés, pour une substance d'une source donnée, si les impuretés présentes à teneur supérieure au seuil d'identification applicable sont des impuretés spécifiées mentionnées dans la rubrique Impuretés.

Si la substance renferme des impuretés autres que celles mentionnées dans la rubrique Impuretés, il y a lieu de vérifier qu'elles sont détectables par la méthode décrite dans la monographie. Si tel n'est pas le cas, il faudra développer une nouvelle méthode et demander la révision de la monographie. Selon les teneurs détectées et les limites proposées, l'identification et/ou la qualification de ces impuretés seront à envisager.

Lorsqu'un essai des substances apparentées unique couvre plusieurs profils d'impuretés, seules sont à mentionner dans le certificat d'analyse les impuretés pertinentes pour le profil connu associé à une source particulière, à moins que le détenteur de l'autorisation de mise sur le marché n'utilise des substances actives présentant des profils d'impuretés différents.

**Identification des impuretés (attribution des pics)**

Lorsqu'une monographie spécifie une limite individuelle pour une impureté, il est souvent nécessaire de définir un moyen d'identifier cette impureté, par exemple à l'aide d'une substance de référence, d'un chromatogramme représentatif ou de la rétention relative. L'utilisateur peut juger nécessaire d'identifier des impuretés autres que celles pour lesquelles la monographie fournit un moyen d'identification, par exemple dans l'objectif de vérifier l'applicabilité de la spécification à un profil d'impuretés donné, par comparaison à la rubrique Impuretés. La Pharmacopée Européenne ne fournit pas d'autres substances de référence, chromatogrammes représentatifs ou informations sur les rétentions relatives que ceux indiqués dans la monographie. Il revient donc aux utilisateurs de mettre en oeuvre les techniques scientifiques d'identification disponibles.

**Nouvelles impuretés/Impuretés spécifiées présentes à une teneur supérieure à la limite spécifiée**

Lorsque l'utilisation d'un nouveau procédé de fabrication ou la modification d'un procédé établi conduit à l'apparition d'une nouvelle impureté, il est nécessaire d'appliquer les dispositions de la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)* concernant l'identification et la qualification, et de vérifier l'aptitude de la monographie à permettre le contrôle de cette impureté. Les certificats de conformité constituent un moyen de confirmer, pour une substance d'une source donnée, que la nouvelle impureté est adéquatement contrôlée, ou de proposer une méthode de contrôle avec un critère d'acceptation défini. Dans ce dernier cas, une révision de la monographie sera engagée.

Lorsque l'utilisation d'un nouveau procédé de fabrication ou la modification d'un procédé établi conduit à la présence d'une impureté spécifiée à une teneur supérieure à la limite spécifiée, il est nécessaire d'appliquer les dispositions de la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)* concernant la qualification.

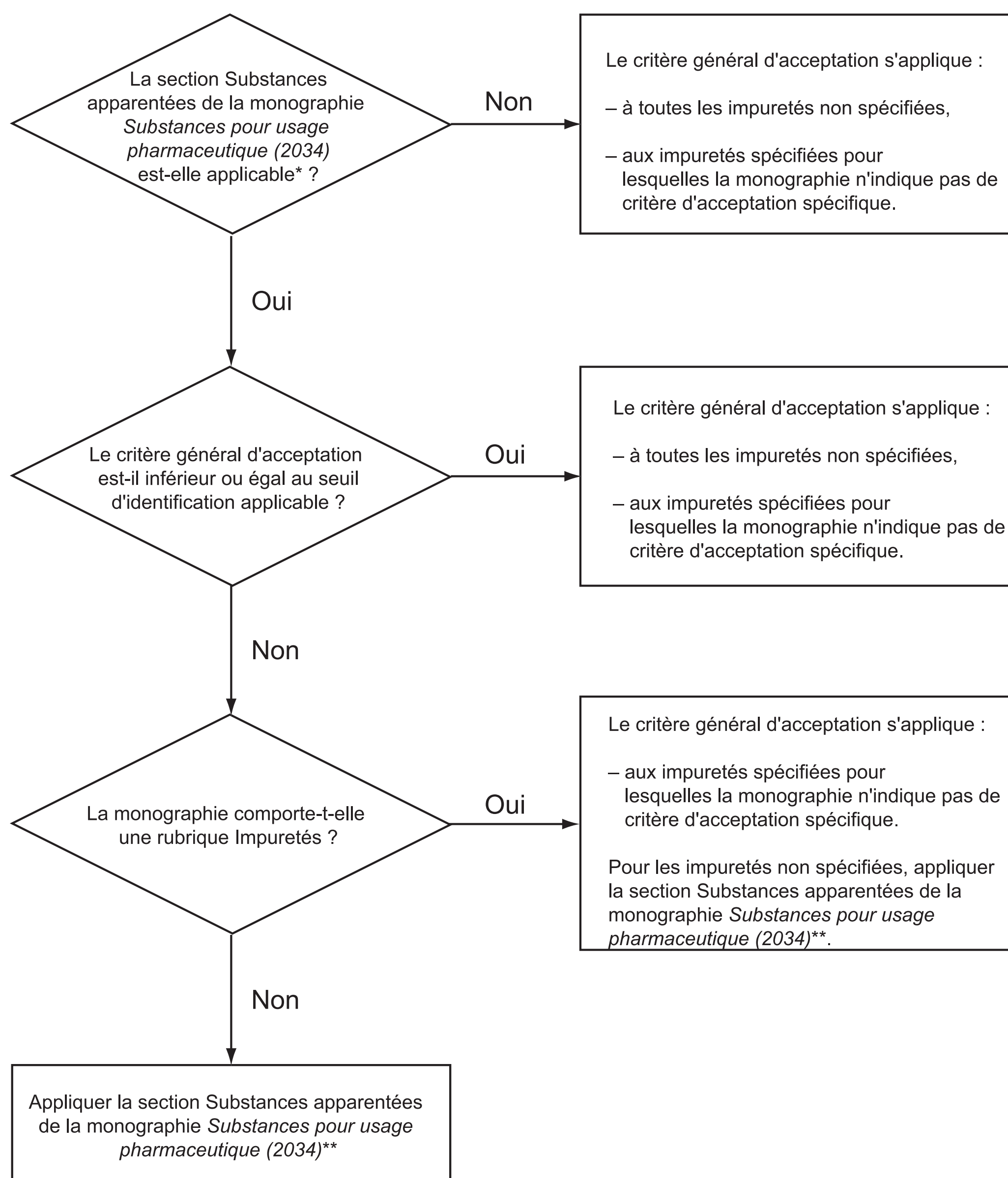
**Méthodes chromatographiques**

Le chapitre général *2.2.46. Techniques de séparation chromatographique* traite de différents aspects du contrôle des impuretés.

A toutes fins utiles, des informations sont disponibles via le site internet de la DEQM sur le nom commercial des colonnes et autres réactifs et équipements qui se sont avérés convenir lors de l'élaboration des monographies.

GLOSSAIRE

**Autres impuretés décelables** : impuretés potentielles de structure définie dont on sait qu'elles sont détectées par les essais de la monographie mais ne sont normalement pas présentes au-delà du seuil d'identification dans les substances entrant dans la composition de médicaments autorisés par les autorités compétentes des parties à la Convention. Elles font partie des impuretés non spécifiées et sont donc limitées par un critère d'acceptation global.




* Les exigences de cette section s'appliquent aux substances actives sauf : produits biologiques ou biotechnologiques, oligonucléotides, produits radiopharmaceutiques, produits de fermentation et produits hémisynthétiques dérivés, produits bruts d'origine animale ou végétale, produits à base de plantes.

** Application de la section Substances apparentées de la monographie *Substances pour usage pharmaceutique (2034)* :

– un critère d'acceptation individuel doit être défini pour toute impureté susceptible d'être présente à une teneur supérieure au seuil d'identification,
– toute impureté à laquelle est appliqué un critère d'acceptation supérieur au seuil d'identification doit être identifiée (dans la mesure du possible),
– toute impureté à laquelle est appliqué un critère d'acceptation supérieur au seuil de qualification doit être qualifiée.

Figure 5.10.-1. – *Arbre de décision relatif à l'interprétation des critères généraux d'acceptation pour les « autres » impuretés dans les monographies*

**Concentration nominale** : concentration d'une impureté calculée à partir de la concentration de la solution témoin prescrite et en tenant compte du facteur de correction prescrit.

**Impureté** : dans une substance pour usage pharmaceutique, tout composant autre que l'entité chimique définie comme étant la substance.

**Impureté identifiée** : impureté dont la caractérisation structurelle a été réalisée.

**Impureté non identifiée** : impureté dont la caractérisation structurelle n'a pas été réalisée et qui est uniquement définie par des propriétés analytiques d'ordre qualitatif (rétention relative, par exemple).

**Impureté non spécifiée** : impureté limitée par un critère d'acceptation global et non individuellement citée avec un critère d'acceptation spécifique.

**Impureté potentielle** : impureté théoriquement susceptible d'apparaître lors de la fabrication ou de la conservation. Elle peut ou non être effectivement présente dans la substance. Lorsque l'on sait qu'une impureté potentielle est détectée par les essais de la monographie mais n'est normalement pas présente dans les substances entrant dans la composition de médicaments autorisés par les autorités compétentes des parties à la Convention, elle sera citée dans la rubrique Impuretés sous *Autres impuretés décelables*, pour information.

**Impureté spécifiée** : impureté individuellement citée et limitée par un critère d'acceptation spécifique dans une monographie. Une impureté spécifiée peut être identifiée ou non.

**Limite d'exclusion** : dans les essais chromatographiques, teneur nominale jusqu'à laquelle les pics/signaux ne sont pas pris en compte dans le calcul de la somme des impuretés. La limite d'exclusion et le seuil de déclaration ont généralement la même valeur numérique.

**Qualification** : processus d'acquisition et d'évaluation des données établissant l'innocuité biologique d'une impureté spécifique ou d'un profil d'impuretés donné, à la teneur ou aux teneurs spécifiées.

**Seuil de déclaration** : limite au-delà de laquelle une impureté doit être déclarée.

**Seuil de qualification** : limite au-delà de laquelle il y a lieu de qualifier une impureté.

**Seuil d'identification** : limite au-delà de laquelle une impureté doit être identifiée.

**Substances apparentées** : dans les monographies, titre donné aux essais de portée générale pour les impuretés organiques.

# 5.11. RUBRIQUE CARACTÈRES DANS LES MONOGRAPHIES

**01/2008:51100**

# 5.11. RUBRIQUE CARACTÈRES DANS LES MONOGRAPHIES

Comme indiqué dans les Prescriptions Générales, les indications figurant dans la rubrique Caractères ne sont pas à interpréter de manière stricte et ne constituent pas des exigences. A titre d'information pour les utilisateurs, les méthodes recommandées à l'intention des auteurs des monographies, comme base pour les indications concernant l'hygroscopicité, la cristallinité et la solubilité, sont présentées ci-après.

## HYGROSCOPICITÉ

Cette méthode est à réaliser sur des produits satisfaisant aux essais de perte à la dessiccation ou de l'eau de la monographie. Elle donne une indication de l'hygroscopicité de la substance sans être une vraie mesure de celle-ci.

Utilisez une boîte de pesée en verre d'un diamètre extérieur de 50 mm et d'une hauteur de 15 mm. Pesez la boîte et son couvercle ($m_1$). Introduisez la quantité de substance spécifiée dans l'essai de perte à la dessiccation ou de l'eau, et pesez à nouveau ($m_2$). Placez la boîte non fermée dans un dessiccateur approprié contenant une solution saturée de chlorure ou de sulfate d'ammonium, à 25 °C, ou dans une armoire pour essais climatiques réglée à 25 ± 1 °C et à une humidité relative de 80 ± 2 pour cent. Laissez reposer pendant 24 h. Placez le couvercle sur la boîte et pesez ($m_3$).

Calculez l'augmentation de masse en pourcentage à l'aide de l'expression :

$$\frac{m_3 - m_2}{m_2 - m_1} \times 100$$

Le résultat est interprété comme indiqué ci-après :

– *déliquescente* : absorption d'eau suffisante pour qu'il y ait formation d'une solution,

– *très hygroscopique* : augmentation de masse supérieure ou égale à 15 pour cent,

– *hygroscopique* : augmentation de masse inférieure à 15 pour cent et supérieure ou égale à 2 pour cent,

– *légèrement hygroscopique* : augmentation de masse inférieure à 2 pour cent et supérieure ou égale à 0,2 pour cent.

## CRISTALLINITÉ

Cette méthode est employée pour établir le caractère cristallin ou amorphe d'une substance.

Sur une lame de verre propre, montez quelques particules de la substance à examiner dans de l'huile minérale. Examinez au microscope polarisant. Les particules cristallines présentent une biréfringence et des positions d'extinction sont observées lors de la rotation du support de la lame.

## SOLUBILITÉ

La quantité maximale de substance requise pour cet essai est de 111 mg (pour chaque solvant) et le volume maximal de solvant de 30 mL.

**Procédure de dissolution**

Agitez énergiquement pendant 1 min puis placez dans une enceinte thermostatée à une température de 25,0 ± 0,5 °C pendant 15 min. Si la dissolution de la substance est incomplète, agitez à nouveau pendant 1 min, puis placez à nouveau dans l'enceinte thermostatée pendant 15 min.

**Mode opératoire**

Dans un tube à bouchon rodé (16 mm × 160 mm), pesez 100 mg de substance finement pulvérisée (90) (*2.9.12*). Ajoutez 0,1 mL du solvant puis procédez comme décrit sous Procédure de dissolution. Si la dissolution est complète, la substance est *très soluble*.

Si la dissolution est incomplète, ajoutez 0,9 mL du solvant puis procédez comme décrit sous Procédure de dissolution. Si la dissolution est complète, la substance est *facilement soluble*.

Si la dissolution est incomplète, ajoutez 2,0 mL du solvant puis procédez comme décrit sous Procédure de dissolution. Si la dissolution est complète, la substance est *soluble*.

Si la dissolution est incomplète, ajoutez 7,0 mL du solvant puis procédez comme décrit sous Procédure de dissolution. Si la dissolution est complète, la substance est *assez soluble*.

Si la dissolution est incomplète, pesez 10 mg de substance finement pulvérisée (90) (*2.9.12*) dans un tube bouché, ajoutez 10,0 mL du solvant puis procédez comme décrit sous Procédure de dissolution. Si la dissolution est complète, la substance est *peu soluble*.

Si la dissolution est incomplète, pesez 1 mg de substance finement pulvérisée (90) (*2.9.12*) dans un tube bouché, ajoutez 10,0 mL du solvant puis procédez comme décrit sous Procédure de dissolution. Si la dissolution est complète, la substance est *très peu soluble*.

# 5.12. ÉTALONS DE RÉFÉRENCE

01/2008:51200

# 5.12. ÉTALONS DE RÉFÉRENCE

*Ce chapitre est publié à titre d'information.*

## 1. INTRODUCTION

Le terme « étalon de référence » est employé dans ce chapitre pour désigner l'ensemble des substances de référence, des préparations de référence et des spectres de référence.

Les étalons de référence sont souvent nécessaires pour réaliser un contrôle adéquat de la qualité des substances à usage pharmaceutique et des préparations pharmaceutiques.

Les étalons de référence sont établis selon des procédures appropriées et leur aptitude continue à l'emploi est contrôlée conformément à un programme prédéfini. Si un étalon de référence est nécessaire, il fait partie intégrante de la monographie de pharmacopée ou de la spécification du fabricant. Si une monographie ou un chapitre général renvoient à un étalon de référence de la Pharmacopée Européenne, ce dernier représentera la seule norme officielle à faire autorité en cas de doute ou de litige.

Les matériaux de référence et les matériaux de référence certifiés sont définis ci-après mais ne sont pas autrement traités dans ce chapitre.

En plusieurs parties du chapitre, les substances chimiques de référence, contrairement aux préparations biologiques de référence, font l'objet d'informations détaillées. Les principes généraux fournis s'appliquent également aux préparations biologiques de référence, mais au vu de la nature hétérogène de ces dernières et de leur fréquente complexité par rapport aux substances chimiques de référence, ce chapitre ne comprend pas d'informations relatives à leur utilisation, à leur établissement ou aux programmes de recontrôle qui leur sont appliqués. Dans le cas des étalons de référence de peptides et de protéines, une approche spécifique est utilisée pour certains aspects, notamment l'établissement d'une teneur déclarée ; ce chapitre ne traite pas de cette approche.

## 2. TERMINOLOGIE

*Etalon primaire.* Etalon dont il a été établi qu'il disposait de propriétés appropriées à l'usage considéré, la démonstration de sa conformité ayant été faite sans le comparer à un étalon existant.

*Etalon secondaire.* Etalon établi par comparaison avec un étalon primaire.

*Etalon international.* Un étalon international est un étalon primaire qui définit une Unité Internationale. L'équivalence d'un étalon international en Unités Internationales est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

*Etalon de référence de la Pharmacopée Européenne.* Un étalon de référence établi sous l'égide de et approuvé par la Commission Européenne de Pharmacopée.

*Substance Chimique de Référence de la Pharmacopée Européenne (SCR).* Substance ou mélange de substances destinés à être utilisés selon les indications d'une monographie ou d'un chapitre général de la Pharmacopée Européenne. Les Substances Chimiques de Référence de la Pharmacopée Européenne sont des étalons primaires, à l'exception de celles (notamment les antibiotiques) qui sont étalonnées en Unités Internationales. Ces dernières sont des étalons secondaires reliés à l'étalon international.

*Préparation Biologique de Référence de la Pharmacopée Européenne (PBR).* Substance ou mélange de substances destinés à être utilisés selon les indications d'une monographie ou d'un chapitre général de la Pharmacopée Européenne. Les Préparations Biologiques de Référence de la Pharmacopée Européenne sont soit des étalons secondaires étalonnés en Unités Internationales, soit des étalons primaires qui peuvent servir à définir une Unité Pharmacopée Européenne. D'autres valeurs assignées peuvent également être utilisées comme, par exemple, le titre en virus ou le nombre de bactéries.

*Matériau de Référence (MR).* Matériau ou substance dont une ou plusieurs valeurs de la (des) propriété(s) est (sont) suffisamment homogène(s) et bien définie(s) pour permettre de l'utiliser pour l'étalonnage d'un appareil, l'évaluation d'une méthode de mesurage ou l'attribution de valeurs aux matériaux.

*Matériau de Référence Certifié (MRC).* Matériau de référence, accompagné d'un certificat, dont une ou plusieurs valeur(s) de la (des) propriété(s) est (sont) certifiée(s) par une procédure qui établit son raccordement à une réalisation exacte de l'unité dans laquelle les valeurs de propriété sont exprimées et pour laquelle chaque valeur certifiée est accompagnée d'une incertitude à un niveau de confiance indiqué.

*NOTE* : les étalons de référence des pharmacopées se distinguent des matériaux de référence et des matériaux de référence certifiés qui peuvent être utilisés à des fins quantitatives, dans différents contextes et au moyen de diverses techniques analytiques. L'utilisation de matériaux de référence est exigée ou recommandée dans un certain nombre de monographies et chapitres généraux de la pharmacopée, notamment pour l'étalonnage ou la vérification de la performance satisfaisante d'instruments.

La spécificité des étalons de référence de pharmacopée a été officiellement reconnue en introduction du Guide ISO 34 - *Exigences générales pour la compétence des producteurs de matériaux de référence* : « Les étalons et substances des pharmacopées sont établis et distribués par les autorités de pharmacopée suivant le principe général du présent guide. Il est à noter, cependant, qu'une approche différente est utilisée par les autorités de pharmacopée pour donner à l'utilisateur les informations fournies par le certificat d'analyse et les dates d'expiration. En outre, l'incertitude relative aux valeurs assignées n'est pas indiquée car elle est négligeable par rapport aux limites définies pour les dosages selon la méthode spécifique de pharmacopée pour laquelle ils sont utilisés. »

## 3. UTILISATION DES ÉTALONS DE RÉFÉRENCE

Les étalons de référence sont utilisés pour l'identification, le contrôle de la pureté et le dosage des substances à usage pharmaceutique et des préparations pharmaceutiques. Il est démontré que les étalons de référence sont adaptés à l'usage auquel ils sont destinés ; ils ne sont pas nécessairement adaptés à d'autres usages. Si un étalon de référence doit être utilisé pour un usage autre que celui pour lequel il a été établi, sa conformité pour la nouvelle utilisation doit être pleinement démontrée. Toute valeur assignée à un étalon de référence est valable pour l'usage auquel il est destiné mais ne l'est pas nécessairement pour d'autre usages.

Un étalon de référence de la Pharmacopée Européenne avec une teneur/activité assignée et destiné au dosage d'une substance à usage pharmaceutique peut servir à déterminer la teneur de cette substance dans une préparation pharmaceutique si toutes les conditions suivantes sont remplies :

- la méthode de dosage chromatographique utilisée est celle qui est décrite dans la monographie de la substance active ;
- l'utilisateur vérifie que la méthode est applicable à la préparation pharmaceutique considérée (absence d'interférence) ;
- tout traitement préalable de l'échantillon (extraction, par exemple) est validé pour la préparation pharmaceutique considérée ;
- l'utilisation est approuvée par l'Autorité compétente.

Des étalons de référence sont également établis pour la détermination de la teneur des composants des drogues végétales et des préparations à base de drogues végétales. Il peut s'agir des substances actives elles-mêmes, de composants marqueurs utilisés pour la quantification, ou d'extraits. Les

étalons de référence sous forme d'extraits sont établis à l'aide d'échantillons bien caractérisés de substances actives ou de composants marqueurs.

La politique de la Pharmacopée Européenne est de fournir des étalons de référence en quantités adéquates destinées à un usage immédiat après ouverture du récipient. Toute utilisation dans d'autres conditions est de la responsabilité de l'analyste. Si un récipient n'a pas été ouvert et qu'il est conservé dans les conditions recommandées, il reste apte à l'emploi tant qu'il appartient au lot en vigueur. Les informations relatives aux numéros de lots en vigueur sont fournies dans le catalogue des étalons de référence disponible auprès de la Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé (DEQM). La conservation des solutions d'étalons de référence n'est pas recommandée, à moins que l'utilisateur ne démontre qu'elle est appropriée.

*Etalons secondaires*. Un étalon secondaire peut être utilisé à des fins de contrôle de routine de la qualité dans chacune des utilisations décrites ci-dessus pour les étalons primaires, sous réserve qu'il ait été établi par rapport à l'étalon primaire. Un étalon secondaire est établi et utilisé pour réduire l'utilisation de l'étalon primaire qui nécessite une caractérisation et une évaluation plus approfondies et qui peut n'être disponible qu'en quantité limitée. Un étalon secondaire est utilisé uniquement à la même fin que l'étalon primaire par rapport auquel il a été établi.

## 4. ÉTABLISSEMENT DES ÉTALONS DE RÉFÉRENCE

### 4-1. *ÉTALON PRIMAIRE*

Une substance ou une préparation destinée à l'établissement d'un étalon primaire est caractérisée par une variété de techniques analytiques choisies pour démontrer son aptitude à l'emploi.

Pour les substances à usage pharmaceutique et leurs impuretés, les parties appropriées du programme d'essais suivant sont généralement appliquées.

- Caractérisation de la substance (élucidation de la structure) par des attributs chimiques appropriés comme la formule structurelle, la formule empirique et la masse moléculaire. Parmi les techniques pouvant être utilisées figurent :
  - la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire ;
  - la spectrométrie de masse ;
  - la spectrophotométrie infrarouge ;
  - l'analyse de la composition élémentaire.
- Détermination de la pureté :
  - détermination de la teneur en impuretés organiques par une technique de séparation appropriée ou une méthode spectrométrique, dans les cas appropriés ;
  - détermination quantitative de l'eau ;
  - détermination de la teneur en solvants résiduels ;
  - détermination de la perte à la dessiccation, qui peut, dans certaines circonstances, remplacer les déterminations de l'eau et des solvants résiduels ;
  - détermination des impuretés inorganiques (essai des métaux lourds, des cendres sulfuriques, spectrométrie d'absorption atomique, spectrométrie en plasma à couplage inductif, fluorescence-X) ; les résultats obtenus ne servent pas à la détermination d'une teneur assignée, sauf s'ils ont un impact appréciable sur cette dernière ;
  - détermination de la pureté par une méthode absolue (par exemple, calorimétrie différentielle à balayage ou analyse de solubilité par phase, dans les cas appropriés ; les résultats de ces déterminations sont fournis à l'appui et en confirmation des résultats obtenus avec les techniques de séparation ; ils ne sont pas inclus dans le calcul de la valeur assignée).

Dans le cas d'une substance chimique de référence primaire établie à des fins de dosage, la teneur assignée est généralement calculée à partir des résultats des analyses effectuées pour la détermination des impuretés (organiques, inorganiques, eau et solvants) en appliquant le principe de la balance des masses ; d'autres procédés appropriés sont également utilisés.

Un rapport d'établissement concernant l'étalon de référence est préparé et approuvé par la personne qualifiée.

### 4-2. *ÉTALONS DE RÉFÉRENCE DE LA PHARMACOPÉE EUROPÉENNE*

Les étalons candidats sont soumis à des essais impliquant une grande variété de méthodes analytiques. L'étendue des essais et le nombre de laboratoires impliqués dépend de l'usage de l'étalon de référence. La conformité à la monographie concernée est généralement exigée, sauf exception justifiée.

Si une étude collaborative est menée pendant l'établissement, un protocole est fourni à chaque participant et seuls des résultats valables obtenus selon le protocole sont utilisés pour établir une valeur assignée ou confirmer la conformité.

Pour les substances chimiques de référence, les parties appropriées du programme suivant sont couramment appliquées.

4-2-1. **Identification**. En général, un lot sélectionné à partir de la production normale de la substance est satisfaisant. Il est établi qu'il satisfait aux exigences de la monographie ; l'élucidation complète de la structure est effectuée pour le premier lot.

4-2-2. **Essai des substances apparentées**. Un étalon de référence correspondant à une impureté est caractérisé pour l'identité et la pureté. Si un étalon de référence doit servir à la détermination de la teneur d'une impureté donnée, la teneur minimale est, de préférence, de 95,0 pour cent ; si cette teneur est atteinte, aucune valeur assignée n'est attribuée, la teneur étant considérée égale à 100,0 pour cent ; cette approximation est acceptable car elle sera sans effet notable sur la détermination des impuretés. S'il n'est pas possible d'obtenir cette teneur minimale, une teneur assignée est attribuée à l'étalon.

Si une impureté n'est pas disponible en quantité suffisante pour établir un étalon de référence, certaines autres possibilités restent disponibles :

- la préparation d'un étalon de référence contenant un mélange du (des) composé(s) et de la (des) impureté(s) ;
- la préparation d'un étalon de référence contenant un mélange d'impuretés spécifiées.

Si le mélange est également utilisé pour déterminer la teneur d'une impureté donnée, la teneur de l'impureté dans l'étalon de référence est déterminée par des méthodes de séparation appropriées et une valeur est assignée à l'étalon de référence.

4-2-3. **Dosage**

4-2-3-1. *Dosage chimique*. Si un étalon de référence doit servir à la détermination quantitative d'une substance active ou d'un excipient (étalon de dosage), les contrôles sont plus approfondis. En général, plusieurs laboratoires travaillent en collaboration pour examiner la substance proposée en suivant un protocole détaillé décrivant les procédures à suivre. Les résultats obtenus servent à assigner une teneur. Il est particulièrement important de quantifier les impuretés si un dosage sélectif est effectué. Dans ce cas, il est préférable d'examiner la substance proposée par des procédures analytiques supplémentaires scientifiquement justifiées et, si possible, comprenant des méthodes absolues.

Si un étalon de référence est exigé pour une méthode de dosage non chromatographique (colorimétrie ou spectrophotométrie dans l'ultraviolet, par exemple), les réactivités relatives ou les absorbances relatives des impuretés présentes dans une substance doivent être vérifiées pour garantir qu'elles ne sont pas sensiblement différentes de celles de la substance.

Il est préparé un protocole qui doit être strictement suivi par les participants de l'étude collaborative pour l'attribution de la teneur. Le protocole nécessite généralement :

– la détermination de la teneur en eau (ou de la perte à la dessiccation) ;
– l'estimation des impuretés organiques (y compris les solvants résiduels, dans les cas appropriés) en utilisant les techniques de séparation prescrites ;
– et éventuellement la détermination de la teneur de la substance par une méthode absolue ; cette détermination, qui n'est pas nécessairement effectuée par tous les participants, est réalisée à titre de confirmation et les résultats ne sont pas utilisés dans le calcul de la valeur assignée.

De plus, le protocole indique les essais de conformité du système et les critères d'acceptation pour chacun des essais effectués.

Sauf indication contraire, une valeur assignée est attribuée pour la substance ou la préparation telle qu'elle est présentée dans le récipient (en l'état) et le contenu ne doit pas être séché avant utilisation. En ce qui concerne les étalons de dosage préparés par lyophilisation, la teneur de la substance pure est indiquée en milligrammes ou en Unités Internationales par flacon.

4-2-3-2. *Dosage microbiologique*. En premier lieu, la conformité à la monographie d'un étalon de référence destiné à un dosage microbiologique doit être démontrée. En cas de résultats satisfaisants, un dosage microbiologique collaboratif est effectué, en utilisant l'étalon international. L'activité est exprimée en Unités Internationales. S'il n'existe pas d'étalon international, les Unités Pharmacopée Européenne sont utilisées. L'activité assignée est calculée sur la base des résultats de l'essai collaboratif. Divers critères de validité sont appliqués, comme le parallélisme, la linéarité et l'ajustement quadratique, conformément aux procédures statistiques habituelles (*5.3*). L'activité assignée et les limites de confiance associées sont calculées à partir de résultats statistiquement valables.

4-2-3-3. *Dosage des composants de drogues végétales et de préparations à base de drogues végétales*. L'étendue des essais auxquels sont soumis les étalons de référence utilisés dans les monographies relatives à des drogues végétales varie selon le type d'étalon de référence.

– Un composant actif ou un composant marqueur est caractérisé et évalué pour l'identité et la pureté ; une valeur de la teneur est assignée, sans tenir compte de la pureté.
– Un extrait sert d'étalon de référence si la substance active ou le marqueur n'est pas disponible en quantité suffisante. La teneur assignée de l'extrait est établie au moyen d'un essai collaboratif, en utilisant un échantillon bien caractérisé de la substance active (ou du marqueur) auquel une valeur doit être assignée.

4-2-4. **Rapport d'établissement**. Il est préparé un rapport contenant les résultats de l'étude d'établissement ainsi que les informations concernant l'utilisation de l'étalon de référence. Un rapport relatif à un étalon de dosage chimique présente, outre la valeur assignée à la substance, la justification de l'attribution de cette valeur. L'incertitude estimée relative à la teneur assignée est calculée et, si elle est inférieure à une valeur prédéfinie considérée comme négligeable par rapport aux critères d'acceptation fixés pour le dosage, l'étude est acceptée. Sinon, l'essai peut être répété, entièrement ou en partie, ou les limites définies pour la substance pharmaceutique peuvent être élargies. L'incertitude relative à la valeur assignée ne figure pas dans les informations fournies avec l'étalon de référence car, au moment de fixer la (les) limite(s) dans une monographie, il est tenu compte de la précision de la méthode et de l'incertitude liée à la valeur attribuée à l'étalon de référence.

4-3. *ÉTALON SECONDAIRE*

Un étalon secondaire doit présenter la (les) même(s) propriété(s) que l'étalon primaire en ce qui concerne le ou les essai(s) pour le(s)quel(s) il a été établi. L'étendue des contrôles n'est pas aussi importante que celle qui est exigée pour l'établissement d'un étalon primaire. L'étalon secondaire est établi par comparaison avec l'étalon primaire auquel il est relié. Chaque fois que possible, un étalon primaire officiel est utilisé pour l'établissement d'étalons secondaires.

**Identification**

– Pour une utilisation en spectrophotométrie infrarouge : les bandes d'absorption doivent correspondre, en position et en dimensions relatives, aux bandes d'absorption de l'étalon primaire.
– Pour une utilisation avec des techniques de séparation : la distance de migration, le temps de migration et le temps de rétention de l'étalon secondaire sont les mêmes que ceux de l'étalon primaire en ce qui concerne, respectivement, la chromatographie sur couche mince ou l'électrophorèse, l'électrophorèse capillaire et la chromatographie liquide ou en phase gazeuse.

**Essai de pureté**. Pour une utilisation avec des techniques de séparation : comme indiqué pour l'identification, mais si l'étalon est utilisé à des fins de quantification, une teneur en fonction du signal mesuré avec l'étalon primaire doit être établie.

**Dosage**. Les étalons secondaires sont dosés par rapport à un étalon primaire avec une teneur ou une activité assignée. La propriété pour laquelle une valeur doit être assignée à l'étalon secondaire est semblable, quant à son ampleur, à celle de l'étalon primaire de comparaison. Le nombre de répétitions indépendantes de la détermination à effectuer, de même que les critères d'acceptation, doivent être prédéfinis.

5. PRODUCTION, ÉTIQUETAGE, CONSERVATION ET DISTRIBUTION

5-1. *PRODUCTION*

Toutes les opérations sont effectuées conformément aux normes concernées des bonnes pratiques pour garantir la traçabilité et l'intégrité de l'étalon de référence. Le registre de production comprend des informations relatives au remplissage, à l'étiquetage et à la conservation. Les étalons de référence sont répartis dans des récipients sous des conditions de remplissage et de fermeture appropriées afin de garantir l'intégrité de l'étalon de référence. Les récipients utilisés peuvent être réutilisables ou non, mais on préférera utiliser des récipients non réutilisables pour réduire autant que possible les risques de décomposition, de contamination ou d'introduction d'humidité.

5-2. *ÉTIQUETAGE*

L'étiquetage comprend le nom de l'étalon de référence, le nom du fournisseur, le numéro de lot et toute autre information nécessaire à une utilisation correcte de l'étalon de référence. Si l'étalon de référence est utilisé comme étalon de dosage, les informations suivantes sont également fournies :

– la teneur pour cent assignée ;
– ou la teneur en milligrammes ou millilitres de l'entité chimique contenue dans le récipient ;
– ou l'activité assignée (pour les titrages biologiques ou microbiologiques), en unités par milligramme ou par flacon.

En ce qui concerne les étalons de référence de fabricants, l'étiquette indique une date de recontrôle ou de péremption. Pour les étalons de référence de la Pharmacopée Européenne, aucune date de recontrôle ou de péremption n'est spécifiée car le programme de recontrôle (voir ci-après) assure le monitorage pour garantir en permanence leur aptitude à l'emploi.

**Notices**. Il peut en outre être joint une notice explicative contenant des informations nécessaires pour une utilisation correcte de l'étalon de référence. Une notice explicative est considérée comme faisant partie de l'étiquetage. La notice comprend un chromatogramme si une monographie l'indique.

5-3. *CONSERVATION ET DISTRIBUTION*

Les étalons de référence doivent être conservés et distribués dans des conditions appropriées pour garantir une stabilité optimale.

**Etalons de référence de la Pharmacopée Européenne**. Les étalons de référence de la Pharmacopée Européenne sont pour la plupart conservés dans des chambres froides à une température contrôlée de 5 ± 3 °C. Cependant, un certain nombre d'étalons de référence relativement instables sont

conservés à – 20 ± 5 °C ou, dans quelques cas (par exemple, les préparations de virus vivant), à – 80 ± 10 °C ; les cultures cellulaires sont conservées sous azote liquide (– 180 °C).

Un conditionnement particulier est utilisé pour réduire autant que possible le risque de dégâts lors du transport.

Les étalons de référence normalement conservées à 5 ± 3 °C sont distribuées par courrier régulier car de brèves interruptions des conditions de température d'une conservation à long terme ne sont pas nuisibles à l'étalon de référence. Les étalons de référence conservés à – 20 °C sont conditionnés dans de la glace et livrés par express. Les étalons de référence conservés à – 80 °C ou conservés sous azote liquide sont conditionnés dans du dioxyde de carbone solide et livrés par express.

6. PROGRAMME DE RECONTROLE

Un système est établi et mis en application pour garantir en permanence l'aptitude à l'emploi des étalons de référence. Normalement, un programme de recontrôle est appliqué, en tenant compte des propriétés physicochimiques et des données de stabilité connues de l'étalon de référence. Les étalons de référence subissent régulièrement des essais de stabilité pendant la période de conservation. Il est appliqué un programme de contrôles visant à déceler à un stade précoce tout signe de décomposition à l'aide de techniques analytiques appropriées. Les méthodes employées sont choisies parmi celles qui ont été utilisées pendant la phase d'établissement afin de disposer de données de base.

La périodicité et l'étendue du recontrôle des étalons de référence dépend d'un certain nombre de facteurs comme :

– la stabilité,
– le récipient et son mode de fermeture,
– les conditions de conservation,
– l'hygroscopicité,
– la forme physique,
– l'utilisation prévue,
– la présentation (réutilisable ou non).

Les étalons de référence sont pour la plupart présentés sous forme de poudre solide, mais certains sont préparés sous forme de solution. Les étalons de référence doivent de préférence être présentés sous forme d'unités non réutilisables. Cependant, si l'étalon est présenté dans un récipient réutilisable, le recontrôle pourra être plus fréquent pour les substances hygroscopiques ou sensibles à l'oxygène. Les méthodes d'essai comprennent la détermination de la teneur en eau et des produits de décomposition (s'ils sont connus). La période de recontrôle peut être allongée si des données suffisantes le justifient. La variation maximale autorisée par rapport à la valeur assignée doit être prédéfinie et, en cas de dépassement, le lot doit à nouveau faire l'objet d'une procédure d'établissement ou être remplacé.

**Etalons de référence de la Pharmacopée Européenne**. Le programme de monitorage de la DEQM comprend une sélection des essais suivants, choisis car ils sont rapides, sensibles et applicables à de petites quantités :

– détermination de la teneur en eau, perte à la dessiccation et/ou analyse thermogravimétrique,
– estimation des impuretés par des techniques de séparation indicatrices de la stabilité,
– dans les cas appropriés, détermination de la pureté molaire par calorimétrie différentielle à balayage,
– application d'autres essais spécifiques permettant de déceler des impuretés.

Toute différence significative observée par rapport au dernier examen entraînera un examen plus approfondi du lot et, si nécessaire, l'établissement d'un lot de remplacement.

# 5.14. MÉDICAMENTS DE TRANSFERT GÉNÉTIQUE POUR USAGE HUMAIN

**01/2010:51400**

# 5.14. MÉDICAMENTS DE TRANSFERT GÉNÉTIQUE POUR USAGE HUMAIN

*Ce chapitre général est publié à titre d'information.*

*Ce chapitre général contient une série de textes relatifs aux médicaments de transfert génétique pour usage humain. Les textes définissent les exigences applicables à la production et au contrôle de ces produits. Pour un médicament spécifique, l'application de ces exigences et la nécessité éventuelle d'essais supplémentaires sont décidées par l'Autorité compétente. Les textes sont conçus pour être appliqués aux produits approuvés ; la nécessité de leur application partielle ou totale aux produits utilisés au cours des différentes phases d'essais cliniques est décidée par l'Autorité compétente. Les dispositions du chapitre n'excluent pas l'utilisation de méthodes alternatives de production et de contrôle acceptables par l'Autorité compétente.*

*Des recommandations supplémentaires détaillées sur les médicaments de transfert génétique pour usage humain sont fournies par la Note explicative relative à la qualité et aux aspects précliniques et cliniques des médicaments de transfert génétique (CPMP/BWP/3088/99) et la Note explicative relative au développement et à la production des vecteurs lentiviraux (CHMP/BWP/2458/03) du Comité des médicaments pour usage humain (ainsi que les révisions ultérieures de ces documents).*

DÉFINITION

Aux fins de ce chapitre général, on entend par médicament de transfert génétique tout produit obtenu par un ensemble de procédés de fabrication visant au transfert, *in vivo* ou *ex vivo*, d'un gène prophylactique, diagnostique ou thérapeutique (à savoir un morceau d'acide nucléique), vers des cellules humaines/animales et son expression consécutive *in vivo*. Le transfert de gène implique un système d'expression appelé vecteur, qui peut être d'origine virale ou non-virale. Ce vecteur peut aussi être inclus dans une cellule humaine ou animale.

*Vecteurs recombinants, tels que les vecteurs viraux ou plasmidiques*. Les vecteurs recombinants sont soit injectés directement dans le corps du patient (transfert génétique *in vivo*), soit transférés dans des cellules hôtes avant administration de ces cellules génétiquement modifiées à l'homme (transfert génétique *ex vivo*). Les vecteurs viraux sont dérivés de divers virus (adénovirus, poxvirus, rétrovirus, lentivirus, virus adéno-associés, herpèsvirus, par exemple). Ces vecteurs peuvent être réplicatifs, non réplicatifs ou réplicatifs conditionnels. Les vecteurs plasmidiques incluent des acides nucléiques dans une formulation simple (ADN nu, par exemple) ou complexés à des molécules diverses (vecteurs synthétiques comme des lipides ou des polymères). Le matériel génétique transféré par les médicaments de transfert génétique est constitué de séquences nucléotidiques pouvant coder notamment des produits du gène, des produits de la transcription antisens ou des ribozymes. Les oligonucléotides synthétisés chimiquement ne sont pas couverts par ce chapitre général. Après transfert, le matériel génétique peut demeurer soit cytoplasmique, soit épisomique, ou être intégré au génome d'une cellule hôte, selon le statut du vecteur (intégratif ou non).

*Cellules génétiquement modifiées*. Les cellules génétiquement modifiées, eucaryotes ou bactériennes, sont modifiées par des vecteurs pour exprimer un produit voulu.

PRODUCTION

**Substances utilisées en production**. Les matières premières utilisées dans le procédé de fabrication, y compris lors de l'établissement du lot de semence virale et des banques de cellules, dans les cas appropriés, sont qualifiées. Sauf exception justifiée, toutes les substances utilisées sont produites dans le cadre d'un système de management de la qualité reconnu utilisant un outil de production approprié. Des spécifications adéquates sont établies pour en contrôler notamment l'identité, l'activité (dans les cas appropriés), la pureté et l'innocuité en termes de qualité microbiologique et de contamination par les endotoxines bactériennes. La qualité de l'eau utilisée satisfait aux monographies pertinentes correspondantes (*Eau purifiée (0008), Eau hautement purifiée (1927), Eau pour préparations injectables (0169)*). Lorsque du sérum bovin est utilisé, il satisfait à la monographie *Sérum bovin (2262)*. L'utilisation d'antibiotiques est évitée autant que possible lors de la production.

**Sécurité virale**. Les exigences du chapitre *5.1.7* s'appliquent.

**Encéphalopathies spongiformes transmissibles** (*5.2.8*). Une évaluation du risque d'encéphalopathie spongiforme transmissible lié au produit est effectuée et les mesures appropriées sont prises pour réduire un tel risque au minimum.

## Vecteurs recombinants

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Pour les vecteurs viraux, la production est basée sur un système de banque de cellules et un système de lot de semence virale, chaque fois que possible.

Pour les vecteurs plasmidiques, la production est basée sur un système de banque de cellules bactériennes.

Il doit avoir été établi que le procédé de production utilisé donne un vecteur de qualité reproductible. Sauf exception justifiée et autorisée, le vecteur contenu dans le produit final n'aura pas subi, depuis le lot de semence primaire, un nombre de passages ou de subcultures supérieur à celui utilisé pour préparer le vecteur qui a satisfait aux essais cliniques en termes d'innocuité et d'efficacité.

*SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VECTEUR*

Les substrats utilisés satisfont aux exigences appropriées de la Pharmacopée Européenne (*5.2.2, 5.2.3* et section Cellules bactériennes utilisées pour la production de vecteurs plasmidiques pour usage humain).

*CARACTÉRISATION DU VECTEUR*

Les données historiques de la construction du vecteur sont accompagnées par des pièces justificatives ; parmi ces données figurent l'origine du vecteur et sa manipulation ultérieure, notamment les régions supprimées ou modifiées.

Le vecteur est caractérisé au moyen de méthodes appropriées et validées.

La stabilité génétique du vecteur à un niveau de passage au moins égal au niveau de passage maximal, ou à un niveau de doublement de population au moins égal au niveau de doublement de population maximal de la lignée cellulaire, qui est utilisé pour la production est évaluée par des méthodes appropriées.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

Toute manipulation de la banque de cellules et des cultures cellulaires qui en sont issues est faite dans une zone où aucune autre cellule ni aucun autre vecteur ne sont manipulés en même temps. Tout matériel d'origine humaine ou animale utilisé dans la préparation de suspensions cellulaires et de milieux de culture est qualifié. La pureté de la récolte est vérifiée par des essais appropriés comme défini dans les sections spécifiques correspondantes.

*RÉCOLTE PURIFIÉE*

La substance active en vrac est définie comme un lot de vecteurs recombinants purifiés (vecteurs viraux, plasmides nus ou complexés).

*LOT FINAL*

Sauf justification et autorisation contraires, la formulation et la distribution du vrac final s'effectuent dans des conditions d'asepsie en utilisant des récipients stériles (*3.2*).

5. Textes généraux

La stabilité du lot final est évaluée au moyen de protocoles de stabilité parmi lesquels figurent la durée, les conditions de conservation, le nombre de lots à examiner, le programme d'essais et les dosages à effectuer.

DOSAGE ET ESSAI

Les médicaments de transfert génétique satisfont aux dosages et essais décrits dans les sections spécifiques correspondantes.

## Cellules génétiquement modifiées

En ce qui concerne les cellules devant être modifiées avec un vecteur recombinant, les données relatives au vecteur recombinant sont détaillées ci-dessus, sous Vecteurs recombinants.

PRODUCTION

*SUBSTRAT CELLULAIRE*

En ce qui concerne les cellules xénogéniques, y compris bactériennes, un système de banques de cellules comprenant une banque de cellules primaire et des banques de cellules de travail est établi.

En ce qui concerne les cellules autologues et allogéniques, un système de banques de cellules comprenant une banque de cellules primaire et des banques de cellules de travail est établi chaque fois que possible.

*TRANSFECTION / TRANSDUCTION*

Les cellules sont transfectées ou transduites à l'aide d'un vecteur recombinant (plasmidique ou viral) qualifié, comme décrit sous Vecteurs recombinants ; le procédé est validé. Elles sont manipulées dans des conditions d'asepsie, dans une zone où aucune autre cellule ni aucun autre vecteur ne sont manipulés en même temps. Tous les réactifs utilisés lors des étapes de la manipulation des cellules sont pleinement qualifiés. Sauf exception justifiée et autorisée, l'utilisation d'antibiotiques est évitée. La transfection ou la transduction sont effectuées dans des conditions d'asepsie.

*LOT FINAL*

En cas de conservation par congélation, la viabilité des cellules génétiquement modifiées est évaluée avant congélation et après décongélation.

Si les cellules ne sont pas utilisées dans un bref délai, la stabilité est déterminée en vérifiant la viabilité cellulaire et l'expression de l'insert génétique.

En cas d'encapsulation des cellules génétiquement modifiées avant l'implantation chez l'homme, tout composant de la capsule utilisé est considéré comme faisant partie du produit final. Il fait donc l'objet d'un contrôle qualité et est pleinement caractérisé (intégrité physique, perméabilité sélective, stérilité, par exemple).

DOSAGE ET ESSAI

Parmi les contrôles des cellules xénogéniques, allogéniques ou autologues figurent les contrôles suivants :

- identité, numération et viabilité des cellules,
- intégrité globale, fonctionnalité, nombre de copies par cellule, transfert et efficacité de l'expression de l'insert génétique,
- contrôles microbiologiques (*2.6.1* ou *2.6.27*), teneur en endotoxines, contamination par les mycoplasmes (*2.6.7*), contamination par des virus parasites et dans les cas appropriés, génération de vecteurs réplicatifs.

Si nécessaire, l'Autorité compétente peut approuver un programme de contrôles réduit du fait d'une disponibilité limitée des cellules. Si nécessaire, du fait de contraintes de temps, le produit peut être libéré pour emploi avant la fin de certains essais.

## VECTEURS PLASMIDIQUES POUR USAGE HUMAIN

DÉFINITION

Les vecteurs plasmidiques pour usage humain sont des formes circulaires d'ADN bactérien double brin portant un gène d'intérêt ou une séquence nucléotidique codant pour des séquences antisens ou des ribozymes et sa cassette d'expression ; ils sont amplifiés dans des bactéries sous forme extrachromosomique. Les vecteurs plasmidiques servent à transférer du matériel génétique dans des cellules humaines somatiques *in vivo* ou à modifier génétiquement des cellules autologues, allogéniques, xénogéniques ou bactériennes avant administration à l'homme. Les vecteurs plasmidiques peuvent se présenter sous forme d'ADN nu ou être formulés avec des systèmes synthétiques de transfert comme des lipides (lipoplexes), des polymères (polyplexes) et/ou des ligands peptidiques qui facilitent le transfert à travers la membrane cellulaire et la libération dans la cellule, ou qui permettent une libération ciblée via des récepteurs spécifiques.

Les plasmides formulés avec des systèmes synthétiques de transfert n'entrent pas dans le champ d'application de cette section.

PRODUCTION

*CONSTRUCTION DU PLASMIDE*

Un vecteur plasmidique typique est composé :

- de la structure de base du vecteur plasmidique qui contient de nombreux sites de reconnaissance des endonucléases de restriction pour l'insertion de l'insert génétique et des éléments bactériens nécessaires à la production du plasmide comme des marqueurs génétiques sélectifs pour l'identification des cellules porteuses du vecteur recombinant ;
- des éléments génétiques régulateurs requis pour faciliter l'expression de l'insert génétique ;
- de l'insert génétique ;
- d'un signal de polyadénylation.

Une description complète de l'ADN plasmidique, y compris sa séquence nucléotidique, est fournie avec l'identification, la source, les moyens d'isolement et la séquence nucléotidique de l'insert génétique. Les informations relatives à la source et à la fonction des composants du plasmide, comme l'origine de la réplication, les promoteurs viraux et eucaryotes et les gènes codant pour les marqueurs sélectifs, sont consignées.

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

**Banques de cellules**. La production des vecteurs plasmidiques est basée sur un système de banques de cellules bactériennes avec génération et caractérisation d'une banque de cellules primaire (BCP), de banques de cellules de travail (BCT) et des cellules de fin de production (CFP), qui satisfont à la section Cellules bactériennes utilisées pour la fabrication de vecteurs plasmidiques pour usage humain. Les matières premières utilisées lors du procédé de fabrication, y compris l'établissement des banques de cellules, sont qualifiées.

**Techniques de sélection**. Sauf exception justifiée et autorisée, les gènes de résistance aux antibiotiques utilisés comme marqueurs génétiques sélectifs, en particulier dans le cas d'antibiotiques d'utilité clinique, ne sont pas inclus dans le vecteur plasmidique. D'autres techniques de sélection du plasmide recombinant sont préférables.

**Etalons de référence**. Un lot approprié du plasmide formulé, ayant de préférence fait l'objet d'une évaluation clinique, est complètement caractérisé et retenu pour servir d'étalon de référence si nécessaire lors des essais de contrôle de routine.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

L'ADN plasmidique est transféré dans les cellules bactériennes de la souche hôte et un clone unique de bactéries transformées est utilisé pour la création de la BCP. La BCT est ensuite dérivée de la BCP. Les CFP sont obtenues à partir de la BCT par fermentation dans les conditions de production.
L'ADN plasmidique est isolé à partir des cellules récoltées par une étape d'extraction et purifié pour obtenir le produit en vrac.

Sauf exception justifiée et autorisée, les gradients de densité chlorure de césium-bromure d'éthidium ne sont pas utilisés en production.

*PLASMIDE PURIFIÉ*

Le procédé de production est optimisé afin de supprimer les impuretés de façon reproductible tout en préservant l'activité du produit. Les exigences de contrôle d'une impureté considérée dépendent des points suivants :

– la capacité des procédés de fabrication et de purification à supprimer ou inactiver l'impureté, démontrée par une validation du procédé utilisant des méthodes spécifiques de quantification ;
– la toxicité potentielle associée à l'impureté ;
– la diminution potentielle de l'efficacité du produit de l'insert génétique associée à l'impureté.

Si la résistance sélective à des antibiotiques spécifiques a été utilisée pour la sélection, des données provenant des études de validation des procédures de purification sont exigées pour démontrer la capacité d'élimination des antibiotiques résiduels.

Des contrôles appropriés en cours de production, comme par exemple le contrôle de la quantité et de la forme du plasmide à l'issue des étapes d'extraction ou le contrôle de la quantité d'endotoxines à l'issue des étapes d'extraction, sont effectués pour garantir que le procédé est sous contrôle continu.

Seul un lot de plasmide purifié qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé.

**Identité et intégrité du plasmide purifié**. L'identité et l'intégrité du plasmide purifié sont établies par des méthodes appropriées comme un séquençage ou des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) ; l'analyse par enzyme de restriction peut être utilisée si elle est suffisante pour déceler d'éventuelles modifications critiques dans le plasmide et confirmer l'identité du plasmide.

**ADN plasmidique**. Les indications suivantes sont données à titre d'exemple.

Les concentrations en ADN supérieures à 500 ng/mL peuvent être déterminées par mesure de l'absorbance à 260 nm.
Une solution d'ADN double brin à 50 µg/mL présente une absorbance de 1 (absorbance spécifique de 200).

Les concentrations en ADN inférieures à 500 ng/mL sont déterminées après incubation avec des colorants fluorescents qui se lient de manière spécifique à l'ADN double brin, en utilisant un étalon d'ADN de référence pour établir une courbe d'étalonnage.

La chromatographie liquide peut également être utilisée pour déterminer la concentration en ADN plasmidique à l'aide d'un étalon de référence. Dans certains cas, l'électrophorèse capillaire est aussi acceptable.

**Formes d'ADN**. L'ADN plasmidique est caractérisé en termes de proportions entre les formes superenroulées, multimériques, à monomères relâchés et linéaires, en utilisant des méthodes analytiques appropriées dont des exemples sont donnés ci-après. Pour la quantification des formes superenroulées, la chromatographie liquide haute performance (CLHP) par échange d'anions et l'électrophorèse capillaire peuvent être utilisées. L'électrophorèse capillaire convient aussi pour la quantification des autres formes.

**ADN résiduel de la cellule hôte**. La teneur en ADN résiduel de la cellule hôte est déterminée par une méthode appropriée, sauf si la validation du procédé a démontré une élimination appropriée de cette substance. La PCR quantitative est recommandée du fait de sa sensibilité et de sa spécificité, mais d'autres techniques appropriées peuvent également être utilisées.

**ARN résiduel**. La teneur en ARN résiduel est déterminée, sauf si la validation du procédé a démontré une élimination appropriée de cette substance. La CLHP en phase inverse peut être utilisée ou la PCR quantitative après transcription inverse (*2.6.21*) si une limite de détection plus basse est nécessaire.

**Protéines résiduelles de la cellule hôte**. La concentration en protéines résiduelles de la cellule hôte est déterminée grâce à un dosage normalisé des protéines (*2.5.33*), une électrophorèse SDS-PAGE suivie d'une coloration à l'argent ou un immunodosage spécifique comme les essais par western blot ou ELISA, sauf si la validation du procédé a démontré une élimination appropriée de ces substances.

**Contrôle microbiologique**. Selon la préparation considérée, elle satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*) ou la charge microbienne est déterminée (*2.6.12*).

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : inférieur à la limite approuvée pour la préparation considérée.

*VRAC FINAL*

Plusieurs récoltes purifiées peuvent être mélangées lors de la préparation du vrac final. Un stabilisant et d'autres excipients peuvent être ajoutés. Le produit formulé est filtré sur un filtre antibactérien.
Seul un vrac final qui satisfait à l'essai ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité.

*LOT FINAL*

Seul un lot final qui satisfait à chacun des essais décrits sous Identification, Essai et Dosage peut être libéré.

IDENTIFICATION

Le vecteur plasmidique est identifié par une analyse par enzyme de restriction ou par séquençage. L'essai d'activité biologique sert également à identifier le produit.

ESSAI

Parmi les essais effectués sur le lot final figurent les essais suivants.

**Aspect**.

**pH** (*2.2.3*) : dans les limites approuvées pour la préparation considérée.

**Volume extractible** (*2.9.17*). La préparation satisfait à l'essai du volume extractible.

**Humidité résiduelle** (*2.5.12*) : dans les limites approuvées pour la préparation cryodesséchée considérée.

**Formes d'ADN**. Le pourcentage de la forme spécifique monomérique superenroulée est déterminé comme décrit pour le plasmide purifié.

**Stérilité** (*2.6.1*). La préparation satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : inférieur à la limite approuvée pour la préparation considérée.

DOSAGE

**ADN plasmidique** : au minimum la quantité indiquée sur l'étiquette, déterminé par exemple, par l'une des méthodes suivantes.

Les concentrations en ADN supérieures à 500 ng/mL peuvent être déterminées par mesure de l'absorbance à 260 nm.
Une solution d'ADN double brin à 50 µg/mL présente une absorbance de 1 (absorbance spécifique de 200).

Les concentrations en ADN inférieures à 500 ng/mL sont déterminées après incubation avec des colorants fluorescents qui se lient de manière spécifique à l'ADN double brin, en utilisant un étalon d'ADN de référence pour établir une courbe d'étalonnage.

La chromatographie liquide peut également être utilisée pour déterminer la concentration en ADN plasmidique à l'aide d'un étalon de référence. Dans certains cas, l'électrophorèse capillaire est aussi acceptable.

**Activité biologique**. Chaque fois que possible, l'activité biologique est évaluée au moyen de biodosages *in vitro* ou *in vivo*. Un étalon de référence représentatif bien défini est nécessaire comme témoin positif pour le dosage. Les biodosages utilisés pour mesurer l'activité des vecteurs plasmidiques impliquent généralement la transfection *in vitro* d'une lignée cellulaire pertinente, suivie de certaines mesures fonctionnelles de l'insert génétique exprimé. De tels dosages fonctionnels fournissent des informations sur l'activité du produit codé par l'insert génétique plutôt que sur le niveau d'expression de l'insert génétique lui-même.

Il peut être nécessaire de compléter le biodosage par des dosages par western blot et ELISA afin d'évaluer l'intégrité et la quantité du produit exprimé.

### ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- la concentration en ADN plasmidique,
- la dose humaine recommandée,
- pour les préparations cryodesséchées :
  - le nom et le volume de liquide à ajouter pour la reconstitution,
  - la durée de validité après reconstitution.

## CELLULES BACTÉRIENNES UTILISÉES POUR LA PRODUCTION DE VECTEURS PLASMIDIQUES POUR USAGE HUMAIN

La production de vecteurs plasmidiques pour usage humain repose sur l'utilisation d'un système de banques de cellules bactériennes, avec génération et caractérisation d'une banque de cellules primaire (BCP), de banques de cellules de travail (BCT) et de cellules de fin de production (CFP). Une banque de cellules bactériennes destinée à la production de vecteurs plasmidiques se compose d'un ensemble de flacons contenant des cellules bactériennes de composition uniforme, conservées dans des conditions définies et obtenues à partir d'un mélange de cellules issues d'un clone unique d'une souche hôte transformée.

| Essai | Souche hôte | BCP | BCT | CFP* |
|---|---|---|---|---|
| **Identité et pureté** | | | | |
| Viabilité | + | + | + | + |
| Caractérisation de la souche bactérienne | + | + | − | + |
| Génotypage / phénotypage | + | + | − | + |
| Présence du plasmide | | | | |
| – Séquence de l'ADN plasmidique | − | + | − | + |
| – Nombre de copies | − | + | + | + |
| – Carte de restriction | − | + | + | + |
| – Pourcentage de cellules ayant retenu le plasmide | − | + | + | + |
| **Agents étrangers** | | | | |
| Pureté par étalement sur boîte | + | + | + | + |
| Présence de bactériophages | + | + | − | + |

* Les CFP sont des cellules à un niveau de passage au moins équivalent à celui utilisé en production. Les contrôles sont à effectuer 1 fois, pour valider chaque nouvelle BCT, sauf pour la pureté qui est contrôlée à chaque fermentation.

La BCP dispose d'un historique connu et documenté ; elle est de préférence issue d'une source déposée et qualifiée. La BCT est produite par subculture d'un ou plusieurs flacons constituant la BCP. Les méthodes et réactifs utilisés pour établir la banque et les conditions de conservation sont documentés.

Les BCP et BCT sont qualifiées au moyen d'essais effectués sur une partie aliquote du matériel contenu dans la banque ou sur une subculture de la banque de cellules.

Le tableau suivant indique les essais à effectuer à chaque étape de la production.

### IDENTITÉ ET PURETÉ

**Viabilité**. Le nombre de cellules viables est déterminé par étalement sur un milieu approprié d'une partie aliquote diluée de la culture bactérienne, puis dénombrement des colonies.

**Caractérisation biochimique et physiologique de la souche bactérienne**. Selon la souche bactérienne utilisée pour la production, une caractérisation biochimique et physiologique appropriée est effectuée afin de confirmer l'identité des cellules au niveau de l'espèce.

**Génotypage / phénotypage**. Le génotype des cellules bactériennes est vérifié par la détermination de marqueurs phénotypiques spécifiques adéquats ou par une analyse génétique appropriée.

**Présence du plasmide**

*Séquençage*. La séquence nucléotidique du plasmide est intégralement vérifiée.

*Nombre de copies*. L'ADN plasmidique est isolé et purifié à partir d'un nombre connu de cellules bactériennes, et le nombre de copies déterminé par une méthode appropriée telle que la PCR quantitative (*2.6.21*).

*Carte de restriction*. Une fragmentation par une endonucléase de restriction est effectuée, avec une résolution suffisante pour permettre de vérifier l'absence d'altération de la structure plasmidique dans les cellules bactériennes.

*Pourcentage de cellules ayant retenu le plasmide*. Des éléments bactériens intégrés au plasmide, par exemple des marqueurs génétiques sélectionnables, sont utilisés pour déterminer le pourcentage de bactéries ayant retenu le plasmide.

### AGENTS ÉTRANGERS ET VIRUS ENDOGÈNES

**Pureté par étalement sur boîte**. Une détection des contaminants bactériens potentiels est effectuée par mise en culture des cellules bactériennes sur des milieux appropriés et incubation dans les conditions requises. L'absence d'inhibition de croissance des microorganismes contaminants est vérifiée au moyen d'essais complémentaires effectués en présence d'une quantité définie de bactéries de référence appropriées (témoins positifs). Un nombre approprié de colonies est examiné ; aucune contamination n'est détectée.

**Présence de bactériophages**. La présence de bactériophages est recherchée par étalement et incubation des cellules bactériennes sur un milieu permettant la prolifération des bactériophages. L'essai est validé au moyen d'une souche de bactériophages de référence et de cellules sensibles (témoins positifs). Un nombre approprié de colonies est examiné ; aucune contamination n'est détectée.

## VECTEURS ADÉNOVIRAUX POUR USAGE HUMAIN

### DÉFINITION

Les vecteurs adénoviraux pour usage humain sont des préparations liquides ou cryodesséchées d'adénovirus recombinants, génétiquement modifiés pour transférer du matériel génétique à des cellules somatiques humaines *in vivo* ou *ex vivo*.

PRODUCTION

*CONSTRUCTION DU VECTEUR*

Il existe différentes approches possibles pour la configuration et la construction d'un vecteur adénoviral. L'approche optimale dépend de l'application clinique envisagée. La méthode choisie permet de réduire au minimum le risque de génération de vecteurs adénoviraux compétents pour la réplication ou d'éliminer effectivement les virus auxiliaires éventuels en cours de production.

*PRODUCTION DU VECTEUR*

Il doit avoir été établi que le procédé de production utilisé donne un vecteur de qualité reproductible. Sauf exception justifiée et autorisée, le vecteur contenu dans le produit final n'aura pas subi, depuis le lot de semence primaire, un nombre de passages supérieur à celui utilisé pour préparer le vecteur qui a satisfait aux études cliniques en termes d'innocuité et d'efficacité.

La stabilité génétique et phénotypique du vecteur au niveau ou au-delà du niveau de passage maximal utilisé pour la production est évaluée par des méthodes appropriées.

*SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VECTEUR*

Le vecteur est multiplié dans des lignées cellulaires continues (*5.2.3*) basées sur un système de banque de cellules. La présence d'adénovirus compétents pour la réplication peut être significative si de larges régions d'homologie existent entre le génome viral et le génome des cellules de complémentation. Cette présence peut être réduite en réduisant l'homologie entre les 2 génomes. L'utilisation de cellules dépourvues de toute homologie de séquences avec le vecteur est recommandée pour la production.

*LOT DE SEMENCE DU VECTEUR*

La production du vecteur est basée sur un système de lot de semence. La souche d'adénovirus utilisée est identifiée par des données historiques, y compris des informations sur son origine et sa manipulation ultérieure, notamment en ce qui concerne les régions supprimées ou modifiées. Une description détaillée de (des) l'insert(s) génétique(s) est fournie et comprend les détails complets concernant la séquence nucléotidique du (des) gène(s) concerné(s) ainsi que des régions flanquantes de contrôle. La méthode par laquelle l'insert génétique est introduit dans le vecteur est décrite.

Seul un lot de semence qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la production du vecteur.

**Identification**. Le vecteur est identifié, dans le lot de semence primaire et dans chacun des lots de semence de travail, par des méthodes immunochimiques (*2.7.1*), des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) ou par analyse par enzyme de restriction.

**Caractérisation génétique et phénotypique**. Les essais suivants sont effectués.

– Le génome entier du vecteur est séquencé à un niveau de passage comparable à celui d'un lot de production et la séquence déterminée analytiquement est comparée à la séquence théorique établie en tenant compte de la construction du vecteur et des bases de données disponibles.
– Une analyse par enzyme de restriction est effectuée sur l'ADN du vecteur du lot de semence primaire, de chaque lot de semence de travail et d'un lot de production. L'ADN viral est extrait, purifié et digéré avec une résolution suffisante. Les fragments digérés sont séparés par électrophorèse sur gel ou par électrophorèse capillaire et la carte de restriction observée est comparée à la carte de restriction théorique établie en tenant compte de la construction du vecteur.
– Un nombre approprié de sous-clones isolés est contrôlé pour rechercher l'expression du (des) produit(s) de l'insert génétique et déterminer l'activité biologique à un niveau de passage comparable à celui d'un lot de production. Les sous-clones présentant de faibles niveaux d'expression ou d'activité biologique nécessitent une caractérisation plus poussée.

**Concentration en vecteur**. Le titre en vecteur infectieux ou la concentration en particules de vecteur dans le lot de semence primaire et dans chaque lot de semence de travail sont déterminés.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Le lot de semence primaire et chacun des lots de semence de travail satisfont aux essais des agents étrangers.

**Adénovirus compétents pour la réplication**. Les adénovirus compétents pour la réplication sont générés par une recombinaison homologue entre l'ADN viral recombinant et les séquences de l'adénovirus intégrées au génome des cellules de complémentation.

La détection des adénovirus compétents pour la réplication est effectuée selon une méthode appropriée et approuvée par l'Autorité compétente. La méthode généralement utilisée est un titrage de l'infectiosité par détection sur des lignées cellulaires sensibles, qui ne peuvent être complémentaires vis-à-vis des gènes supprimés du vecteur. D'autres indicateurs de la réplication virale peuvent être utilisés selon le cas.

Si, au regard de la construction du vecteur et des lignées cellulaires utilisées, l'échantillon à examiner n'est pas supposé contenir d'adénovirus compétents pour la réplication, effectuez au moins 2, mais de préférence 3 ou 4 passages successifs sur la lignée cellulaire de détection, dans les cas appropriés. La détection d'un effet cytopathogène à la fin des passages révèle la présence d'adénovirus compétents pour la réplication dans la préparation. Des témoins positifs sont inclus dans chaque titrage pour en contrôler la sensibilité.

Si l'échantillon à examiner est supposé contenir des adénovirus compétents pour la réplication, des titrages sur plaque ou des titrages par dilution limite sur une lignée cellulaire de détection peuvent être effectués.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

Toute manipulation de la banque cellulaire et des cultures cellulaires qui en sont issues est faite dans une zone au niveau de confinement approprié où aucune autre cellule ni aucun autre vecteur ne sont manipulés en même temps. Tout matériel d'origine humaine ou animale utilisé dans la préparation de suspensions cellulaires et de milieux de culture est qualifié. Le milieu de culture cellulaire peut contenir un indicateur de pH tel que le rouge de phénol, et des antibiotiques appropriés à la plus faible concentration efficace, mais il est préférable d'utiliser un substrat exempt d'antibiotiques pendant la production. Sauf exception justifiée et autorisée, la pénicilline ou la streptomycine ne sont utilisées à aucun stade de la production. Une partie des cultures cellulaires de production est gardée comme cultures cellulaires non ensemencées (cellules témoins).

Chaque récolte unique qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée dans la préparation de la récolte purifiée.

**Identification**. Le vecteur est identifié par des méthodes immunochimiques (*2.7.1*), des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) ou par analyse par enzyme de restriction.

**Concentration en vecteur**. Le titre en vecteur infectieux et la concentration en particules de vecteur dans les récoltes uniques sont déterminés.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). La récolte unique satisfait aux essais des agents étrangers.

**Cellules témoins**. Les cellules témoins satisfont à un essai d'identification (*5.2.3*) et à un essai des agents étrangers (*2.6.16*).

*RÉCOLTE PURIFIÉE*

Plusieurs récoltes uniques peuvent être mélangées avant le procédé de purification. Le procédé de purification est validé pour démontrer une élimination satisfaisante des impuretés.

Les récoltes purifiées qui satisfont aux essais ci-après peuvent être utilisées pour la préparation du vrac final.

5. Textes généraux

**Identification**. Le vecteur est identifié par des méthodes immunochimiques (*2.7.1*), des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) ou par analyse par enzyme de restriction.

**Intégrité génomique**. L'intégrité génomique du vecteur est vérifiée par des méthodes appropriées comme l'analyse par enzyme de restriction.

**Concentration en vecteur**. Le titre en vecteur infectieux et la concentration en particules de vecteur dans les récoltes purifiées sont déterminés.

**Protéines résiduelles de la cellule hôte**. La concentration en protéines résiduelles de la cellule hôte est déterminée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), sauf si la validation du procédé a démontré une élimination appropriée de ces substances.

**ADN résiduel de la cellule hôte**. La teneur en ADN résiduel de la cellule hôte est déterminée par une méthode appropriée, sauf si la validation du procédé a démontré une élimination appropriée de cette substance. La réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) quantitative est recommandée du fait de sa sensibilité et de sa spécificité, mais d'autres techniques appropriées peuvent également être utilisées.

**Réactifs résiduels**. Si des réactifs sont utilisés au cours du procédé de production, ils sont recherchés dans la récolte purifiée, sauf si la validation du procédé a démontré une élimination appropriée de ces substances.

**Antibiotiques résiduels**. Si des antibiotiques sont utilisés au cours du procédé de production, leur teneur résiduelle est déterminée par un titrage microbiologique (adapté de la méthode générale *2.7.2*) ou par d'autres méthodes appropriées (chromatographie liquide, par exemple), sauf si la validation du procédé a démontré une élimination appropriée de ces substances.

*VRAC FINAL*

Plusieurs récoltes purifiées peuvent être mélangées lors de la préparation du vrac final. Un stabilisant et d'autres excipients peuvent être ajoutés. Le produit formulé est filtré sur un filtre anti-bactérien.
Seul un vrac final qui satisfait à l'essai ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité.

*LOT FINAL*

Seul un lot final qui satisfait à chacun des essais décrits sous Identification, Essai et Dosage peut être libéré.

Si les essais de la sérum-albumine bovine (lorsque du sérum bovin est utilisé pour fabriquer le vecteur) et des adénovirus compétents pour la réplication ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

## IDENTIFICATION

Le vecteur est identifié par une méthode immunochimique (*2.7.1*), des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) ou par analyse par enzyme de restriction.

## ESSAI

**Osmolalité** (*2.2.35*) : dans les limites approuvées pour la préparation considérée.

**pH** (*2.2.3*) : dans les limites approuvées pour la préparation considérée.

**Volume extractible** (*2.9.17*). La préparation satisfait à l'essai du volume extractible.

**Humidité résiduelle** (*2.5.12*) : dans les limites approuvées pour la préparation cryodesséchée considérée.

**Sérum-albumine bovine** : au maximum la limite approuvée pour la préparation considérée, déterminé par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), si du sérum bovin a été utilisé en cours de production.

**Concentration en adénovirus compétents pour la réplication** : dans les limites approuvées pour la préparation considérée.

**Agrégats de vecteur**. Les agrégats de vecteur sont déterminés par des méthodes appropriées (diffusion de la lumière, par exemple).

**Stérilité** (*2.6.1*). La préparation satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : inférieur à la limite approuvée pour la préparation considérée.

**Stabilité thermique**. Maintenez des échantillons du lot final de vecteur à une température et pour une durée adaptées et autorisées pour la préparation considérée. Déterminez la concentration totale en vecteur infectieux après chauffage, comme décrit ci-après sous Dosage. Déterminez en parallèle la concentration en vecteur d'un échantillon non chauffé. L'estimation de la différence entre la concentration totale en vecteur non chauffé et celle du vecteur après chauffage se situe dans les limites approuvées pour la préparation considérée.

## DOSAGE

**Concentration en particules de vecteur**. Le titrage physique est effectué selon une technique appropriée (chromatographie liquide, mesure d'absorbance ou techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*), par exemple). Utilisez un étalon de référence de vecteur approprié pour valider chaque titrage.

La concentration en particules de vecteur dans la préparation à examiner n'est pas inférieure à la concentration indiquée sur l'étiquette.

**Titre en vecteur infectieux**. Titrez la préparation à examiner par inoculation à des cultures cellulaires. Titrez un vecteur étalon de référence approprié pour valider chaque dosage.

Le titrage n'est pas valable si :

- l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) du logarithme de la concentration en vecteur est supérieur à une valeur autorisée par l'Autorité compétente ;
- le titre en vecteur infectieux de l'étalon de référence est en dehors de valeurs limites définies par une carte de contrôle.

**Rapport entre la concentration en particules de vecteur et le titre en vecteur infectieux** : dans les limites approuvées pour la préparation considérée.

**Expression du produit de l'insert génétique**. L'expression du (des) produit(s) de l'insert génétique est déterminée, chaque fois que possible, après inoculation sur cultures cellulaires de la préparation considérée à une multiplicité d'infection prédéterminée, par des titrages immunochimiques (*2.7.1*) ou biochimiques appropriés ou par cytométrie en flux (*2.7.24*).

**Activité biologique**. Sauf exception justifiée et autorisée, l'activité biologique est déterminée par un essai *in vitro* ou *in vivo*.

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- le contenu en substance active,
- la dose humaine recommandée, exprimée en concentration de particules de vecteur,
- pour les préparations cryodesséchées :
  - le nom ou la composition et le volume de liquide à ajouter pour la reconstitution,
  - la durée de validité après reconstitution.

# VECTEURS POXVIRAUX POUR USAGE HUMAIN

## DÉFINITION

Les vecteurs poxviraux pour usage humain sont des préparations liquides ou cryodesséchées de poxvirus recombinants, génétiquement modifiés pour transférer du matériel génétique à des cellules humaines somatiques *in vivo* ou *ex vivo*.

## PRODUCTION

### *CONSTRUCTION DU VECTEUR*

La configuration générale courante d'un vecteur poxviral est la suivante : l'insert génétique est inséré en aval d'un promoteur de poxvirus. Cette cassette d'expression est insérée dans le génome du poxvirus de manière à interrompre un gène viral non essentiel à la réplication ou elle est positionnée entre 2 cadres de lecture du virus.
Dans la plupart des stratégies adoptées à ce jour pour la construction du vecteur, la cassette d'expression est d'abord insérée dans le site cible d'un fragment d'ADN viral cloné dans un plasmide bactérien. Le plasmide est ensuite introduit dans des cellules hôtes, cultivées *in vitro*, qui sont simultanément infectées par le poxvirus parental. La recombinaison de l'ADN se produit, au sein des cellules infectées, entre les séquences du génome viral et les séquences virales homologues du plasmide de telle sorte que l'insert génétique soit transféré dans le site visé du génome viral. La réussite du ciblage de l'ADN inséré est vérifiée par une cartographie de restriction, des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) et un séquençage. Des étapes successives de clonage par isolement de plages sont effectuées pour purifier le poxvirus recombinant à partir du mélange de poxvirus parental et recombinant. Une variété de méthodes (gènes marqueurs étrangers, hybridation ADN, détection immunologique, changements phénotypiques dans le virus, par exemple) est utilisée pour faciliter la reconnaissance et/ou la sélection du poxvirus recombinant sur un fond constitué par le virus parental. Si des gènes marqueurs étrangers ont été utilisés de manière transitoire, ils sont éliminés par des méthodes appropriées du poxvirus recombinant final.

Une stratégie alternative pour créer des vecteurs poxviraux consiste à commencer par la construction *in vitro* d'un génome viral intégral abritant la cassette d'expression en un site cible choisi. Ce génome recombinant est ensuite introduit dans des cellules hôtes infectées simultanément par un poxvirus auxiliaire incapable de se multiplier. Le virus auxiliaire peut être un poxvirus de la même espèce dont la capacité à se multiplier a été inactivée ou un poxvirus d'une autre espèce qui ne se multiplie pas dans les cellules hôtes.

La construction de vecteurs poxviraux non réplicatifs repose sur des lignées spécifiques de cellules hôtes ou des cellules primaires naturellement permissives ou des lignées de cellules hôtes modifiées pour exprimer un gène essentiel du poxvirus. Ces cellules satisfont aux exigences générales relatives à la production de médicaments (*5.2.3*) et ne permettent pas la génération de vecteurs réplicatifs.

### *PRODUCTION DU VECTEUR*

Il doit avoir été établi que le procédé de production utilisé donne un vecteur de qualité reproductible. Sauf exception justifiée et autorisée, le vecteur contenu dans le produit final n'aura pas subi, depuis le lot de semence primaire, un nombre de passages supérieur à celui utilisé pour préparer le vecteur qui a satisfait aux études cliniques en termes d'innocuité et d'efficacité.
La stabilité génétique et phénotypique du vecteur au niveau ou au-delà du niveau de passage maximal utilisé pour la production est évaluée par des méthodes appropriées.

### *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VECTEUR*

Le vecteur est multiplié dans des conditions aseptiques dans une lignée de cellules diploïdes humaines (*5.2.3*), dans une lignée continue de cellules (*5.2.3*) ou dans des cellules d'embryons de poulet provenant d'un élevage de poulets exempt de microorganismes pathogènes spécifiés (*5.2.2*). Dans le cas où le vecteur est préparé sur une lignée cellulaire continue ou sur cellules diploïdes humaines, un système de banque de cellules est mis en place.

### *LOT DE SEMENCE DU VECTEUR*

La production du vecteur est basée sur un système de lot de semence. La souche de poxvirus utilisée est identifiée par des données historiques y compris des informations sur son origine et sa manipulation ultérieure, notamment en ce qui concerne les régions supprimées ou modifiées. Une description détaillée de (des) l'insert(s) génétique(s) est fournie et comprend les détails complets concernant la séquence nucléotidique du (des) gène(s) concerné(s) ainsi que des régions flanquantes de contrôle. La méthode par laquelle l'insert génétique est introduit dans le vecteur est décrite.
Seul un lot de semence qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la production du vecteur.

**Identification**. Le vecteur est identifié, dans le lot de semence primaire et dans chacun des lots de semence de travail, par des méthodes immunochimiques (*2.7.1*) ou des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*).

**Caractérisation génétique et phénotypique**. Les essais suivants sont effectués.

– Le génome entier du vecteur est séquencé à un niveau de passage comparable à celui d'un lot de production et la séquence déterminée analytiquement est comparée à la séquence théorique établie en tenant compte de la construction du vecteur et des bases de données disponibles.
– Une analyse par enzyme de restriction est effectuée sur l'ADN du vecteur du lot de semence primaire, de chaque lot de semence de travail et d'un lot de production. L'ADN viral est extrait, purifié et digéré avec une résolution suffisante. Les fragments digérés sont séparés par électrophorèse sur gel ou par électrophorèse capillaire et la carte de restriction observée est comparée à la carte de restriction théorique établie en tenant compte de la construction du vecteur.
– Un nombre approprié de sous-clones isolés est contrôlé pour rechercher l'expression du (des) produit(s) de l'insert génétique et déterminer l'activité biologique à un niveau de passage comparable à celui d'un lot de production. Les sous-clones présentant de faibles niveaux d'expression ou d'activité biologique nécessitent une caractérisation plus poussée.
– Une vérification du panel des cellules permissives est effectuée en déterminant les propriétés réplicatives du vecteur et en les comparant à celles du virus parent, à un niveau de passage comparable à celui d'un lot de production.

**Titre en vecteur infectieux**. Le titre en vecteur infectieux dans le lot de semence primaire et dans chacun des lots de semence de travail est déterminé.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Le lot de semence primaire et chacun des lots de semence de travail satisfont aux essais des agents étrangers, sauf dans le cas où le vecteur, dérivé d'une souche cytopathogène qui ne peut être neutralisée, est source d'interférence. Si un essai ne peut être effectué, mettez en oeuvre une alternative appropriée et validée.

### *MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

Toute manipulation de la banque de cellules et des cultures cellulaires qui en sont issues est faite dans des conditions d'asepsie dans une zone au niveau de confinement approprié où aucune autre cellule ni aucun autre vecteur ne sont manipulés en même temps. Tout matériel d'origine humaine ou animale utilisé dans la préparation de suspensions cellulaires et de milieux de culture est qualifié. Le milieu de culture cellulaire peut contenir un indicateur de pH tel que le rouge de phénol, et des antibiotiques appropriés à la plus faible concentration efficace, mais il est préférable d'utiliser un substrat exempt d'antibiotiques pendant la production. Sauf exception justifiée et autorisée, la pénicilline ou la streptomycine ne sont utilisées

à aucun stade de la production. Une partie des cultures cellulaires de production est gardée comme cultures cellulaires non ensemencées (cellules témoins).
Chaque récolte unique qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée dans la préparation de la récolte purifiée.

**Identification**. Le vecteur est identifié par des méthodes immunochimiques (*2.7.1*) ou des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*).

**Titre en vecteur infectieux**. Le titre en vecteur infectieux dans les récoltes uniques est déterminé.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). La récolte unique satisfait aux essais des agents étrangers, sauf dans le cas où le vecteur, dérivé d'une souche cytopathogène qui ne peut être neutralisée, est source d'interférence. Si un essai ne peut être effectué, mettez en oeuvre une alternative appropriée et validée.

**Cellules témoins**. Si des cellules humaines diploïdes ou une lignée cellulaire continue sont utilisées pour la production, les cellules témoins satisfont à un essai d'identification (*5.2.3*). Elles satisfont aux essais des agents étrangers (*2.6.16*).

*RÉCOLTE PURIFIÉE*

La manipulation s'effectue dans des conditions d'asepsie. Plusieurs récoltes uniques peuvent être mélangées avant le procédé de purification. La récolte est en premier lieu clarifiée pour éliminer les cellules puis, dans les cas appropriés, purifiée par des méthodes validées.
Les récoltes purifiées qui satisfont aux essais ci-après peuvent être utilisées pour la préparation du vrac final.

**Identification**. Le vecteur est identifié par des méthodes immunochimiques (*2.7.1*) ou des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*).

**Intégrité génomique**. L'intégrité génomique du vecteur est vérifiée par des méthodes appropriées comme l'analyse par enzyme de restriction.

**Titre en vecteur infectieux**. Le titre en vecteur infectieux dans les récoltes purifiées est déterminé.

**Rapport entre le titre en vecteur infectieux et la teneur en protéines totales**. La concentration en protéines totales est déterminée par une méthode appropriée (*2.5.33*). Le rapport entre le titre en vecteur infectieux et la teneur en protéines totales est calculé.

**Protéines résiduelles de la cellule hôte**. La concentration en protéines résiduelles de la cellule hôte est déterminée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), sauf si la validation du procédé a démontré une élimination appropriée de ces substances.

**ADN résiduel de la cellule hôte**. La teneur en ADN résiduel de la cellule hôte est déterminée par une méthode appropriée, sauf si la validation du procédé a démontré une élimination appropriée de cette substance. La PCR quantitative est recommandée du fait de sa sensibilité et de sa spécificité, mais d'autres techniques appropriées peuvent également être utilisées.

**Réactifs résiduels**. Si des réactifs sont utilisés au cours du procédé de production, ils sont recherchés dans la récolte purifiée, sauf si la validation du procédé a démontré une élimination appropriée de ces substances.

**Antibiotiques résiduels**. Si des antibiotiques sont utilisés au cours du procédé de production, leur teneur résiduelle est déterminée par un titrage microbiologique (adapté de la méthode générale *2.7.2*) ou par d'autres méthodes appropriées (chromatographie liquide, par exemple), sauf si la validation du procédé a démontré une élimination appropriée de ces substances.

*VRAC FINAL*

Plusieurs récoltes purifiées peuvent être mélangées lors de la préparation du vrac final. Un stabilisant et d'autres excipients peuvent être ajoutés.
Seul un vrac final qui satisfait à l'essai ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité.

*LOT FINAL*

Seul un lot final qui satisfait à chacun des essais décrits sous Identification, Essai et Dosage peut être libéré.
Si l'essai de sérum-albumine bovine (lorsque du sérum bovin est utilisé pour fabriquer le vecteur) a été effectué avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, il peut ne pas être effectué sur le lot final.

## IDENTIFICATION

Le vecteur est identifié par une méthode immunochimique (*2.7.1*) ou des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*).

## ESSAI

**Osmolalité** (*2.2.35*) : dans les limites approuvées pour la préparation considérée.

**pH** (*2.2.3*) : dans les limites approuvées pour la préparation considérée.

**Volume extractible** (*2.9.17*). La préparation satisfait à l'essai du volume extractible.

**Humidité résiduelle** (*2.5.12*) : dans les limites approuvées pour la préparation cryodesséchée considérée.

**Sérum-albumine bovine** : au maximum la limite approuvée pour la préparation considérée, déterminé par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), si du sérum bovin a été utilisé en cours de production.

**Stérilité** (*2.6.1*). La préparation satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : inférieur à la limite approuvée pour la préparation considérée.

**Stabilité thermique**. Maintenez des échantillons du lot final de vecteur à une température et pour une durée adaptées et autorisées pour la préparation considérée. Déterminez la concentration totale en vecteur infectieux après chauffage, comme décrit ci-après sous Dosage. Déterminez en parallèle la concentration en vecteur d'un échantillon non chauffé. L'estimation de la différence entre la concentration totale en vecteur non chauffé et celle du vecteur après chauffage se situe dans les limites approuvées pour la préparation considérée.

## DOSAGE

**Titre en vecteur infectieux**. Titrez le contenu d'au moins 3 flacons de la préparation à examiner par inoculation à des cultures cellulaires. Titrez le contenu d'un flacon d'un vecteur étalon de référence approprié pour valider chaque dosage.

Le titre en vecteur de la préparation à examiner n'est pas inférieur au titre minimal indiqué sur l'étiquette.

Le titrage n'est pas valable si :

– l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) du logarithme de la concentration en vecteur est supérieur à une valeur autorisée par l'Autorité compétente ;
– le titre en vecteur infectieux de l'étalon de référence est en dehors de valeurs limites définies par une carte de contrôle.

**Expression du produit de l'insert génétique**. L'expression du (des) produit(s) de l'insert génétique est déterminée, chaque fois que possible, après inoculation sur culture cellulaire de la préparation considérée à une multiplicité d'infection prédéterminée, par des titrages immunochimiques (*2.7.1*) ou biochimiques appropriés ou par cytométrie en flux (*2.7.24*).

**Activité biologique**. Sauf exception justifiée et autorisée, l'activité biologique est déterminée par un essai *in vitro* ou *in vivo*.

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le titre minimal en vecteur par dose humaine,

– la dose humaine recommandée,
– pour les préparations cryodesséchées :
  – le nom ou la composition et le volume de liquide à ajouter pour la reconstitution,
  – la durée de validité après reconstitution.

# VECTEURS DÉRIVÉS DE RETROVIRIDAE POUR USAGE HUMAIN

## DÉFINITION

Les vecteurs dérivés de *retroviridae* pour usage humain sont des préparations liquides ou cryodesséchées de rétrovirus, lentivirus ou spumavirus recombinants, génétiquement modifiés pour les rendre incompétents pour la réplication et utilisés pour le transfert de matériel génétique *in vivo* ou *ex vivo* vers des cellules somatiques humaines. Cette section s'applique aux vecteurs non réplicatifs.

## PRODUCTION

### *CONSTRUCTION DU VECTEUR*

Un vecteur est généralement composé :

– du génome minimal des virus parentaux contenant les éléments génétiques structurels indispensables à la production du vecteur,
– des éléments génétiques de régulation permettant l'expression de l'insert génétique (comme par exemple, des longues séquences terminales répétées (LTR)),
– de l'insert génétique.

La construction du vecteur est conçue de manière à empêcher la génération de virus compétents pour la réplication.

### *PRODUCTION DU VECTEUR*

Il doit avoir été établi que le procédé de production utilisé donne un vecteur de qualité reproductible. Sauf exception justifiée et autorisée, les cellules d'encapsidation ou productrices n'auront pas subi, depuis le lot de semence primaire, un nombre de doublements de population cellulaire supérieur à celui utilisé pour préparer le vecteur qui a satisfait aux essais cliniques en termes d'innocuité et d'efficacité.
La stabilité génétique et phénotypique des cellules d'encapsidation ou productrices, à un niveau de doublement de population au moins égal au niveau maximal utilisé pour la production, est évaluée par des méthodes appropriées.

Les vecteurs sont multipliés dans des lignées cellulaires continues (*5.2.3*) basées sur un système de banque de cellules. La production peut comprendre l'utilisation de cellules transfectées de manière stable ou transitoire.

#### DÉFINITIONS

*Cellules d'encapsidation* : une lignée cellulaire source transfectée de manière stable avec des plasmides contenant les gènes viraux nécessaires à la production de particules de vecteur vides : *gag, pol, env*.

*Cellules productrices* : cellules contenant les gènes viraux et la cassette d'expression nécessaires à la production de vecteurs.

– Dans des systèmes de production stable, les cellules productrices sont générées par transfection stable de la lignée de cellules d'encapsidation par un plasmide de transfert contenant la séquence d'intérêt.
– Dans des systèmes de production transitoire, les cellules productrices sont générées au moment de la fabrication par la transfection simultanée de la lignée cellulaire source avec le gène viral et les plasmides d'expression du transgène ou par transfection transitoire de la lignée de cellules d'encapsidation par un plasmide de transfert contenant la séquence d'intérêt.

#### INTERMÉDIAIRES DE PRODUCTION

*Cellules d'encapsidation*

**Nombre de copies**. L'ADN génomique est isolé et purifié à partir d'un nombre connu de cellules et le nombre de copies des gènes *gag*, *pol* et *env* est déterminé par une méthode appropriée, comme la PCR quantitative (*2.6.21*).

**Intégrité de la séquence des gènes viraux**. Un séquençage nucléotidique complet des gènes viraux insérés et de leurs éléments de régulation est effectué.

**Stabilité génétique**. La stabilité génétique des cellules d'encapsidation est vérifiée à un niveau de doublement de population au moins égal au niveau maximal utilisé pour la production.

*Plasmides*

La production du vecteur nécessite l'utilisation d'intermédiaires plasmidiques. Pour chaque ADN plasmidique utilisé en cours de production, il doit être établi une description complète comprenant l'identification, la source, les moyens d'isolement et la séquence nucléotidique. Les informations relatives à la source et à la fonction des composants du plasmide, comme l'origine de la réplication, les promoteurs viraux et eucaryotes et les gènes codant pour les marqueurs sélectifs, sont documentées.

La production d'intermédiaires plasmidiques est basée sur un système de banques de cellules bactériennes. La banque de cellules primaires satisfait aux exigences de la section Cellules bactériennes utilisées pour la fabrication de vecteurs plasmidiques pour usage humain. Les plasmides sont purifiés par des techniques appropriées.

Seuls des lots de plasmides qui satisfont aux essais ci-après peuvent être utilisés pour la production du vecteur.

**Identification**. Les plasmides sont identifiés par une analyse par enzyme de restriction, par séquençage ou par des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*).

**Intégrité génomique**. L'intégrité génomique du plasmide est vérifiée par des méthodes appropriées comme l'analyse par enzyme de restriction des gènes viraux, de l'insert génétique et de leurs éléments respectifs de régulation.

**ADN plasmidique**. Les indications suivantes sont données à titre d'exemple.

Les concentrations en ADN supérieures à 500 ng/mL peuvent être déterminées par mesure de l'absorbance à 260 nm.
Une solution d'ADN double brin à 50 μg/mL présente une absorbance de 1 (absorbance spécifique de 200).

Les concentrations en ADN inférieures à 500 ng/mL sont déterminées après incubation avec des colorants fluorescents qui se lient de manière spécifique à l'ADN double brin, en utilisant un étalon d'ADN de référence pour établir une courbe d'étalonnage.

La chromatographie liquide peut également être utilisée pour déterminer la concentration en ADN plasmidique à l'aide d'un étalon de référence. Dans certains cas, l'électrophorèse capillaire est aussi acceptable.

**ADN résiduel de la cellule hôte**. La teneur en ADN résiduel de la cellule hôte est déterminée par une méthode appropriée, sauf si la validation du procédé de production a démontré une élimination appropriée de cette substance. La PCR quantitative est recommandée du fait de sa sensibilité et de sa spécificité, mais d'autres techniques appropriées peuvent également être utilisées.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : inférieur à la limite approuvée pour la préparation considérée.

**Stérilité** (*2.6.1*). La préparation satisfait à l'essai de stérilité.

*Cellules productrices utilisées pour un système de production stable*

**Nombre de copies**. Les nombres de copies des gènes viraux et de la cassette d'expression intégrés sont déterminés par une méthode appropriée.

5. Textes généraux

**Stabilité génétique**. La stabilité génétique des cellules productrices à un niveau de doublement de population au moins égal au niveau maximal utilisé pour la production est confirmée.

**Intégrité de la séquence des gènes viraux et de la cassette d'expression**. Un séquençage nucléotidique complet des gènes viraux insérés, de la cassette d'expression et de leurs éléments respectifs de régulation (par exemple, LTR, promoteurs, séquence psi, signal de polyadénylation) est effectué.

**Virus compétents pour la réplication**. La détection des virus compétents pour la réplication est effectuée par des méthodes appropriées. La détection peut être basée sur une coculture sur plusieurs doublements de population cellulaire de cellules productrices avec une lignée cellulaire permissive, suivie d'une détection (par l'observation d'un effet cytopathique ou hémadsorbant sur des cellules indicatrices comme PG4 S+L-, ou par détection à l'aide de lignées de cellules indicatrices par les techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) ou par essai de mobilisation). Des témoins positifs sont inclus dans chaque dosage pour en contrôler la sensibilité. Aucun virus compétent pour la réplication n'est décelé.

*PRODUCTION ET RÉCOLTE*

Toute manipulation de la banque cellulaire et des cultures cellulaires qui en sont issues est faite dans une zone au niveau de confinement approprié où aucune autre cellule ni aucun autre vecteur ne sont manipulés en même temps. Tout matériel d'origine humaine ou animale utilisé dans la préparation de suspensions cellulaires et de milieux de culture est qualifié.
Il est préférable d'utiliser un substrat exempt d'antibiotiques pendant la production. Sauf exception justifiée et autorisée, la pénicilline ou la streptomycine ne sont utilisées à aucun stade de la production.

Chaque récolte unique qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée dans la préparation de la récolte purifiée.

**Identification**. Le vecteur est identifié par des méthodes immunochimiques (*2.7.1*), des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) ou par analyse par enzyme de restriction.

**Concentration en vecteur**. Le titre en vecteur infectieux et/ou la concentration en particules de vecteur dans les récoltes uniques sont déterminés.

**Agents étrangers**. Chaque récolte unique satisfait aux essais des agents étrangers (*2.6.16*).

**Cellules témoins**. Si un système de production transitoire est utilisé, les cellules témoins satisfont à un essai d'identification (*5.2.3*) et à un essai des agents étrangers (*2.6.16*).

*RÉCOLTE PURIFIÉE*

Plusieurs récoltes uniques peuvent être mélangées avant purification. Les récoltes purifiées qui satisfont aux essais ci-après peuvent être utilisées pour la préparation du vrac final.

**Identification**. Le vecteur est identifié par des méthodes immunochimiques (*2.7.1*), des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) ou par analyse par enzyme de restriction.

**Intégrité génomique**. L'intégrité génomique du vecteur est vérifiée par une méthode appropriée.

**Concentration en vecteur**. Le titre en particules infectieuses est déterminé par une méthode appropriée, comme par exemple l'infection de cellules permissives suivie d'une technique d'amplification des acides nucléiques quantitative (par exemple, la PCR quantitative), d'un Southern blot ou d'une technique d'expression de protéines. Pour les vecteurs lentiviraux, le titre physique est mesuré, par exemple par ELISA (p24).

**Concentration en virus compétents pour la réplication**. La détection des virus compétents pour la réplication est effectuée par des méthodes appropriées. Il s'agit généralement d'une amplification sur cellules permissives suivie de techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*), de la détection d'un antigène viral (p24 par ELISA, par exemple) ou d'un essai de mobilisation. Des témoins positifs sont inclus dans chaque dosage pour en contrôler la sensibilité.

La détection des virus compétents pour la réplication est effectuée sur la récolte purifiée ou sur le lot final. Aucun virus compétent pour la réplication n'est décelé.

**Protéines résiduelles de la cellule hôte**. La concentration en protéines résiduelles de la cellule hôte est déterminée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), sauf si la validation du procédé a démontré une élimination appropriée de ces substances.

**ADN résiduel de la cellule hôte**. La teneur en ADN résiduel de la cellule hôte est déterminée par une méthode appropriée, sauf si la validation du procédé a démontré une élimination appropriée de cette substance. La PCR quantitative est recommandée du fait de sa sensibilité et de sa spécificité, mais d'autres techniques appropriées peuvent également être utilisées.

**Réactifs résiduels**. Si des réactifs sont utilisés au cours de la production, ils sont recherchés dans la récolte purifiée, sauf si la validation du procédé a démontré une élimination appropriée de ces substances.

**Antibiotiques résiduels**. Si des antibiotiques sont utilisés au cours du procédé de production, leur teneur résiduelle est déterminée par un titrage microbiologique (adapté de la méthode générale *2.7.2*) ou par d'autres méthodes appropriées (chromatographie liquide, par exemple), sauf si la validation du procédé a démontré une élimination appropriée de ces substances.

**Plasmides résiduels**. Si un système de production transitoire est utilisé, la concentration en plasmides contaminants résiduels doit être quantifiée.

*VRAC FINAL*

Plusieurs récoltes purifiées peuvent être mélangées lors de la préparation du vrac final. Un stabilisant et d'autres excipients peuvent être ajoutés. Le produit formulé est filtré sur un filtre antibactérien.
Seul un vrac final qui satisfait à l'essai ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité.

*LOT FINAL*

Seul un lot final qui satisfait à chacun des essais décrits sous Identification, Essai et Dosage peut être libéré.
Si les essais de la sérum-albumine bovine (lorsque du sérum bovin est utilisé pour fabriquer le vecteur) et des virus compétents pour la réplication ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur la récolte purifiée, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

IDENTIFICATION

Les vecteurs dérivés de *retroviridae* sont identifiés par des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*), des méthodes immunochimiques (*2.7.1*) ou par analyse par enzyme de restriction.

ESSAI

**Osmolalité** (*2.2.35*) : dans les limites approuvées pour la préparation considérée.

**pH** (*2.2.3*) : dans les limites approuvées pour la préparation considérée.

**Volume extractible** (*2.9.17*). La préparation satisfait à l'essai du volume extractible.

**Humidité résiduelle** (*2.5.12*) : dans les limites approuvées pour la préparation cryodesséchée considérée.

**Sérum-albumine bovine** : au maximum la limite approuvée pour la préparation considérée, déterminé par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), si du sérum bovin a été utilisé en cours de production.

**Concentration en virus compétents pour la réplication**. La détection des virus compétents pour la réplication est effectuée par des méthodes appropriées. Il s'agit généralement d'une amplification sur cellules permissives suivie de techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*), de la détection d'un antigène viral (p24 par ELISA, par exemple) ou d'un essai de mobilisation. Des témoins positifs sont inclus dans chaque dosage pour en contrôler la sensibilité.

La détection des virus compétents pour la réplication est effectuée sur la récolte purifiée ou sur le lot final. Aucun virus compétent pour la réplication n'est décelé.

**Stérilité** (*2.6.1*). La préparation satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : inférieur à la limite approuvée pour la préparation considérée.

DOSAGE

**Concentration en particules de vecteur**. Le titrage physique est effectué selon une technique appropriée (méthodes immunochimiques (*2.7.1*) ou techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*), par exemple). Utilisez un étalon de référence de vecteur approprié pour valider chaque titrage.

**Titre en vecteur infectieux**. Titrez la préparation à examiner par inoculation à des cultures cellulaires. Titrez un vecteur étalon de référence approprié pour valider chaque dosage.

Le titre en vecteur infectieux dans la préparation à examiner n'est pas inférieur au titre minimal indiqué sur l'étiquette.

Le titrage n'est pas valable si :

- l'intervalle de confiance ($P = 0{,}95$) du logarithme de la concentration en vecteur est supérieur à une valeur autorisée par l'Autorité compétente ;
- le titre en vecteur infectieux de l'étalon de référence est en dehors de valeurs limites définies par une carte de contrôle.

**Rapport entre la concentration en particules de vecteur et le titre en vecteur infectieux** : dans les limites approuvées pour la préparation considérée, dans les cas appropriés.

**Expression du produit de l'insert génétique**. L'expression du (des) produit(s) de l'insert génétique est déterminée, chaque fois que possible, après inoculation sur cultures cellulaires de la préparation considérée à une multiplicité d'infection prédéterminée, par des titrages immunochimiques (*2.7.1*) ou biochimiques appropriés ou par cytométrie en flux (*2.7.24*).

**Activité biologique**. Sauf exception justifiée et autorisée, l'activité biologique est déterminée par un essai *in vitro* ou *in vivo* approprié.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- le titre minimal en vecteur par dose humaine,
- la dose humaine recommandée,
- pour les préparations cryodesséchées :
  - le nom ou la composition et le volume de liquide à ajouter pour la reconstitution,
  - la durée de validité après reconstitution.

## VECTEURS ASSOCIÉS AUX ADÉNOVIRUS POUR USAGE HUMAIN

DÉFINITION

Les vecteurs associés aux adénovirus pour usage humain sont des préparations cryodesséchées ou liquides de virus adéno-associés (AAV) recombinants (rAAV), génétiquement modifiés pour transférer du matériel génétique à des cellules humaines somatiques *in vivo* ou *ex vivo*.

PRODUCTION

*CONSTRUCTION DU VECTEUR*

Les vecteurs rAAV sont développés en remplaçant les gènes *rep* et *cap* par l'insert génétique voulu. Les séquences terminales répétées et inversées (ITR) sont maintenues dans le vecteur rAAV car ce sont les seules séquences d'AAV absolument nécessaires en *cis* pour servir d'origine de réplication. Les gènes *rep* et *cap* sont nécessaires en *trans* et servent respectivement à la réplication et à l'encapsidation. En résumé, le vecteur rAAV contient les ITR et l'insert génétique.

Les AAV de type sauvage ne se répliquent normalement qu'en présence de fonctions auxiliaires, fournies par un adénovirus ou un virus herpès co-infectant. Il existe donc différentes approches possibles de la fabrication d'un vecteur AAV. La stratégie de fabrication choisie est conçue de manière à réduire autant que possible le risque de génération de vecteurs AAV compétents pour la réplication et éliminer efficacement les virus auxiliaires ayant pu être utilisés en cours de production.

*PRODUCTION DU VECTEUR*

Il doit avoir été établi que le procédé de production utilisé donne un vecteur de qualité reproductible.
Plusieurs stratégies de production de vecteurs AAV sont actuellement utilisées, par exemple :

- la cotransfection transitoire d'une lignée cellulaire avec des plasmides contenant les ITR et l'insert génétique, les gènes *rep* et *cap* et les fonctions auxiliaires,
- l'infection par un virus auxiliaire inapte à la réplication d'une lignée cellulaire productrice renfermant les gènes *rep* et *cap*, les ITR et l'insert génétique,
- l'infection d'une lignée cellulaire permissive par 1 ou plusieurs virus de production exprimant les gènes *rep* et/ou *cap* et/ou l'insert génétique et les ITR, et pouvant fournir des fonctions auxiliaires (virus auxiliaires) ou ne pas en fournir (baculovirus).

Selon la stratégie retenue pour produire les vecteurs AAV, différents intermédiaires de production sont nécessaires (plasmides, virus utilisés pour la production, cellules d'encapsidation).

La présence d'AAV compétents pour la réplication peut être significative si des régions d'homologie existent entre les génomes des intermédiaires de production et le rAAV. Cette présence peut être réduite autant que possible en réduisant l'homologie entre ces génomes à un minimum. L'utilisation d'intermédiaires de production dépourvus de toute homologie de séquences est recommandée pour la production.

La stabilité génétique et phénotypique du vecteur au niveau ou au-delà du niveau de passage maximal utilisé pour la production, est évaluée par des méthodes appropriées.

**INTERMÉDIAIRES DE PRODUCTION**

Les virus utilisés pour la production et le vecteur rAAV sont produits dans des lignées cellulaires continues (*5.2.3*) basées sur un système de lot de semence et de banque de cellules.

*Cellules d'encapsidation et cellules productrices*

**Nombre de copies**. L'ADN génomique est isolé et purifié à partir d'un nombre connu de cellules et le nombre de copies des gènes viraux insérés et de la cassette d'expression est déterminé par une méthode appropriée, comme la PCR quantitative (*2.6.21*).

**Intégrité de la séquence des gènes viraux et de la cassette d'expression**. Un séquençage nucléotidique complet des gènes viraux insérés, de leurs éléments de régulation et, dans les cas appropriés, de la cassette d'expression est effectué.

**Stabilité génétique**. La stabilité génétique des cellules est vérifiée à un niveau de doublement de population au moins égal au niveau maximal utilisé pour la production.

**AAV de type sauvage**. L'absence d'AAV de type sauvage est vérifiée par des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*).

*Plasmides*

La production du vecteur AAV par cotransfection transitoire nécessite l'utilisation d'intermédiaires plasmidiques. Pour chaque ADN plasmidique utilisé en cours de production, il doit être établi une description complète comprenant l'identification, la source, les moyens d'isolement et la séquence nucléotidique. Les informations relatives à la source et à la fonction des composants de ces plasmides, comme l'origine de la réplication, les promoteurs viraux et eucaryotes et les gènes codant pour les marqueurs sélectifs, sont documentées.

La production des intermédiaires plasmidiques est basée sur un système de banques de cellules bactériennes. La banque de cellules primaires satisfait aux exigences de la section Cellules bactériennes utilisées pour la production de vecteurs plasmidiques pour usage humain. Les plasmides sont purifiés selon des techniques appropriées.

Seuls les lots de plasmides qui satisfont aux essais ci-après peuvent être utilisés pour la production du vecteur AAV.

**Identification**. Les plasmides sont identifiés par une analyse par enzyme de restriction, par un séquençage ou par des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*).

**Intégrité génomique**. L'intégrité génomique du plasmide est vérifiée par des méthodes appropriées comme l'analyse par enzyme de restriction de la région correspondant aux gènes *rep*, *cap* et à la cassette d'expression.

**ADN plasmidique**. Les indications suivantes sont fournies à titre d'exemples.

Les concentrations en ADN supérieures à 500 ng/mL peuvent être déterminées par mesure de l'absorbance à 260 nm. Une solution d'ADN double brin à 50 µg/mL présente une absorbance de 1 (absorbance spécifique de 200).

Les concentrations en ADN inférieures à 500 ng/mL sont déterminées après incubation avec des colorants fluorescents qui se lient de manière spécifique à l'ADN double brin, en utilisant un étalon d'ADN de référence pour établir une courbe d'étalonnage.

La chromatographie liquide peut également être utilisée pour déterminer la concentration en ADN plasmidique à l'aide d'un étalon de référence. Dans certains cas, l'électrophorèse capillaire est aussi acceptable.

**ADN résiduel de la cellule hôte**. La teneur en ADN résiduel de la cellule hôte est déterminée par une méthode appropriée, sauf si la validation du procédé de production a démontré une élimination appropriée de cette substance. La PCR quantitative est recommandée du fait de sa sensibilité et de sa spécificité, mais d'autres techniques appropriées peuvent également être utilisées.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : inférieur à la limite approuvée pour la préparation considérée.

**Stérilité** (*2.6.1*). La préparation satisfait à l'essai de stérilité.

*Virus utilisés pour la production*

Leur production est basée sur un système de lot de semence et de banque de cellules ou, dans les cas appropriés (pour les baculovirus, par exemple) sur un système transitoire. La souche de virus utilisée est identifiée par des données historiques comprenant des informations sur son origine et sa manipulation ultérieure, notamment en ce qui concerne les régions supprimées ou modifiées. La séquence nucléotidique des virus est documentée.

Seul un virus utilisé pour la production qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé.

**Identification**. Les virus utilisés pour la production sont identifiés par des méthodes immunochimiques (*2.7.1*), des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) ou par analyse par enzyme de restriction.

**Intégrité génomique**. L'intégrité génomique du virus utilisé pour la production est vérifiée par des méthodes appropriées comme l'analyse par enzyme de restriction. Si les virus sont modifiés pour exprimer les gènes *rep* ou *cap* ou la cassette d'expression, l'intégrité génomique est évaluée par un séquençage ou par une PCR quantitative de ces régions.

**Stabilité génétique**. Si un système de production stable est utilisé, la stabilité génétique est vérifiée à un niveau de doublement de population au moins égal au niveau maximal utilisé pour la production.

**Titrage du virus**. Le titre infectieux est déterminé par un titrage approprié.

**AAV de type sauvage**. Dans les cas appropriés, l'absence d'AAV de type sauvage dans les lots de semence de virus auxiliaires est vérifiée par des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*).

**Virus compétents pour la réplication**. La détection des virus compétents pour la réplication est effectuée par des méthodes appropriées. Aucun virus compétent pour la réplication n'est décelé.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Les préparations de virus utilisés pour la production satisfont à l'essai des agents étrangers. En outre, la détection d'une contamination potentielle par des virus d'insectes spécifiques est exigée, dans les cas appropriés.

*PRODUCTION ET RÉCOLTE*

Toute manipulation de la banque de cellules et des cultures cellulaires qui en sont issues est faite dans une zone réservée appropriée, au niveau de confinement approprié, où aucun autre virus, cellule ou vecteur n'est manipulé en même temps. Tout matériel d'origine humaine ou animale utilisé dans la préparation de suspensions cellulaires et de milieux de culture est qualifié. Le milieu de culture cellulaire peut contenir un indicateur de pH tel que le rouge de phénol, et des antibiotiques appropriés à la plus faible concentration efficace. Il est préférable d'utiliser un substrat exempt d'antibiotiques pendant la production. La pénicilline ou la streptomycine ne sont utilisées à aucun stade de la production. Une partie des cultures cellulaires de production est mise de côté pour servir de cultures cellulaires non ensemencées (cellules témoins).

Chaque récolte unique qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée pour la préparation de la récolte purifiée.

**Identification**. Le vecteur est identifié par des méthodes immunochimiques (*2.7.1*), par des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) ou par une analyse par enzyme de restriction.

**Concentration en vecteur**. Le titre en vecteur infectieux et la concentration en particules de vecteur dans les récoltes uniques sont déterminés.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). La récolte unique satisfait aux essais des agents étrangers.

**Cellules témoins**. Les cellules témoins satisfont à un essai d'identification (*5.2.3*) et à un essai des agents étrangers (*2.6.16*) et, si des lignées cellulaires d'insectes sont utilisées en production, à un essai des virus d'insectes spécifiques.

*RÉCOLTE PURIFIÉE*

Plusieurs récoltes uniques peuvent être mélangées avant le procédé de purification. Le procédé de purification est validé pour démontrer une élimination satisfaisante des impuretés. Les récoltes purifiées qui satisfont aux essais ci-après peuvent être utilisées pour la préparation du vrac final.

**Identification**. Le vecteur est identifié par des méthodes immunochimiques (*2.7.1*), des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) ou une analyse par enzyme de restriction.

**Caractérisation génétique**. Les essais suivants sont effectués.

– Le génome entier du vecteur est séquencé sur un nombre approprié de lots de production au niveau de la récolte purifiée ou du vrac final et la séquence déterminée analytiquement est comparée à la séquence théorique établie en tenant compte de la construction du vecteur et des bases de données disponibles.

– L'intégrité génomique est contrôlée sur l'ADN du vecteur. L'analyse par PCR peut être utilisée.

**Concentration en vecteur**. Le titre en vecteur infectieux et la concentration en particules de vecteur sont déterminés.

**Virus résiduels utilisés pour la production**. La présence résiduelle de virus utilisés pour la production est évaluée par des titrages sur plaque ou en unités virales infectieuses ($DICC_{50}$) sur des lignées cellulaires permissives ou par PCR quantitative, selon le système de production utilisé.

**Protéines résiduelles**. La concentration en protéines résiduelles de la cellule hôte et/ou de virus résiduels est déterminée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), sauf si la validation du procédé a démontré une élimination appropriée de ces substances.

**ADN résiduel**. La teneur en ADN résiduel de cellules productrices et d'intermédiaires tels que des plasmides ou des virus utilisés pour la production dans les cas appropriés, est déterminée par une méthode appropriée, sauf si la validation du procédé a démontré une élimination appropriée de cette substance. La PCR quantitative est recommandée du fait de sa sensibilité et de sa spécificité, mais d'autres techniques appropriées peuvent également être utilisées.

**Réactifs résiduels**. Si des réactifs sont utilisés au cours de la production, ils sont recherchés dans la récolte purifiée, sauf si la validation du procédé a démontré une élimination appropriée de ces substances.

**Antibiotiques résiduels**. Si des antibiotiques sont utilisés au cours du procédé de production, leur teneur résiduelle est déterminée par un titrage microbiologique (adapté de la méthode générale *2.7.2*) ou par d'autres méthodes appropriées (chromatographie liquide, par exemple), sauf si la validation du procédé a démontré une élimination appropriée de ces substances.

*VRAC FINAL*

Plusieurs récoltes purifiées peuvent être mélangées lors de la préparation du vrac final. Un stabilisant et d'autres excipients peuvent être ajoutés. Le produit formulé est filtré sur un filtre antibactérien.
Seul un vrac final qui satisfait à l'essai ci-après peut être utilisé pour la préparation du lot final.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité.

*LOT FINAL*

Seul un lot final qui satisfait à chacun des essais décrits sous Identification, Essai et Dosage peut être libéré.
Si les essais de la sérum-albumine bovine (lorsque du sérum bovin est utilisé pour fabriquer le vecteur), d'AAV compétents pour la réplication et de virus résiduels utilisés pour la production ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

IDENTIFICATION

Le vecteur est identifié par des méthodes immunochimiques (*2.7.1*), par des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) ou par analyse par enzyme de restriction.

ESSAI

**Osmolalité** (*2.2.35*) : dans les limites approuvées pour la préparation considérée.

**pH** (*2.2.3*) : dans les limites approuvées pour la préparation considérée.

**Volume extractible** (*2.9.17*). La préparation satisfait à l'essai du volume extractible.

**Humidité résiduelle** (*2.5.12*) : dans les limites approuvées pour la préparation cryodesséchée considérée.

**Sérum-albumine bovine** : au maximum la limite approuvée pour la préparation considérée, déterminé par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), si du sérum bovin a été utilisé en cours de production.

**Concentration en AAV compétents pour la réplication** : dans les limites approuvées par l'Autorité compétente.

La détection des AAV compétents pour la réplication est effectuée par un essai de réplication sur une lignée cellulaire permissive préalablement infectée par un virus auxiliaire et l'analyse des formes réplicatives par Southern blot sur ADN de faible masse moléculaire, ou par la détection du gène *rep* par PCR quantitative.

**Agrégats de vecteur**. Les agrégats de vecteur sont déterminés par des méthodes appropriées (diffusion de la lumière, par exemple).

**Stérilité** (*2.6.1*). La préparation satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : inférieur à la limite approuvée pour la préparation considérée.

DOSAGE

**Concentration en particules de vecteur**. La concentration en particules de vecteur est déterminée à l'aide d'une méthode appropriée, comme la PCR quantitative par comparaison avec une courbe d'étalonnage obtenue en utilisant un plasmide de l'AAV recombinant ou un AAV étalon de référence. La concentration se situe dans les limites approuvées pour la préparation considérée.

**Titre en vecteur infectieux**. Titrez la préparation à examiner par inoculation à des cultures cellulaires. Titrez un vecteur étalon de référence approprié pour valider chaque dosage.

Le titre en vecteur infectieux dans la préparation à examiner n'est pas inférieur au titre minimal indiqué sur l'étiquette.

Le titrage n'est pas valable si :

– l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) du logarithme de la concentration en vecteur est supérieur à une valeur autorisée par l'Autorité compétente,
– le titre en vecteur infectieux de l'étalon de référence est en dehors de valeurs limites définies par une carte de contrôle.

**Rapport entre la concentration en particules de vecteur et le titre en vecteur infectieux** : dans les limites approuvées pour la préparation considérée.

**Expression du produit de l'insert génétique**. L'expression du produit de l'insert génétique est déterminée, chaque fois que possible, après inoculation sur cultures cellulaires de la préparation considérée à une multiplicité d'infection prédéterminée, par des titrages immunochimiques (*2.7.1*) ou biochimiques appropriés ou par cytométrie en flux (*2.7.24*).

**Activité biologique**. Sauf exception justifiée et autorisée, l'activité biologique est déterminée par un essai *in vitro* ou *in vivo* approprié.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le contenu en substance active,
– la dose humaine recommandée,
– pour les préparations cryodesséchées :
  – le nom ou la composition, et le volume de liquide à ajouter pour la reconstitution,
  – la durée de validité après reconstitution.

5. Textes généraux

# 5.15. CARACTÉRISTIQUES LIÉES À LA FONCTIONNALITÉ DES EXCIPIENTS

04/2008:51500

# 5.15. CARACTÉRISTIQUES LIÉES À LA FONCTIONNALITÉ DES EXCIPIENTS

*Ce chapitre et les sections CLF des monographies spécifiques n'ont pas de caractère obligatoire et sont publiés pour information.*

## PRÉAMBULE

La formulation des préparations pharmaceutiques fait appel à des excipients, dont l'innocuité doit être préalablement évaluée, pour conférer à la formulation sa fonctionnalité. La fonction attendue d'un excipient est de garantir que la préparation pharmaceutique présente les propriétés physiques et biopharmaceutiques requises.

La fonctionnalité d'un excipient est déterminée par ses propriétés physiques et chimiques ainsi que, dans certains cas, par sa teneur en sous-produits ou en additifs utilisés pour améliorer la fonctionnalité visée. La fonctionnalité peut, par ailleurs, dépendre d'interactions complexes entre constituants de la formulation et des contraintes liées au procédé. L'évaluation de la fonctionnalité d'un excipient n'est donc possible que dans le contexte d'une formulation et d'un procédé de fabrication particuliers, et fait souvent appel à un ensemble de méthodes analytiques. La connaissance des fonctionnalités des excipients peut faciliter l'application de la technologie analytique des procédés dite PAT (*Process Analytical Technology*).

Certaines propriétés des excipients, comme la taille des particules pour un excipient destiné à une forme solide ou la masse moléculaire pour un polymère utilisé comme agent viscosifiant, peuvent se rapporter à la fonctionnalité dans un sens plus général. Ces propriétés, dites caractéristiques liées à la fonctionnalité (CLF), peuvent être contrôlées et faire l'objet de spécifications propres au produit considéré, lorsque les travaux de développement pharmaceutique ont montré qu'elles exercent un rôle crucial dans le procédé de fabrication ou pour la qualité du médicament.

L'objectif des monographies d'excipients de la Pharmacopée Européenne est d'apporter aux utilisateurs la garantie d'une qualité acceptable. Les monographies spécifiques, ainsi que la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)*, comportent des informations sur l'aspect et les caractères de l'excipient ainsi que des exigences relatives à son identité, à sa pureté chimique et microbiologique et à des caractéristiques physiques liées à la structure chimique telles que le pouvoir rotatoire.

Les CLF ont été intégrées dans les monographies d'excipients pour aider les fabricants de produits pharmaceutiques à établir des spécifications fondées sur des méthodes analytiques normalisées. Elles constituent pour les fabricants et utilisateurs un langage commun qui facilite la fourniture d'excipients possédant des propriétés spécifiées. Le fabricant de l'excipient peut faire mention des CLF, par exemple sur le certificat d'analyse, par référence à la monographie de la Pharmacopée, indiquant ainsi la méthode utilisée pour tester les caractéristiques en question. La rubrique CLF des monographies spécifiques mentionne les CLF ayant un impact reconnu sur la fonctionnalité de l'excipient, pour les utilisations indiquées. La liste de ces utilisations, ainsi que des CLF à considérer, n'est pas exhaustive en raison des utilisations multiples auxquelles se prêtent de nombreux excipients et du développement de nouvelles utilisations.

## CADRE RÉGLEMENTAIRE

Aux termes des textes réglementaires en vigueur, par exemple le Guideline ICH Q8 sur le développement pharmaceutique, les dossiers d'autorisation de mise sur le marché doivent discuter les excipients choisis et leur concentration, et établir les caractéristiques susceptibles d'influer sur les performances et la faisabilité des opérations pharmaceutiques en vue d'obtenir le médicament, au regard de la fonction respective de chaque excipient. L'aptitude des excipients à assurer la fonctionnalité prévue pendant toute la durée de vie attendue de la formulation doit également être démontrée. Les informations relatives aux performances des excipients peuvent être utilisées, au besoin, pour justifier le choix et les attributs de qualité de l'excipient.

Les excipients sont normalement produits selon le système de production par lots ; une certaine variabilité d'un lot à l'autre, pour le même fabricant, est par conséquent possible. Les excipients provenant de sources différentes peuvent ne pas avoir des propriétés identiques par rapport à leur emploi dans une formulation spécifique. L'inévitable variabilité des propriétés chimiques et physiques constitue l'une des principales variables d'entrée susceptibles d'affecter un procédé de fabrication pharmaceutique, car les médicaments sont généralement composés en majeure partie d'excipients. Bon nombre d'excipients sont d'origine naturelle et constitués de mélanges de composés chimiquement apparentés. D'autres sont produits dans des installations chimiques dont la destination primaire est de produire des substances chimiques à l'usage d'autres industries que l'industrie pharmaceutique. De ce fait, le procédé mis en oeuvre par le fabricant peut être centré sur les caractéristiques chimiques et sur certaines propriétés physiques qui relèvent du marché primaire du fabricant. Dans de nombreux cas, le fabricant de l'excipient dispose d'une connaissance limitée des utilisations pharmaceutiques du produit.

La clé d'une formulation robuste et réussie est la compréhension de la nature chimique et physique de la (des) substance(s) active(s) et des excipients seuls, et de la façon dont leurs propriétés interagissent avec les autres constituants de la formulation et avec le procédé de fabrication. Les propriétés critiques des constituants, du point de vue du procédé de fabrication et des performances du médicament, sont identifiées lors du développement pharmaceutique. Une fois réalisée l'identification des propriétés critiques des excipients, de préférence selon une approche fondée sur le risque, le développement pharmaceutique peut s'attacher à établir les plages de variation acceptables des caractéristiques critiques en prenant à la fois en considération les variations des propriétés chimiques et physiques. Les CLF concernées, n'étant pas forcément des propriétés contrôlées par le fabricant de l'excipient, présenteront alors une certaine variabilité, et il est préférable de recourir à de robustes procédés de fabrication du médicament, conçus pour limiter l'effet de la variabilité naturelle des excipients.

## DIFFÉRENTES QUALITÉS PHYSIQUES

Les excipients solides constitués de particules peuvent exister sous plusieurs qualités physiques, par exemple quant à la distribution granulométrique, qui est habituellement contrôlée par le fournisseur de l'excipient. Cependant, les CLF de ces excipients peuvent concerner des propriétés très diverses, relevant des propriétés du solide lui-même ou des propriétés de ses particules, que ne contrôle pas forcément le fournisseur de l'excipient.

Les propriétés du solide à considérer lors du développement de formes pharmaceutiques solides comprennent par exemple le polymorphisme, le pseudo-polymorphisme, la cristallinité et la masse volumique. Des techniques complémentaires permettant d'étudier les formes cristallines et les solvates sont décrites dans divers chapitres généraux :

– *5.9. Polymorphisme*,
– *2.2.34. Analyse thermique*,
– *2.9.33. Caractérisation des solides cristallins et partiellement cristallins par diffraction X sur poudre*,
– *2.2.42. Masse volumique d'un solide*,
– *2.9.23. Masse volumique des solides par pycnométrie à gaz*.

Les propriétés des solides particulaires comprennent notamment la distribution granulométrique, la surface spécifique, la masse volumique vrac, l'aptitude à l'écoulement, la mouillabilité et la

5. Textes généraux

sorption d'eau. La distribution granulométrique peut, selon la gamme de taille des particules, être déterminée par tamisage analytique, comme décrit dans le chapitre *2.9.38. Estimation de la distribution granulométrique par tamisage analytique*, ou par des méthodes instrumentales telles que celle du chapitre *2.9.31. Analyse de la taille des particules par diffraction de la lumière laser*. La méthode générale *2.9.26. Surface spécifique par adsorption gazeuse* repose sur la technique dite de Brunauer-Emmett-Teller (BET). Des méthodes permettant de caractériser la fluidité et la masse volumique vrac des poudres sont décrites dans les chapitres *2.9.36. Aptitude à l'écoulement des poudres* et *2.9.34. Masse volumique vrac et masse volumique après tassement*. Les propriétés du solide peuvent affecter la mouillabilité et les interactions eau-solide des solides particulaires. Diverses méthodes instrumentales permettent de déterminer ces caractéristiques, par exemple, les mesures d'angle de contact statique et dynamique et les mesures gravimétriques de sorption d'eau et/ou l'analyse gravimétrique.

## DIFFÉRENTES QUALITÉS CHIMIQUES

Les excipients qui existent sous plusieurs qualités chimiques peuvent être d'origine naturelle, hémisynthétique ou synthétique. Les monographies spécifiques contrôlent généralement la composition chimique des excipients constitués d'un mélange de composés apparentés, par exemple la composition des acides gras constitutifs des huiles végétales ou des agents tensioactifs. La Pharmacopée comporte toutefois des monographies spécifiques décrivant une classe de composés polymères de composition variable quant à la structure des homopolymères, des polymères à blocs et des copolymères, au degré de polymérisation, et par conséquent à la masse moléculaire et à la distribution de masse moléculaire, au degré de substitution et même dans certains cas à la nature des substituants associés à la chaîne principale. Cette variabilité peut cependant avoir un effet considérable sur la fonctionnalité de l'excipient, et doit faire l'objet lors du développement pharmaceutique d'investigations visant de préférence à établir la plage de variation acceptable de chacune des caractéristiques identifiées comme critiques pour le procédé de fabrication et les performances du produit final.

Il est arrivé dans le passé que soient introduits dans la rubrique Essai (d'application obligatoire) de monographies d'excipients polymères des essais portant sur certaines caractéristiques physiques ou chimiques telles que la viscosité, avec des critères d'acceptation. Ces essais vont être progressivement transférés dans la rubrique CLF, d'application non obligatoire, sauf dans le cas où la caractéristique concernée constitue un élément obligatoire des essais d'identification. Cette évolution est en rapport avec les textes réglementaires sur le développement pharmaceutique et la recherche d'une certaine souplesse réglementaire fondée sur l'établissement d'une plage de variation acceptable pour les propriétés du composé, dans les limites de l'espace de conception. L'évaluation des différentes qualités chimiques existantes et, le cas échéant, l'établissement de spécifications pour les caractéristiques critiques font par conséquent partie intégrante du développement pharmaceutique, indépendamment du caractère non obligatoire des CLF.

## RUBRIQUE « CARACTÉRISTIQUES LIÉES À LA FONCTIONNALITÉ » DANS LES MONOGRAPHIES

Les monographies d'excipients peuvent comporter une rubrique intitulée Caractéristiques liées à la fonctionnalité. Cette rubrique figure dans la monographie pour information des utilisateurs et n'est pas d'application obligatoire. Elle donne la liste des caractéristiques identifiées comme importantes pour certaines utilisations de l'excipient, et les utilisations concernées par chaque caractéristique sont indiquées. Pour d'autres utilisations, la caractéristique en question peut être sans importance. C'est pourquoi cette rubrique n'est pas à considérer comme un simple supplément à la monographie. Il est de la responsabilité du fabricant de médicaments de décider comment répercuter dans le procédé de fabrication les informations concernant les CLF, à la lumière de l'utilisation prévue de l'excipient et des données issues du développement pharmaceutique.

Les informations fournies sur les caractéristiques liées à la fonctionnalité peuvent être de différents ordres :

- nom de la CLF,
- nom de la CLF et méthode recommandée pour sa détermination, avec référence chaque fois que possible à un chapitre général de la Pharmacopée,
- nom de la CLF, méthode recommandée pour sa détermination et critères d'acceptation types, pouvant se présenter sous la forme de tolérances par rapport à la valeur nominale.

Dans une monographie, une caractéristique donnée peut à la fois faire l'objet d'une exigence à caractère obligatoire et être mentionnée dans la rubrique CLF. Ainsi le degré de polymérisation est-il utilisé dans la rubrique Identification, à caractère obligatoire, des monographies de la cellulose microcristalline et de la cellulose en poudre, pour permettre de distinguer ces 2 types de produits : le degré de polymérisation de la cellulose microcristalline n'est en effet pas supérieur à 350 tandis que celui de la cellulose en poudre est de 440 à 2250. Par ailleurs, le degré de polymérisation effectif est essentiel pour certaines utilisations, et est donc cité parmi les CLF pertinentes, que le fabricant de médicaments peut décider de spécifier pour la qualité particulière de substance utilisée pour une préparation pharmaceutique donnée.

La rubrique CLF est supposée refléter l'état actuel des connaissances quant aux utilisations principales d'un excipient. Elle peut cependant ne pas être exhaustive étant donné la multiplicité des utilisations de certains excipients et le développement constant de nouvelles utilisations. Par ailleurs, les méthodes mentionnées pour la détermination d'une caractéristique donnée sont simplement citées à titre de recommandation parce qu'elles se sont avérées satisfaisantes pour l'utilisation considérée, et l'emploi d'autres méthodes n'est pas exclu.

## HARMONISATION INTERNATIONALE

Plusieurs monographies d'excipients font l'objet de travaux d'harmonisation internationale conduits par la Pharmacopée Européenne, la Pharmacopée Japonaise et l'United States Pharmacopeia (voir *5.8. Harmonisation des pharmacopées*). L'introduction d'une rubrique CLF dans les monographies de la Pharmacopée Européenne signifie qu'il existera des différences de présentation entre monographies harmonisées. Les essais portant sur des caractéristiques physiques et chimiques considérées comme liées à la fonctionnalité dans la Pharmacopée Européenne seront intégrées au corps de la monographie dans les 2 autres pharmacopées. Ces différences de format sont sans conséquence sur les spécifications établies par le fabricant de médicaments pour les caractéristiques de l'excipient. Les textes réglementaires en vigueur recommandent uniquement que soient identifiées et spécifiées les propriétés critiques ayant un impact sur le procédé de production et sur les performances du produit final. Il existe entre les environnements législatifs des 3 pharmacopées des différences qui expliquent que les monographies puissent présenter des différences de format sans que leur statut de monographies harmonisées en soit affecté.

## GLOSSAIRE

**Caractéristique critique** : toute caractéristique physique ou chimique d'un composé qui exerce une influence significative reconnue sur la faisabilité des opérations pharmaceutiques et/ou les performances du médicament.

**Caractéristique liée à la fonctionnalité** : caractéristique physique ou chimique contrôlable d'un excipient qui exerce une influence reconnue sur sa fonctionnalité.

**Contrôle de fonctionnalité** : contrôle direct de la fonction attendue d'un excipient dans le cadre d'une formulation et d'un procédé de fabrication donnés, pour vérifier que l'excipient apporte la fonctionnalité voulue.

**Espace de conception** : combinaison et interaction multidimensionnelles de variables d'entrée (par exemple, attributs du composé) et de paramètres du procédé dont il a été établi qu'elles apportent une assurance qualité.

**Essais de performance** : essais analytiques portant sur les propriétés critiques d'un médicament.

**Robustesse du procédé** : capacité d'un procédé à tolérer, sans impact négatif sur la qualité, une certaine variabilité des composés utilisés et des changements concernant le procédé et l'équipement.

# 5.17. RECOMMANDATIONS RELATIVES AUX MÉTHODES D'ESSAI DES FORMES PHARMACEUTIQUES

# 5.17. RECOMMANDATIONS RELATIVES AUX MÉTHODES D'ESSAI DES FORMES PHARMACEUTIQUES

**07/2010:51701**

## 5.17.1. RECOMMANDATIONS RELATIVES À L'ESSAI DE DISSOLUTION

*Ce chapitre général n'est pas obligatoire ; il fournit des informations sur l'essai de dissolution, sur les milieux de dissolution recommandés et sur l'expression des spécifications de dissolution des formes orales (voir le chapitre général 2.9.3. Essai de dissolution des formes solides). Ces informations sont reconnues comme étant des paramètres généralement acceptés dans le domaine de la dissolution.*

Lors de la détermination de la vitesse de dissolution de la (des) substance(s) active(s) d'une forme pharmaceutique solide, les aspects suivants sont à spécifier :

– l'appareil à utiliser et, s'il s'agit de l'appareil à flux continu, le type de cellule à utiliser,
– la composition, le volume et la température du milieu de dissolution,
– la vitesse de rotation, ou le débit du milieu de dissolution,
– le mode de prélèvement des échantillons du milieu de dissolution (temps, méthode et volume), ou les conditions de suivi en continu,
– la méthode d'analyse,
– les critères d'acceptation.

Le choix de l'appareillage est déterminé par les caractéristiques physicochimiques de la forme pharmaceutique. L'emploi de l'appareil à flux continu peut être préférable lorsqu'un volume important de milieu de dissolution est requis pour réaliser les conditions d'immersion adéquates, ou lorsqu'un changement de pH est nécessaire.

CONDITIONS OPÉRATOIRES

Le fonctionnement des appareils à palette, à panier et à mouvement alternatif repose généralement sur le principe de l'application de conditions d'immersion telles que le produit déjà passé en solution n'entraîne pas de modification significative de la vitesse de dissolution du produit restant. Ces conditions sont normalement réalisées lorsque le volume du milieu de dissolution représente 3-10 fois au moins le volume de saturation.

En règle générale, on utilise un milieu de dissolution aqueux. La composition du milieu est choisie en fonction des caractéristiques physicochimiques de la (des) substance(s) active(s) et excipient(s), dans les limites des conditions auxquelles la forme pharmaceutique est susceptible d'être exposée après son administration. Ceci s'applique notamment au pH et à la force ionique du milieu de dissolution.

Le pH du milieu de dissolution est habituellement compris entre 1 et 8. Dans certains cas justifiés, un pH plus élevé peut être nécessaire. Pour les valeurs basses de pH dans la zone acide, on utilise normalement de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*. Les milieux de dissolution recommandés sont décrits plus loin.

L'utilisation d'eau comme milieu de dissolution n'est recommandée que lorsqu'il est établi que les variations de pH n'affectent pas les propriétés de dissolution.

Dans certains cas spécifiques et sous réserve de l'Autorité compétente, les milieux de dissolution peuvent contenir des enzymes, des agents tensioactifs ou d'autres substances inorganiques et organiques. Pour l'examen des préparations contenant des substances actives faiblement solubles dans l'eau, une modification du milieu de dissolution peut être nécessaire. Il est alors recommandé d'utiliser un agent tensioactif à faible concentration ; l'emploi de solvants organiques est déconseillé.

La présence de gaz dissous dans le milieu de dissolution peut affecter les résultats de l'essai, en particulier dans le cas de l'appareil à flux continu, où une désaération du milieu est nécessaire pour éviter la formation de bulles dans la cellule. La méthode de désaération suivante peut être utilisée : chauffez le milieu à environ 41 °C, en agitant doucement, puis filtrez immédiatement sous vide sur un filtre de porosité inférieure ou égale à 0,45 µm, en agitant énergiquement, et poursuivez l'agitation sous vide pendant environ 5 min.

D'autres techniques de désaération peuvent également être utilisées pour l'élimination des gaz dissous.

Pour les appareils à palette et à panier, le volume de milieu utilisé est normalement de 500 mL à 1000 mL, et la vitesse de rotation appliquée de 50 tr/min à 100 tr/min ; elle ne doit pas excéder 150 tr/min.

Pour l'appareil à flux continu, le débit est normalement ajusté à une valeur comprise entre 4 mL/min et 50 mL/min.

MILIEUX DE DISSOLUTION RECOMMANDÉS

Les milieux de dissolution suivants peuvent être utilisés.

Tableau 5.17.1.-1. – *Exemples de milieux de dissolution*

| pH | Milieu de dissolution |
|---|---|
| pH 1,0 | HCl |
| pH 1,2 | NaCl, HCl |
| pH 1,5 | NaCl, HCl |
| pH 4,5 | Tampon phosphate ou acétate |
| pH 5,5 et pH 5,8 | Tampon phosphate ou acétate |
| pH 6,8 | Tampon phosphate |
| pH 7,2 et pH 7,5 | Tampon phosphate |

La composition et le mode de préparation de ces milieux sont décrits ci-après.

**Milieux à l'acide chlorhydrique**

– *Acide chlorhydrique 0,2 M.*
– *Chlorure de sodium 0,2 M.* Dissolvez 11,69 g de *chlorure de sodium R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000,0 mL avec le même solvant.

Pour préparer des milieux aux pH mentionnés dans le tableau 5.17.1.-2, mélangez 250,0 mL de chlorure de sodium 0,2 M et le volume indiqué d'*acide chlorhydrique 0,2 M*, puis complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*.

Les milieux à l'acide chlorhydrique peuvent également être préparés avec du chlorure de potassium, au lieu du chlorure de sodium.

Tableau 5.17.1.-2. – *Milieux à l'acide chlorhydrique*

| pH | HCl (mL) |
|---|---|
| 1,2 | 425,0 |
| 1,3 | 336,0 |
| 1,4 | 266,0 |
| 1,5 | 207,0 |
| 1,6 | 162,0 |
| 1,7 | 130,0 |
| 1,8 | 102,0 |
| 1,9 | 81,0 |
| 2,0 | 65,0 |
| 2,1 | 51,0 |
| 2,2 | 39,0 |

**Solutions tampons acétate**

– *Acide acétique 2 M.* Prélevez 120,0 g d'*acide acétique glacial R* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

– *Solution tampon acétate pH 4,5.* Dissolvez 2,99 g d'*acétate de sodium R* dans de l'*eau R.* Ajoutez 14,0 mL d'acide acétique 2 M et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

– *Solution tampon acétate pH 5,5.* Dissolvez 5,98 g d'*acétate de sodium R* dans de l'*eau R.* Ajoutez 3,0 mL d'acide acétique 2 M et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

– *Solution tampon acétate pH 5,8.* Dissolvez 6,23 g d'*acétate de sodium R* dans de l'*eau R.* Ajoutez 2,1 mL d'acide acétique 2 M et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

**Solutions tampons phosphate**

Pour préparer des solutions tampons aux pH indiqués dans le tableau 5.17.1.-3, mélangez 250,0 mL de *solution de phosphate monopotassique 0,2 M R* et le volume indiqué d'*hydroxyde de sodium 0,2 M,* puis complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

Tableau 5.17.1.-3. – *Solutions tampons phosphate*

| **pH** | 5,8 | 6,0 | 6,2 | 6,4 | 6,6 | 6,8 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **NaOH (mL)** | 18,0 | 28,0 | 40,5 | 58,0 | 82,0 | 112,0 |
| **pH** | 7,0 | 7,2 | 7,4 | 7,6 | 7,8 | 8,0 |
| **NaOH (mL)** | 145,5 | 173,5 | 195,5 | 212,0 | 222,5 | 230,5 |

**Autres solutions tampons phosphate**

– *Solution tampon phosphate pH 4,5.* Dissolvez 13,61 g de *phosphate monopotassique R* dans 750 mL d'*eau R* ; ajustez le pH, si nécessaire, avec de l'*hydroxyde de sodium 0,1 M* ou de l'*acide chlorhydrique 0,1 M.* Complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

– *Solution tampon phosphate pH 5,5 R.*

– *Solution tampon phosphate pH 6,8 R1.*

– *Solution tampon pH 7,2 R.*

– *Solution tampon phosphate pH 7,5 (0,33 M) R.*

**Suc intestinal artificiel pH 6,8**

Mélangez 77,0 mL d'*hydroxyde de sodium 0,2 M,* 250,0 mL d'une solution contenant 6,8 g de *phosphate monopotassique R,* et 500 mL d'*eau R.* Ajoutez 10,0 g de *poudre de pancréas R,* mélangez et ajustez le pH si nécessaire. Complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.*

**Suc gastrique artificiel**

Dissolvez 2,0 g de *chlorure de sodium R* et 3,2 g de *poudre de pepsine R* dans de l'*eau R.* Ajoutez 80 mL d'*acide chlorhydrique 1 M* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R.* La poudre de pepsine peut être omise si nécessaire.

**Accroissement du pH**

Dans le cas des essais effectués à pH croissant, l'une des séquences suivantes peut être utilisée :

| **Temps (h)** | 0 - 1 | 1 - 2 | 2 - 3 | 3 - 4 | 4 - 5 | 5 - 6 | 6 - 7 | 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **pH** | 1,0 | | | | | | | |
| **pH** | 1,2 | 6,8 | | | | | | |
| **pH** | 1,2 | 2,5 | 4,5 | | 7,0 | | 7,5 | |
| **pH** | 1,5 | 4,5 | | | 7,2 | | | |

Différentes méthodes sont possibles pour obtenir ces variations de pH :

– remplacement d'une solution tampon par une autre (substitution globale),

– prélèvements successifs de la moitié du milieu (substitution au 1/2) pour la remplacer par une solution tampon de pH plus élevé : le pH initial est de 1,2 et la seconde solution employée est la solution tampon phosphate pH 7,5,

– addition comme décrit ci-après, à une solution initiale de pH 1,5, d'une dose d'un mélange en poudre contenant du *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* et de l'*acétate de sodium anhydre R,* de façon à obtenir un pH de 4,5, puis d'une seconde dose de façon à obtenir un pH de 7,2 :

  – *solution chlorhydrique pH 1,5* : dissolvez 2 g de *chlorure de sodium R* dans de l'*eau R,* ajoutez 31,6 mL d'*acide chlorhydrique 1 M* et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R* ;

  – *solution tampon pH 4,5* : mélangez 2,28 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* et 1,77 g d'*acétate de sodium anhydre R* ; dissolvez ce mélange dans la solution chlorhydrique pH 1,5 décrite ci-dessus ;

  – *solution tampon pH 7,2* : mélangez 2,28 g de *tris(hydroxyméthyl)aminométhane R* et 1,77 g d'*acétate de sodium anhydre R* ; dissolvez ce mélange dans la solution tampon pH 4,5 décrite ci-dessus.

Pour opérer sous gradient continu de pH, il est possible d'utiliser la cellule à flux continu.

## QUALIFICATION ET VALIDATION

De par la nature de la méthode d'essai, la qualité de conception des équipements utilisés pour les essais de dissolution *in vitro* est un aspect important de leur qualification. Toutes perturbations d'origine mécanique, telles que des vibrations ou une agitation indésirable, sont à éviter.

La qualification de l'équipement utilisé doit prendre en compte les dimensions et tolérances de l'appareillage. Les paramètres opératoires critiques comme la température et le volume du milieu de dissolution, la vitesse de rotation ou le débit de liquide, les prises d'essai et méthodes de prélèvement doivent faire l'objet de contrôles périodiques lors des périodes d'utilisation.

On peut contrôler les performances de l'équipement en réalisant l'essai sur un produit de référence sensible aux variations des conditions hydrodynamiques. Ces contrôles peuvent être effectués de façon périodique ou en continu, pour comparaison avec les résultats obtenus par d'autres laboratoires.

Au cours des essais, une inspection et une observation critiques sont nécessaires. Cette approche est particulièrement importante pour expliquer d'éventuels résultats aberrants.

La validation des systèmes automatisés, qu'elle porte sur la partie échantillonnage et analyse ou concerne également la préparation des milieux de dissolution et la réalisation de l'essai, doit porter sur l'exactitude, la fidélité et l'élimination des risques de contamination au cours des opérations de dilution, de transfert, de nettoyage et de préparation des échantillons ou solvants.

## EXPRESSION DES SPÉCIFICATIONS DE DISSOLUTION DES FORMES ORALES

Une spécification de dissolution est exprimée en terme de quantité *Q* de substance active qui se dissout dans un intervalle de temps spécifié, exprimée en pourcentage de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Formes à libération conventionnelle**

Dans la plupart des cas, dans des conditions opératoires raisonnables et justifiées, les critères d'acceptation au niveau $S_1$ correspondent à une quantité de substance active libérée d'au moins 80 pour cent, dans un intervalle de temps défini, généralement 45 min ou moins. Ceci correspond à une valeur de *Q* de 75 pour cent, dans la mesure où le tableau 2.9.3.-1 indique pour le niveau $S_1$ que les valeurs individuelles obtenues avec chacune des 6 unités examinées ne sont pas inférieures à $Q + 5$ pour cent, c'est-à-dire pas inférieures à 80 pour cent.

Un critère d'acceptation à un seul point est généralement suffisant pour démontrer que la plupart de la substance active a été libérée, bien que dans certaines circonstances, il peut être nécessaire de réaliser un essai à d'autres intervalles de temps afin de démontrer que la dissolution est satisfaisante.

**Formes à libération prolongée**

Pour les formes à libération prolongée, les critères d'acceptation de l'essai de dissolution comportent normalement 3 points ou davantage. Le 1$^{er}$ point vise à éviter une libération trop rapide de la substance active (« *dose dumping* ») ; le temps choisi correspond donc, en règle générale, à un taux de dissolution de 20 pour cent à 30 pour cent. Le 2$^{e}$ point définit le profil de dissolution et correspond par conséquent à un taux de libération d'environ 50 pour cent. Le dernier point sert à vérifier que la libération de la substance est presque totale, c'est à dire, selon l'acception la plus courante, supérieure à 80 pour cent.

**Formes à libération retardée**

Selon leur formulation, les formes à libération retardée peuvent libérer la (les) substance(s) active(s) de façon fractionnée ou en totalité lorsqu'elles sont contrôlées dans des milieux de dissolution différents (par exemple dans des conditions de pH croissant). Les spécifications de dissolution sont donc à établir au cas par cas.

Les formes gastrorésistantes requièrent au minimum des spécifications à 2 points dans le cas d'un essai séquentiel, et 2 spécifications différentes dans le cas d'un essai en parallèle. Dans un essai séquentiel, le 1$^{er}$ point représente une limite supérieure et correspond à une exposition de 1 h ou 2 h en milieu acide, le 2$^{e}$ point à un temps de séjour prédéfini dans une solution tampon appropriée (de préférence de pH 6,8).

Dans la plupart des cas, les critères d'acceptation au niveau $B_1$ correspondent à une quantité de substance active libérée d'au moins 80 pour cent. Ceci correspond à une valeur de $Q$ de 75 pour cent, dans la mesure où le tableau 2.9.3.-4 indique pour le niveau $B_1$ que les valeurs individuelles obtenues avec chacune des 6 unités examinées ne sont pas inférieures à $Q$ + 5 pour cent, c'est-à-dire pas inférieures à 80 pour cent.

5. Textes généraux

# MONOGRAPHIES GÉNÉRALES

**01/2008:0784**

# ADN RECOMBINANT (PRODUITS OBTENUS PAR LA MÉTHODE DITE DE L')

## Producta ab arte ADN recombinandorum

*Cette monographie donne des spécifications générales traitant du développement et de la fabrication des produits obtenus par la méthode dite de l'ADN recombinant. Ces spécifications ne sont pas nécessairement complètes pour un cas donné et des spécifications complémentaires ou supplémentaires peuvent être imposées dans une monographie individuelle ou par l'Autorité compétente.*

*Cette monographie ne s'applique pas aux organismes vivants modifiés réservés à l'utilisation directe chez l'homme ou l'animal, par exemple les vaccins vivants.*

### DÉFINITION

Les produits obtenus par la méthode dite de l'ADNr sont le résultat d'une modification génétique qui consiste à introduire, le plus souvent en utilisant comme vecteur un plasmide ou un virus, de l'ADN codant pour la substance souhaitée dans un microorganisme ou une lignée cellulaire convenable, où cet ADN est exprimé et traduit en protéine. La substance souhaitée est alors récupérée par extraction et purification. La cellule ou le microorganisme ne contenant pas encore le vecteur est appelé l'hôte et l'association stable des deux, utilisée pour la production, est appelée le système hôte-vecteur.

### PRODUCTION

La méthode de production est fondée sur un système de lot de semence validé utilisant une combinaison hôte-vecteur qui s'est révélée appropriée et a été agréée par l'Autorité compétente. Le système de lot de semence utilise une banque de cellules primaires et une banque de cellules de travail dérivée du lot de semence primaire de la combinaison hôte-vecteur. Une description détaillée des phases de culture, d'extraction et de purification et une définition du lot de produit doivent être établies.

Lorsque la fabrication de produits obtenus par la méthode dite de l'ADNr fait intervenir des matières d'origine humaine ou animale, les exigences du chapitre *5.1.7. Sécurité virale* s'appliquent.

La démonstration que la combinaison hôte-vecteur est appropriée et la validation du système de lot de semences comprennent les éléments suivants :

*CLONAGE ET EXPRESSION*

La conformité du système hôte-vecteur, notamment en ce qui concerne la pureté microbiologique, est démontrée à l'aide des points suivants.

*Caractérisation de la cellule hôte notamment source, phénotype et génotype et des milieux de culture cellulaire*

*Indication de la stratégie de clonage du gène et caractérisation du vecteur recombinant, notamment :*

i. origine et caractérisation du gène ;

ii. analyse de la séquence nucléotidique du gène cloné et des zones de contrôle contiguës du vecteur d'expression ; les séquences clonées doivent être limitées au minimum et toutes les séquences exprimées correspondantes doivent être clairement identifiées et confirmées au niveau de l'ARN ; la séquence de l'ADN du gène cloné doit normalement être confirmée au stade du lot de semence jusqu'à ou au-delà du niveau de doublement de la population après fermentation à l'échelle maximale ; dans certains systèmes, par exemple lorsque des copies multiples du gène sont insérées dans le génome d'une lignée cellulaire continue, il est parfois déconseillé d'analyser la séquence du gène cloné au stade de la production ; dans ce cas, il peut être utile de procéder à une analyse globale de l'ADN cellulaire par la méthode dite des empreintes (Southern blots) ou à une analyse séquentielle de l'ARN messager (ARNm), en portant une attention particulière à la caractérisation de la protéine exprimée ;

iii. constitution, caractéristiques génétiques et structure du vecteur d'expression dans sa totalité.

*Caractérisation du système hôte-vecteur notamment :*

i. mécanisme de transfert du vecteur dans les cellules hôtes,

ii. nombre de copies, état physique et stabilité du vecteur à l'intérieur de la cellule hôte,

iii. moyens utilisés pour lancer et contrôler l'expression.

*SYSTÈME DE BANQUE DE CELLULES*

*La banque de cellules primaires* est une suspension homogène des cellules originelles déjà transformées par introduction du vecteur d'expression contenant le gène souhaité, répartie en quantités égales dans plusieurs récipients pour conservation (par exemple dans l'azote liquide). Dans certains cas, il peut être nécessaire d'établir des banques de cellules primaires séparées pour l'expression du vecteur et des cellules hôtes.

*La banque de cellules de travail* est une suspension homogène du matériel cellulaire dérivée de la (des) banque(s) de cellule(s) primaire(s) par un nombre de passages défini, répartie en quantités égales dans plusieurs récipients pour conservation (par exemple dans l'azote liquide).

Dans ces deux banques de cellules, tous les récipients sont traités de manière identique au cours de la conservation, et une fois sortis de leur lieu de conservation les récipients ne sont pas réintroduits dans le stock cellulaire.

La banque de cellules peut être utilisée pour la production avec nombre de passages défini ou pour la production en lignée continue.

*Production avec nombre de passages défini*

Cette méthode de culture est définie par l'existence d'un nombre limité de passages ou de doublements de population ne devant pas être dépassé au cours de la production. Le nombre maximum de doublements du nombre de cellules, ou de passages, pour lequel la production satisfait habituellement aux critères décrits plus loin doit être indiqué.

*Production en lignée continue*

Avec cette méthode de culture, il n'existe pas de nombre limité de passages ou de doublements de population fixé en début de production. Il revient au fabricant de définir les critères régissant la récolte et l'arrêt de la production. Il est nécessaire d'exercer une surveillance pendant toute la durée de la culture, mais la fréquence et le type des contrôles dépendent de la nature du système de production et de celle du produit.

Il est nécessaire de disposer d'informations sur l'intégrité moléculaire du gène en cours d'expression et sur les caractéristiques phénotypiques et génotypiques de la cellule hôte après culture de longue durée. L'acceptation des récoltes pour traitement ultérieur doit être clairement liée au plan de surveillance adopté et une définition claire du « lot » de produit destiné au traitement ultérieur est nécessaire.

*VALIDATION DES BANQUES DE CELLULES*

La validation des banques de cellules comprend les points suivants.

i. Mesures de stabilité, portant sur la viabilité et la rétention du vecteur.

ii. Vérification de l'identité des cellules, à partir des caractères phénotypiques.

iii. Le cas échéant, démonstration que les banques de cellules sont exemptes d'agents étrangers (viraux, bactériens, fongiques ou mycoplasmiques) potentiellement oncogènes ou infectieux. Une attention particulière doit être portée aux virus constituant des agents de contamination courants des espèces dont est issue la lignée cellulaire. Certaines lignées cellulaires contiennent des virus endogènes, par exemple des rétrovirus, dont l'élimination

Monographies générales

peut être difficile. Il faut effectuer des essais pour mettre en évidence l'expression de ces organismes, dans différentes conditions connues pour entraîner leur induction.

iv. Pour les cellules de mammifères, obtention d'informations détaillées sur le pouvoir tumorigénique de la banque de cellules.

*CONTRÔLE DES CELLULES*

L'origine, la forme, la conservation, l'utilisation et la stabilité au taux d'utilisation prévu doivent être attestées de façon exhaustive pour toutes les banques de cellules dans les conditions de conservation, de même que le rendement. Toute nouvelle banque de cellules doit être totalement validée.

*VALIDATION DU PROCESSUS DE PRODUCTION*

**Extraction et purification**

L'aptitude de chaque phase de la procédure d'extraction et de purification à assurer l'élimination ou l'inactivation des substances contaminantes associées à la cellule hôte ou au milieu de culture, notamment les particules virales, protéines, acides nucléiques et excipients, doit être validée.

Des études de validation sont effectuées afin de démontrer que le processus de production satisfait habituellement aux critères suivants.

– Exclusion des agents extérieurs. Il convient d'effectuer des études portant par exemple sur les virus possédant les caractéristiques physicochimiques adéquates, et il faut établir pour ces agents le pouvoir de décontamination propre à chacune des phases de purification appropriées.
– Elimination adéquate des contaminants associés au vecteur, à la cellule hôte, au milieu de culture et aux réactifs. Le pouvoir d'élimination vis à vis de l'ADN doit être établi par la méthode de la contamination intentionnelle. L'élimination des protéines d'origine animale peut être détecté par des méthodes immunochimiques.
– Maintien, dans des limites établies, du rendement de production de la culture.
– Stabilité adéquate de tout intermédiaire de production ou de fabrication lorsqu'une phase de conservation intermédiaire est prévue dans le processus.

**Caractérisation de la substance**

L'identité, la pureté, l'activité et la stabilité du produit final en vrac sont établies initialement par la réalisation d'un nombre important d'essais chimiques, physiques, immunochimiques et biologiques. Avant que le produit ne soit débité, l'identité et la pureté de chaque lot sont vérifiées par le fabricant, et un dosage approprié est effectué.

**Régularité de la production**

Des essais appropriés sont effectués pour démontrer la régularité de la production et de la purification. Les essais comprennent notamment des essais de caractérisation, des contrôles en cours de fabrication et des essais sur les produits finis comme par exemple les essais suivants.

COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS

*Analyse partielle de la séquence des acides aminés.* Les données relatives à la séquence des acides aminés permettent de confirmer que les segments *N*-terminaux ont été correctement fabriqués et que les acides aminés *C*-terminaux n'ont pas disparu.

*Cartographie des peptides.* La cartographie des peptides par segmentation chimique ou enzymatique du produit protéique, suivie d'une analyse par une méthode appropriée telle que l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel, l'électrophorèse capillaire ou la chromatographie en phase liquide, démontre l'absence de différences significatives entre la protéine à examiner et la préparation de référence. La cartographie des peptides peut également être utile pour démontrer que les ponts disulfure sont corrects.

DÉTERMINATION DE LA MASSE MOLÉCULAIRE

*Rétention du gène cloné.* Le pourcentage minimal de cellules contenant le vecteur du gène cloné après culture est approuvé par l'Autorité compétente.

*Protéines totales.* Détermination du rendement en protéines.

*Pureté chimique.* La pureté du produit protéinique est analysée par comparaison avec une préparation de référence par une méthode appropriée telle que la chromatographie en phase liquide, l'électrophorèse capillaire ou l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide au dodécylsulfate de sodium.

*Protéines issues de la cellule hôte.* Sauf indication contraire, les protéines issues de la cellule hôte sont détectées par des méthodes immunochimiques, par exemple à l'aide d'immunosérums polyclonaux dirigés contre les composants protéiques du système hôte-vecteur utilisé pour la fabrication du produit. Les types de méthode suivants peuvent être utilisés : dosages par déplacement en phase liquide (par exemple dosage immunoradiologique), dosages par liaison directe en phase liquide et dosages par liaison directe avec immobilisation des antigènes sur des membranes de nitrocellulose ou équivalent (par exemple titrage par immuno-empreintes, Western blots). Les exigences générales relatives à la validation des méthodes de titrage immunologique sont présentées sous *2.7.1. Méthodes immunochimiques*. En outre, les méthodes de titrage immunologique des contaminants associés aux cellules hôtes doivent satisfaire aux critères suivants.

– *Préparations d'antigènes.* Des immunosérums sont dirigés contre une préparation d'antigènes issus de l'organisme hôte, dans lequel a été inséré le vecteur utilisé pour le processus de fabrication non porteur du gène spécifique codant pour le produit. La multiplication en culture de cette cellule hôte et l'extraction des protéines sont conduites dans des conditions identiques à celles utilisées en fabrication pour la culture et l'extraction. Il est également possible d'utiliser pour la fabrication des immunosérums des préparations d'antigènes partiellement purifiées par application de certaines des phases de purification du processus de fabrication.
– *Etalonnage.* Des données quantitatives sont obtenues par comparaison avec les courbes doses/réponses établies avec des préparations étalons d'antigènes protéiniques issus de la cellule hôte. Ces préparations étant des mélanges de protéines mal définies, chaque préparation étalon doit être préparée et étalonnée selon une méthode appropriée de dosage des protéines. Cette préparation doit être conservée dans un état stable approprié à une utilisation prolongée.
– *Immunosérums.* Les immunosérums contiennent des anticorps très avides, capables d'identifier dans le mélange d'antigènes autant de protéines différentes que possible, et n'interagissent pas avec le produit.

*ADN issu de la cellule hôte et du vecteur.* L'ADN résiduel est détecté par hybridation, par des techniques analytiques indépendantes de la séquence ayant une sensibilité convenable, ou par d'autres techniques analytiques de sensibilité convenable.

**Analyse par hybridation**

L'ADN de l'échantillon à examiner est immobilisé sur une membrane de nitrocellulose (ou équivalent), dénaturé pour donner un ADN simple brin, et hybridé avec de l'ADN marqué (sondes) préparé à partir du système hôte-vecteur utilisé en fabrication. Les approches expérimentales possibles sont nombreuses, mais les méthodes d'hybridation utilisées pour mesurer l'ADN du système hôte-vecteur doivent satisfaire aux critères suivants.

– *Sondes.* De l'ADN purifié est obtenu à partir du système hôte-vecteur cultivé dans des conditions identiques à celles utilisées en fabrication. L'ADN chromosomique de l'hôte et l'ADN vecteur peuvent être préparés et utilisés comme sondes séparément.
– *Etalonnage.* Des données quantitatives sont obtenues par comparaison avec les réponses obtenues avec des préparations étalons. Les sondes d'ADN chromosomique

Monographies générales

et les sondes d'ADN vecteur sont respectivement utilisées avec des étalons d'ADN chromosomique et d'ADN vecteur. Les préparations étalons sont analysées par spectrométrie et conservées dans un état approprié à une utilisation prolongée.

– *Conditions d'hybridation.* Les conditions d'hybridation doivent être suffisamment strictes pour assurer une hybridation spécifique entre les sondes et les préparations étalons d'ADN, et les substances médicamenteuses ne doivent pas influencer l'hybridation, aux concentrations utilisées.

**Techniques indépendantes de la séquence**

Les méthodes appropriées sont soit la détection des groupements de cytosine sulfonée dans l'ADN simple brin (avec immobilisation de l'ADN sur une membrane, dérivatisation *in situ* des cytosines puis détection et analyse quantitative à l'aide d'un anticorps dirigé contre ce groupement sulfoné), soit la détection de l'ADN simple brin à l'aide d'un fragment d'ADN simple brin lié à une protéine et d'un anticorps de cette protéine. Ni l'une ni l'autre de ces méthodes ne nécessite l'emploi d'ADN spécifique de l'hôte ou du vecteur comme étalon de dosage. Toutefois, il faut valider la méthode utilisée pour s'assurer du parallélisme avec l'étalon d'ADN utilisé, de la linéarité de la réponse, de la non-interférence de la substance médicamenteuse ou des excipients de la formulation aux dilutions utilisées lors du dosage.

IDENTIFICATION, ESSAIS ET DOSAGE

Les exigences auxquelles doit satisfaire le produit final (vrac ou forme pharmaceutique) pendant toute sa durée de validité, ainsi que les méthodes d'essai spécifique, sont indiquées dans la monographie spécifique.

**01/2008:2031**

# ANTICORPS MONOCLONAUX POUR USAGE HUMAIN

## Anticorpora monoclonalia ad usum humanum

DÉFINITION

Les anticorps monoclonaux pour usage humain sont des préparations d'une immunoglobuline ou d'un fragment d'immunoglobuline, par exemple le F(ab')2, de spécificité définie, produite par un clone cellulaire unique. Ils peuvent être conjugués à d'autres substances, notamment en vue d'un radiomarquage.

Ils peuvent être obtenus à partir de lymphocytes B immortalisés, qui sont clonés et multipliés sous forme de lignées cellulaires continues, ou à partir de lignées cellulaires ayant fait l'objet d'une recombinaison génétique.

Les anticorps ayant fait l'objet d'une recombinaison génétique actuellement disponibles comprennent les anticorps suivants.

*Anticorps monoclonaux chimériques* : les domaines variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère d'un anticorps humain sont remplacés par ceux d'une espèce non humaine, qui possèdent la spécificité antigénique voulue.

*Anticorps monoclonaux humanisés* : les 3 séquences courtes hypervariables, correspondant aux zones d'interaction avec l'antigène (« complementarity determining regions »), des domaines variables non humains de chaque chaîne sont insérées dans le domaine variable d'un anticorps humain. D'autres modifications peuvent être apportées à certaines séquences pour améliorer la liaison à l'antigène.

*Anticorps monoclonaux humains recombinants* : les domaines variables respectifs de la chaîne lourde et de la chaîne légère d'un anticorps humain sont combinés avec la région constante d'un anticorps humain.

Les anticorps monoclonaux obtenus à partir de lignées cellulaires modifiées par la méthode dite de l'ADN recombinant satisfont également aux exigences de la monographie *Produits obtenus par la méthode dite de l'ADN recombinant (0784).*

Cette monographie s'applique aux anticorps monoclonaux à usage thérapeutique et prophylactique et à ceux destinés aux diagnostics *in vivo.* Elle ne s'applique pas aux anticorps monoclonaux utilisés comme réactifs dans la fabrication de médicaments. Elle ne s'applique pas non plus aux anticorps monoclonaux produits en ascite, qui font l'objet d'exigences établies par l'Autorité compétente.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

La production est basée sur un système de lot de semence comprenant une banque de cellules primaire et dans les cas appropriés une banque de cellules de travail dérivées des cellules clonées. La méthode de production est validée au cours des études de développement de façon à prévenir la transmission d'agents infectieux par le produit final. Tous les matériels biologiques et cellules utilisés pour la production sont caractérisés et sont conformes aux dispositions du chapitre *5.2.8. Réduction du risque de transmission des agents des encéphalopathies spongiformes animales par les médicaments à usage humain et vétérinaire.* Lorsque la fabrication d'anticorps monoclonaux pour usage humain fait intervenir des matières d'origine humaine ou animale, les exigences du chapitre *5.1.7. Sécurité virale* s'appliquent également. Lorsqu'un agent immunogène est utilisé, il est caractérisé et la méthode d'immunisation est décrite et documentée.

**Validation du procédé**. Au cours des études de développement, le procédé de production est validé pour les aspects suivants :

– régularité du procédé de production, notamment des méthodes de fermentation, de purification et, dans les cas appropriés, de fragmentation ;
– élimination ou inactivation des agents infectieux ;
– élimination adéquate des impuretés associées au produit et au procédé (par exemple protéines et ADN de la cellule hôte, protéine A, antibiotiques, composants des cultures cellulaires) ;
– spécificité et activité spécifique de l'anticorps monoclonal ;
– absence de pyrogènes autres que des endotoxines ;
– réutilisabilité des composants intervenant dans la purification (par exemple colonnes), avec limites ou critères d'acceptation établis en fonction de la validation ;
– méthodes utilisées pour la conjugaison, dans les cas appropriés.

**Caractérisation du produit**. Le produit fait l'objet d'une caractérisation visant à réunir des informations adéquates comprenant : l'intégrité structurelle, l'isotype, la séquence des acides aminés, la structure secondaire, la fraction glucidique, les ponts disulfure, la conformation, la spécificité, l'affinité, l'activité biologique spécifique et l'hétérogénéité (caractérisation des isoformes).

Un ensemble de techniques analytiques appropriées incluant des méthodes chimiques, physiques, immunochimiques et biologiques (par exemple cartographie peptidique, séquençage *N*-terminal et *C*-terminal, spectrométrie de masse, techniques chromatographiques, électrophorétiques et spectroscopiques) est utilisé. Des essais complémentaires sont effectués pour recueillir des informations sur la réactivité croisée avec des tissus humains.

Dans le cas des produits modifiés par fragmentation ou conjugaison, l'influence des méthodes utilisées sur l'anticorps est caractérisée.

**Intermédiaires de production**. Lorsque des intermédiaires de production sont conservés, une date de péremption ou une période de conservation justifiées par des données de stabilité est établie pour chacun.

**Titrage biologique**. Le titrage de l'activité biologique est choisi au vu de sa corrélation avec le mode d'action prévu de l'anticorps monoclonal.

**Préparation de référence**. Un lot dont la stabilité a été établie et l'adéquation démontrée par des essais cliniques, ou un lot représentatif du précédent, est utilisé comme préparation de référence pour l'identification, les essais et le dosage. La préparation de référence est convenablement caractérisée comme défini sous Caractérisation du produit, à cela près qu'il n'est pas nécessaire de vérifier la réactivité croisée pour chaque lot de préparation de référence.

**Définition du lot**. Une définition du lot (notamment la taille de lot) est requise pour l'ensemble du processus.

*CELLULES SOURCE*

Les cellules source comprennent les partenaires de fusion, les lymphocytes, les cellules myélomateuses, les cellules nourricières et les cellules hôtes (pour l'expression des anticorps monoclonaux recombinants).

L'origine et les caractéristiques de la cellule parentale sont documentées, notamment concernant l'état de santé des donneurs, ainsi que les partenaires de fusion utilisés (par exemple cellule myélomateuse, lignée lymphoblastoïde B humaine).

Lorsque cela est possible, les cellules source font l'objet d'un dépistage approprié des agents étrangers et des agents endogènes. Le choix des virus à rechercher dépend de l'espèce et du tissu d'origine.

*LIGNÉE CELLULAIRE PRODUCTRICE DE L'ANTICORPS MONOCLONAL*

L'adéquation de la lignée cellulaire productrice de l'anticorps monoclonal est démontrée par :

- une documentation sur l'historique de la lignée cellulaire, comprenant notamment une description des procédures de fusion cellulaire, d'immortalisation ou de transfection et de clonage ;
- la caractérisation de la lignée cellulaire (par exemple phénotype, analyse isoenzymatique, marqueurs immunochimiques, marqueurs cytogénétiques) ;
- la caractérisation des propriétés pertinentes de l'anticorps ;
- la stabilité de la sécrétion de l'anticorps, du point de vue des caractéristiques de l'anticorps et du taux d'expression et de glycosylation, jusqu'au niveau de doublements de population ou au nombre de générations utilisées en production de routine, ou au-delà ;
- pour les produits recombinants, la stabilité des caractéristiques génétiques et phénotypiques de l'hôte/vecteur, jusqu'au niveau de doublements de population ou au nombre de générations utilisées en production de routine, ou au-delà.

*BANQUES DE CELLULES*

La banque de cellules primaire est une suspension homogène de la lignée cellulaire productrice de l'anticorps monoclonal, répartie en volumes égaux dans des récipients individuels en une seule opération, pour conservation.

Une banque de cellules de travail est une suspension homogène du matériel cellulaire issu de la banque de cellules primaire à un niveau de passage fini, répartie en volumes égaux dans des récipients individuels en une seule opération, pour conservation.

Les cellules post-production sont des cellules cultivées jusqu'au niveau de doublements de population ou au nombre de générations utilisées en production de routine, ou au-delà.

Les essais suivants sont effectués sur la banque de cellules primaire : viabilité, identité, stérilité (bactérienne, fongique, mycoplasmique), caractérisation de l'anticorps monoclonal produit. La contamination par des virus non-endogènes est évaluée au moyen d'une gamme appropriée d'essais *in vivo* et *in vitro*. La contamination par des rétrovirus et autres virus endogènes est évaluée au moyen d'une gamme appropriée d'essais *in vitro*.

Les essais suivants sont effectués sur la banque de cellules de travail : viabilité, identité, stérilité (bactérienne, fongique, mycoplasmique). La contamination virale étrangère est évaluée au moyen d'une gamme appropriée d'essais *in vivo* et *in vitro*. Pour la première banque de cellules de travail, ces essais sont effectués sur les cellules post-production générées à partir de cette banque de cellules de travail ; pour les banques de cellules de travail suivantes, un seul essai *in vitro* et *in vivo* peut être effectué, soit directement sur la banque de cellules de travail soit sur les cellules post-production.

Pour la banque de cellules primaire et la banque de cellules de travail, des recherches de virus spécifiques sont effectuées lorsque du matériel biologique potentiellement contaminé a été utilisé pendant la préparation des banques de cellules, en fonction de l'espèce d'origine de ce matériel. Cette recherche peut ne pas être nécessaire lorsque le matériel considéré a fait l'objet d'une inactivation par des procédures validées.

Les essais suivants sont effectués sur les cellules post-production : stérilité (bactérienne, fongique, mycoplasmique). Des recherches de virus sont effectuées sur les cellules ou les surnageants de cultures cellulaires. A cet effet, la contamination par des virus non-endogènes est évaluée au moyen d'une gamme appropriée d'essais *in vivo* et *in vitro*. La contamination par des rétrovirus et autres virus endogènes est évaluée au moyen d'une gamme appropriée d'essais *in vitro*.

*CULTURE ET RÉCOLTE*

**Production à un niveau de passage fini (récolte unique)**. Les cellules sont cultivées jusqu'à un nombre maximal défini de passages ou de doublements de population (qui est fonction de la stabilité de la lignée cellulaire). La récolte du produit s'effectue en une seule opération.

**Production en culture continue (récolte multiple)**. Les cellules sont cultivées en continu pendant une durée définie (qui est fonction de la stabilité du système et de la régularité de la production). Un monitorage est nécessaire pendant toute la durée de vie de la culture ; la fréquence et le type des contrôles de monitorage dépendent de la nature du système de production.

Chaque récolte fait l'objet d'essais portant sur la teneur en anticorps, la biocharge, la présence d'endotoxines et de mycoplasmes. Des essais généraux ou spécifiques de recherche de virus étrangers sont effectués en routine à un stade approprié, selon la nature du procédé de production et les matériels utilisés. Pour les procédés de production à un niveau de passage fini (récolte unique), au moins 3 récoltes font l'objet d'une recherche de virus étrangers par une gamme appropriée de méthodes *in vitro*.

Les critères d'acceptation des récoltes avant traitement ultérieur sont clairement définis, en relation avec la stratégie de monitorage adoptée. Si la présence de virus étrangers est détectée, le procédé fait l'objet d'un examen approfondi visant à déterminer la cause de la contamination, et la récolte n'est pas soumise aux traitements ultérieurs. Les récoltes dans lesquelles a été détecté un virus endogène ne sont pas utilisées pour la purification, à moins qu'une stratégie appropriée n'ait été définie pour prévenir la transmission d'agents infectieux par le produit final.

*PURIFICATION*

On peut mélanger plusieurs récoltes avant de procéder aux traitements ultérieurs. Le procédé de purification comprend des étapes permettant d'éliminer et/ou inactiver les virus à enveloppe et les virus sans enveloppe. Un procédé de purification validé, dont la capacité à éliminer et/ou inactiver les agents infectieux ainsi qu'à éliminer les impuretés associées au produit et au procédé a été démontrée, est utilisé. Des étapes définies de ce procédé permettent d'obtenir un anticorps purifié de qualité et d'activité biologique constantes.

Les essais à effectuer sur l'anticorps monoclonal purifié dépendent de la validation du procédé, de la démonstration de sa régularité et de la teneur attendue en impuretés associées

au produit et au procédé. L'anticorps monoclonal purifié fait l'objet d'essais portant sur sa charge microbienne et la recherche d'endotoxines bactériennes, sa pureté, son intégrité et son activité ; ces essais sont effectués par des méthodes analytiques appropriées, si nécessaire avec comparaison à la préparation de référence.

S'il est prévu de stocker des intermédiaires, la stabilité de ces préparations et son impact sur la qualité ou la durée de conservation du produit fini sont évalués.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé à partir d'un ou plusieurs lots d'anticorps monoclonal purifié. Des stabilisants appropriés ou d'autres excipients peuvent être ajoutés lors de la préparation du vrac final.

Un vrac final ne peut être utilisé pour la préparation du lot final que s'il satisfait aux exigences suivantes.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*). Le vrac final satisfait à la limite approuvée pour le produit considéré.

**Impuretés associées au procédé**. Des essais appropriés sont effectués pour les protéines issues de la cellule hôte, l'ADN issu de la cellule hôte ou du vecteur et d'autres impuretés associées au procédé sur un nombre approprié de vracs finals ou de lots d'anticorps monoclonaux purifiés. Le vrac final satisfait à la limite approuvée pour le produit considéré. Lorsque la régularité du procédé de purification a été démontrée, ces essais peuvent ensuite être omis.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti en récipients stériles dans des conditions aseptiques. Les récipients sont ensuite fermés de façon à éviter toute contamination.

## CARACTÈRES

Les préparations liquides sont limpides ou légèrement opalescentes, incolores ou légèrement jaunes, sans particule visible. Les préparations cryodesséchées sont des poudres ou masses solides friables blanches ou légèrement jaunes. Après reconstitution, elles présentent les mêmes caractéristiques que les préparations liquides.

## IDENTIFICATION

L'identité est établie par des méthodes validées appropriées avec comparaison à la préparation de référence. Le dosage peut également contribuer à l'identification.

## ESSAI

**Aspect**. Les préparations liquides ou cryodesséchées reconstituées sont limpides ou légèrement opalescentes et incolores ou légèrement jaunes, sans particule visible.

**Solubilité**. Les préparations cryodesséchées se dissolvent complètement dans le volume prescrit de liquide de reconstitution, en un temps défini, en donnant une solution limpide ou légèrement opalescente, sans particule visible.

**pH** (*2.2.3*). La préparation satisfait aux limites approuvées pour le produit considéré.

**Osmolalité** (*2.2.35*) : au minimum 240 mosmol/kg, dilué pour utilisation dans les cas appropriés.

**Volume extractible** (*2.9.17*). La préparation satisfait à l'essai du volume extractible.

**Protéines totales** (*2.5.33*). La préparation satisfait aux limites approuvées pour le produit considéré.

**Distribution de taille moléculaire**. La distribution de taille moléculaire est déterminée par une méthode appropriée, par exemple la chromatographie d'exclusion (*2.2.30*). La préparation satisfait aux limites approuvées pour le produit considéré.

**Identité moléculaire et intégrité structurelle**. Selon la nature de l'anticorps monoclonal considéré, sa microhétérogénéité et ses isoformes, divers essais peuvent être utilisés pour établir l'identité moléculaire et l'intégrité structurelle. Ces essais peuvent comprendre la cartographie peptidique, la focalisation isoélectrique, la chromatographie à échange d'ions, la chromatographie à interaction hydrophobe, la cartographie oligosaccharidique, la détermination de la teneur en monosaccharides et la spectrométrie de masse.

**Pureté**. Opérez par une méthode validée appropriée, par exemple l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide au dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) (*2.2.31*), dans des conditions réductrices et non réductrices, ou l'électrophorèse capillaire (*2.2.47*). Des essais appropriés sont effectués pour le contrôle des impuretés associées au produit et au procédé.

**Stabilisant**. Dans les cas appropriés, la préparation satisfait aux limites approuvées pour le produit considéré.

**Eau** (*2.5.12*). Les produits cryodesséchés satisfont aux limites approuvées pour le produit considéré.

**Stérilité** (*2.6.1*). La préparation satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*). La préparation satisfait aux limites approuvées pour le produit considéré.

**Essais applicables aux anticorps modifiés**. Des essais appropriés sont effectués selon le type de modification réalisé.

## DOSAGE

Procédez à un dosage approprié par comparaison à la préparation de référence. Utilisez les méthodes statistiques habituelles (par exemple *5.3*) pour établir le plan d'essai et calculer les résultats.

## CONSERVATION

Comme indiqué sur l'étiquette.

*Date de péremption*. La date de péremption est calculée à partir de la date de filtration stérile, de la date de remplissage (pour les préparations liquides) ou de la date de cryodessiccation (dans les cas appropriés).

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- dans les cas appropriés, le nombre d'Unités Internationales par millilitre,
- la quantité de protéines par récipient,
- la quantité d'anticorps monoclonal dans le récipient,
- pour les préparations liquides, le volume de préparation contenu dans le récipient,
- pour les préparations cryodesséchées :
  - le nom et le volume du liquide de reconstitution à ajouter,
  - le délai d'utilisation de l'anticorps monoclonal après reconstitution,
- dans les cas appropriés, la dilution à effectuer avant utilisation du produit.

**07/2010:1433**

# DROGUES VÉGÉTALES

## Plantae medicinales

## DÉFINITION

Les drogues végétales sont essentiellement des plantes, parties de plantes ou algues, champignons, lichens, entiers, fragmentés ou brisés, utilisés en l'état, soit le plus souvent sous forme desséchée, soit à l'état frais. Certains exsudats n'ayant pas subi de traitements spécifiques sont également considérés comme des drogues végétales. Les drogues végétales doivent être définies avec précision par la dénomination scientifique botanique selon le système binomial (genre, espèce, variété, auteur).

Le terme *entier/entière* s'applique aux drogues végétales n'ayant pas subi de réduction de taille et présentées, séchées ou non, telles que récoltées. Par exemple : cynorrhodon, fruit de fenouil amer ou de fenouil doux, fleur de camomille romaine.

Le terme *fragmenté(e)* s'applique aux drogues végétales ayant subi, après récolte, une opération de réduction de taille visant à en faciliter la manutention, le séchage et/ou le conditionnement. Par exemple : quinquina, rhubarbe, passiflore.

Le terme *brisé(e)* s'applique aux drogues végétales lorsque certaines parties de la plante, particulièrement fragiles, se cassent au cours du séchage, du conditionnement et du transport. Par exemple : feuille de belladone, fleur de matricaire, cône de houblon.

Le terme *divisé(e)* s'applique aux drogues végétales ayant subi une opération de réduction de taille, autre que la pulvérisation, qui conduit à l'obtention de particules de taille telle que la description macroscopique figurant dans la monographie de la drogue végétale n'est plus applicable. Si une drogue végétale est divisée à une fin spécifique (par exemple la fabrication d'une tisane) de telle sorte qu'elle forme un produit homogène, il s'agit alors d'une préparation à base de drogue végétale. Certaines drogues végétales ainsi traitées peuvent faire l'objet de monographies spécifiques.

Sauf exception justifiée, une drogue végétale conforme à sa monographie et ayant ensuite fait l'objet d'une division en vue d'une extraction doit satisfaire, sous sa forme divisée, à la monographie de la drogue végétale, mis à part sa description macroscopique.

Le terme *drogue végétale* est synonyme du terme *substance végétale* utilisé dans la législation communautaire européenne sur les médicaments à base de plantes.



PRODUCTION

Les drogues végétales sont obtenues à partir de plantes cultivées ou sauvages. Des conditions appropriées de collecte, de culture, de récolte, de séchage, de fragmentation et de stockage sont essentielles pour garantir la qualité des drogues végétales.

Les drogues végétales sont dans la mesure du possible exemptes d'impuretés telles que la terre, la poussière, toute souillure ou autre contaminant (par exemple une contamination fongique, par les insectes ou autre contamination animale). Elles ne présentent pas de signe de pourriture.

Dans le cas où un traitement décontaminant a été utilisé, il est nécessaire de montrer qu'il n'altère pas les constituants de la plante et qu'il ne laisse pas de résidus nocifs. L'emploi d'oxyde d'éthylène est interdit pour la décontamination des drogues végétales.

IDENTIFICATION

Les drogues végétales sont identifiées par leur description macroscopique, microscopique et tout essai complémentaire éventuellement requis (par exemple un essai par chromatographie sur couche mince).

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*). Effectuez une recherche des éléments étrangers, sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée. La teneur en éléments étrangers est au maximum de 2 pour cent *m/m*, sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée. Les drogues végétales pour lesquelles il existe un risque de falsification peuvent être l'objet d'un essai spécifique approprié. Il peut s'avérer impossible d'effectuer l'essai des éléments étrangers sur une drogue végétale divisée, comme décrit sous Définition, à une fin spécifique ou en vue d'une extraction. Dans ce cas, la drogue divisée est supposée conforme à l'essai des éléments étrangers dans la mesure où la drogue végétale était conforme à l'essai avant la division.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*). Déterminez la perte à la dessiccation, sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée.

**Eau** (*2.2.13*). Pour les drogues végétales ayant une teneur élevée en huile essentielle, un essai de teneur en eau peut être effectué au lieu d'un essai de perte à la dessiccation.

**Pesticides** (*2.8.13*). Les drogues végétales satisfont aux exigences en matière de résidus de pesticides. Ces exigences prennent en compte la nature de la plante, si nécessaire la préparation à laquelle la plante est éventuellement destinée ainsi que, si disponible, la connaissance de l'historique complet du traitement du lot de la plante.

**Contamination microbienne**. Des recommandations sur la qualité microbiologique des produits exclusivement composés d'une ou de plusieurs drogues végétales sont indiquées dans le texte *5.1.4. Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles*.

**Métaux lourds** (*2.4.27*). Sauf exception justifiée et autorisée, ou indication contraire dans une monographie spécifique :

– *cadmium* : au maximum 1,0 ppm,
– *plomb* : au maximum 5,0 ppm,
– *mercure* : au maximum 0,1 ppm.

Si nécessaire, des limites peuvent être exigées pour d'autres métaux lourds.

Dans les cas appropriés, les drogues végétales satisfont à d'autres essais, comme par exemple les essais suivants.

**Cendres totales** (*2.4.16*).

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*).

**Matières extractibles**.

**Indice de gonflement** (*2.8.4*).

**Indice d'amertume** (*2.8.15*).

**Aflatoxine $B_1$** (*2.8.18*). Quand cela est nécessaire, une limite pour les aflatoxines peut être exigée.

**Ochratoxine A** (*2.8.22*). Quand cela est nécessaire, une limite peut être exigée pour l'ochratoxine A.

**Contamination radioactive**. Dans certaines circonstances particulières, il y a lieu de considérer le risque de contamination radioactive.

DOSAGE

Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les drogues végétales sont dosées par une méthode appropriée.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

**04/2008:0765**

# EXTRAITS

## Extracta

DÉFINITION

Les extraits sont des préparations liquides (extraits fluides et teintures), de consistance semi-solide (extraits mous ou fermes et oléorésines) ou solide (extraits secs), obtenues à partir de drogues végétales ou de matières animales généralement à l'état sec.

Lorsque la fabrication de médicaments fait intervenir des extraits d'origine animale, les exigences du chapitre *5.1.7. Sécurité virale* s'appliquent.

Différents types d'extraits peuvent être distingués. Les extraits titrés sont ajustés avec une tolérance acceptable à une teneur donnée en constituants ayant une activité thérapeutique connue. L'ajustement du titre de l'extrait est obtenu au moyen d'une substance inerte ou en mélangeant des lots d'extraits. Les extraits quantifiés sont ajustés à une fourchette définie de constituants en mélangeant des lots d'extraits. Les autres

extraits sont principalement définis par leur procédé de production (état de la drogue végétale ou de la matière animale à extraire, solvant, conditions d'extraction) et leurs spécifications.

PRODUCTION

Les extraits sont préparés par des procédés appropriés, en utilisant de l'éthanol ou d'autres solvants appropriés. Différents lots de drogue végétale ou de matière animale peuvent être mélangés avant extraction. Les drogues végétales ou les matières animales à extraire peuvent subir un traitement préalable (tel que l'inactivation d'enzymes, le broyage ou le dégraissage). De plus, des matières indésirables peuvent être éliminées après extraction.

Les drogues végétales, les matières animales et les solvants organiques utilisés pour la préparation des extraits satisfont aux monographies appropriées de la Pharmacopée. En ce qui concerne les extraits mous et secs dont le solvant organique est éliminé par évaporation, un solvant récupéré ou recyclé peut être utilisé à condition que les techniques de récupération soient contrôlées et enregistrées pour garantir la conformité des solvants aux spécifications appropriés avant réutilisation ou mélange avec d'autres produits approuvés. L'eau utilisée pour la préparation des extraits est de qualité appropriée. Sauf pour l'essai des endotoxines bactériennes, l'eau conforme à la section Eau purifiée en vrac de la monographie *Eau purifiée (0008)* convient. De l'eau potable peut également convenir si elle satisfait à une spécification définie assurant la production reproductible d'un extrait approprié.

Dans les cas appropriés, la concentration à la consistance souhaitée est réalisée par des procédés appropriés, généralement sous pression réduite et à une température à laquelle l'altération des constituants est réduite au minimum. Les huiles essentielles séparées lors du procédé d'extraction peuvent être rajoutées aux extraits lors d'une étape appropriée du procédé de fabrication. Des excipients appropriés peuvent être ajoutés au cours des différentes étapes du procédé de fabrication, par exemple, pour améliorer les qualités technologiques, telles que l'homogénéité ou la constance de qualité. Des stabilisants et des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent aussi être ajoutés.

L'utilisation d'un solvant d'extraction donné conduit à l'obtention de proportions types pour les constituants caractérisés de la matière extractible. Lors de la production d'extraits titrés et quantifiés, des procédures de purification peuvent être mises en oeuvre pour augmenter ces proportions par rapport aux valeurs attendues ; les extraits ainsi obtenus sont dits « purifiés ».

IDENTIFICATION

Les extraits sont identifiés selon une méthode appropriée.

ESSAI

Dans les cas appropriés, des essais de qualité microbiologique (*5.1.4*), de recherche des métaux lourds, des aflatoxines, des résidus de pesticides (*2.8.13*) dans les extraits peuvent être nécessaires en fonction de l'analyse de la drogue végétale ou de la matière animale utilisée pour la production et en fonction du procédé de production des extraits.

DOSAGE

Chaque fois qu'il est possible, les extraits sont dosés selon une méthode appropriée.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– la drogue végétale ou la matière animale utilisée,
– si l'extrait est liquide, mou ou sec ou si il s'agit d'une teinture,
– pour les extraits titrés, la teneur en constituants ayant une activité thérapeutique connue,
– pour les extraits quantifiés, la teneur en constituants (marqueurs) utilisés pour la quantification,
– le rapport entre la quantité de matière première et l'extrait natif (extrait sans excipients) (DER),
– le solvant ou les solvants utilisés pour l'extraction,
– dans les cas appropriés, qu'une drogue végétale fraîche ou une matière animale fraîche a été utilisée,
– dans les cas appropriés, que l'extrait est « purifié »,
– le nom et la quantité de tout excipient éventuellement utilisé, y compris les stabilisants et les conservateurs antimicrobiens,
– dans les cas appropriés, le pourcentage de résidu sec.

## Extraits fluides – extracta fluida

DÉFINITION

Les extraits fluides sont des préparations liquides dont, en général, 1 partie en masse ou en volume correspond à 1 partie en masse de drogue végétale ou de matière animale séchée. Ces préparations sont ajustées, si nécessaire, de façon à répondre aux exigences de la teneur en solvants, et, dans les cas appropriés, en constituants.

PRODUCTION

Les extraits fluides sont préparés en utilisant de l'éthanol de titre approprié ou de l'eau pour extraire la drogue végétale ou la matière animale ou par dissolution d'un extrait sec ou mou (produit en utilisant la même concentration de solvant d'extraction que dans la préparation de l'extrait fluide par extraction directe) de la drogue végétale ou de la matière animale, soit dans l'éthanol de titre approprié soit dans l'eau. Les extraits fluides sont filtrés si nécessaire.

Au repos, les extraits peuvent présenter un léger dépôt qui est acceptable à condition que la composition de l'extrait fluide ne soit pas modifiée de manière significative.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*). Dans les cas appropriés, l'extrait fluide satisfait aux limites prescrites dans la monographie.

**Ethanol** (*2.9.10*). Pour les extraits fluides alcooliques, effectuez la détermination de la teneur en éthanol. La teneur en éthanol correspond à celle prescrite.

**Méthanol et 2-propanol** (*2.9.11*) : au maximum 0,05 pour cent *V/V* de méthanol et au maximum 0,05 pour cent *V/V* de 2-propanol pour les extraits fluides alcooliques, sauf indication contraire.

**Résidu sec** (*2.8.16*). Dans les cas appropriés, l'extrait fluide satisfait aux limites prescrites dans la monographie, corrigées si nécessaire, en tenant compte de tout excipient utilisé.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

ÉTIQUETAGE

En plus des exigences mentionnées ci-dessus, l'étiquette indique dans les cas appropriés, la teneur pour cent *V/V* en éthanol dans l'extrait final.

## Teintures – tincturae

DÉFINITION

Les teintures sont des préparations liquides généralement obtenues soit à partir de 1 partie de drogue végétale ou de matière animale et de 10 parties de solvant d'extraction, soit à partir de 1 partie de drogue végétale ou de matière animale et de 5 parties de solvant d'extraction.

PRODUCTION

Les teintures sont préparées par macération ou percolation (une méthode schématique est indiquée ci-après) en utilisant seulement de l'éthanol d'une concentration appropriée pour l'extraction de la drogue végétale ou de la matière animale, ou par dissolution d'un extrait sec ou mou (produit en utilisant la même concentration en solvant d'extraction que dans la

Monographies générales

préparation de la teinture par extraction directe) de la drogue végétale ou de la matière animale, dans l'éthanol de titre approprié. Les teintures sont filtrées si nécessaire.

Les teintures sont généralement limpides. Au repos, les teintures peuvent présenter un léger sédiment qui est acceptable à condition que la composition de la teinture n'en soit pas modifiée de manière significative.

**Production par macération**. Sauf indication contraire, réduisez la drogue végétale ou la matière animale à extraire en morceaux de taille appropriée, mélangez uniformément avec le solvant d'extraction prescrit et laissez reposer le mélange dans un récipient fermé, pendant un temps approprié. La drogue résiduelle est séparée du liquide extractif et, si nécessaire, pressée. Dans ce cas, les 2 liquides obtenus sont réunis.

**Production par percolation**. Réduisez, si nécessaire, la drogue végétale ou la matière animale à extraire en morceaux de taille appropriée. Mélangez uniformément avec une partie du solvant d'extraction prescrit et laissez reposer pendant un temps approprié. Introduisez le mélange dans un percolateur et laissez le percolat s'égoutter lentement à température ambiante en s'assurant que la drogue végétale ou la matière animale est toujours couverte par le restant du solvant d'extraction. Le marc peut être pressé et le liquide exprimé réuni avec le percolat.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*). Dans les cas appropriés, la teinture satisfait aux limites prescrites dans la monographie.

**Ethanol** (*2.9.10*). La teneur en éthanol satisfait à celle prescrite.

**Méthanol et 2-propanol** (*2.9.11*) : au maximum 0,05 pour cent *V/V* de méthanol et au maximum 0,05 pour cent *V/V* de 2-propanol, sauf indication contraire.

**Résidu sec** (*2.8.16*). Dans les cas appropriés, la teinture satisfait aux limites prescrites dans la monographie, corrigées si nécessaire, en tenant compte de tout excipient utilisé.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

ÉTIQUETAGE

En plus des exigences mentionnées ci-dessus, l'étiquette indique :

– pour les teintures autres que les teintures titrées et quantifiées, le rapport entre la matière première et le liquide d'extraction ou entre la matière première et la teinture finale,
– la teneur pour cent *V/V* en éthanol dans la teinture finale.

## Extraits mous ou fermes – extracta spissa

DÉFINITION

Les extraits mous ou fermes sont des préparations semi-solides préparées par évaporation ou évaporation partielle du solvant ayant servi à leur extraction.

ESSAI

**Résidu sec** (*2.8.16*). L'extrait mou ou ferme satisfait aux limites prescrites dans la monographie.

**Solvants**. Les solvants résiduels sont contrôlés selon les indications du chapitre *5.4*, sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

## Oléorésines – oleoresina

DÉFINITION

Les oléorésines sont des extraits semi-solides composées d'une résine en solution dans une huile essentielle et/ou grasse, et sont obtenues par évaporation du (des) solvant(s) ayant servi à leur production.

Cette monographie s'applique aux oléorésines préparées par extraction et non aux oléorésines naturelles.

ESSAI

**Eau** (*2.2.13*). L'oléorésine satisfait aux limites prescrites dans la monographie.

**Solvants**. Les solvants résiduels sont contrôlés selon les indications du chapitre *5.4*, sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée.

CONSERVATION

En récipient étanche, à l'abri de la lumière.

## Extraits secs – extracta sicca

DÉFINITION

Les extraits secs sont des préparations solides, obtenues par évaporation du solvant ayant servi à leur production. Sauf indication dans la monographie d'une limite différente de perte à la dessiccation ou d'un essai de teneur en eau, les extraits secs présentent une perte à la dessiccation d'au maximum de 5 pour cent *m/m*.

ESSAI

**Eau** (*2.2.13*). Dans les cas appropriés, l'extrait sec satisfait aux limites prescrites dans la monographie.

**Perte à la dessiccation** (*2.8.17*). Dans les cas appropriés, l'extrait sec satisfait aux limites prescrites dans la monographie.

**Solvants**. Les solvants résiduels sont contrôlés selon les indications du chapitre *5.4*, sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée.

CONSERVATION

En récipient étanche, à l'abri de la lumière.

**01/2008:2098**

# HUILES ESSENTIELLES

## Aetherolea

*Les indications figurant dans cette monographie s'appliquent aux huiles essentielles faisant l'objet de monographies spécifiques dans la Pharmacopée Européenne. L'Autorité compétente peut décider l'application de la monographie à d'autres huiles essentielles.*

DÉFINITION

Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. Une huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition.

Les huiles essentielles peuvent subir un traitement ultérieur approprié. Elles peuvent être commercialement dénommées comme étant déterpénée, désesquiterpénée, rectifiée ou privée de « x ».

– L'*huile essentielle déterpénée* est une huile essentielle privée, partiellement ou totalement, des hydrocarbures monoterpéniques.
– L'*huile essentielle déterpénée et désesquiterpénée* est une huile essentielle privée, partiellement ou totalement, des hydrocarbures mono- et sesquiterpéniques.
– L'*huile essentielle rectifiée* est une huile essentielle qui a subi une distillation fractionnée dans le but de supprimer certains constituants ou d'en modifier la teneur.
– L'*huile essentielle privée de « x »* est une huile essentielle qui a subi une élimination partielle ou complète d'un ou de plusieurs constituants.

Monographies générales

PRODUCTION

Selon la monographie, la matière première végétale peut être fraîche, flétrie, sèche, entière, contusée ou pulvérisée.

*Entraînement à la vapeur d'eau.* L'huile essentielle est obtenue par passage de vapeur d'eau à travers une matière première végétale, dans un appareil approprié. La vapeur d'eau peut être générée par une source externe ou par de l'eau portée à ébullition en dessous de la matière première ou par de l'eau portée à ébullition dans laquelle la matière première végétale est immergée. Les vapeurs d'eau et d'huile essentielle sont condensées. L'eau et l'huile essentielle sont séparées par décantation.

*Distillation sèche.* L'huile essentielle est obtenue par chauffage à température élevée de tige ou d'écorce, sans addition d'eau ou de vapeur d'eau, dans un appareil approprié.

*Procédé mécanique.* L'huile essentielle, dite « d'expression à froid », est obtenue par un procédé mécanique sans chauffage. Il concerne, généralement, les fruits de *Citrus* et implique l'expression de l'huile essentielle du péricarpe, suivie d'une séparation par un procédé physique.

Dans certains cas, un antioxydant approprié peut être ajouté à l'huile essentielle.

CARACTÈRES

L'aspect et l'odeur d'une huile essentielle sont déterminés.

IDENTIFICATION

Les huiles essentielles sont identifiées par leur profil chromatographique en phase gazeuse ou, à défaut, par tout autre essai éventuellement requis (par exemple un essai par chromatographie sur couche mince).

ESSAI

*ESSAIS GÉNÉRAUX*

L'huile essentielle satisfait aux limites prescrites pour les essais suivants.

**Densité** (*2.2.5*).

**Indice de réfraction** (*2.2.6*).

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*).

**Huiles grasses et huiles essentielles résinifiées** (*2.8.7*).

*ESSAIS SUPPLÉMENTAIRES*

Si nécessaire, l'huile essentielle satisfait aux limites prescrites pour les essais suivants.

**Point de solidification** (*2.2.18*).

**Indice d'acide** (*2.5.1*).

**Indice de peroxyde** (*2.5.5*).

**Esters étrangers** (*2.8.6*).

**Résidu d'évaporation** (*2.8.9*).

**Eau** (*2.8.5*).

**Solubilité dans l'alcool** (*2.8.10*).

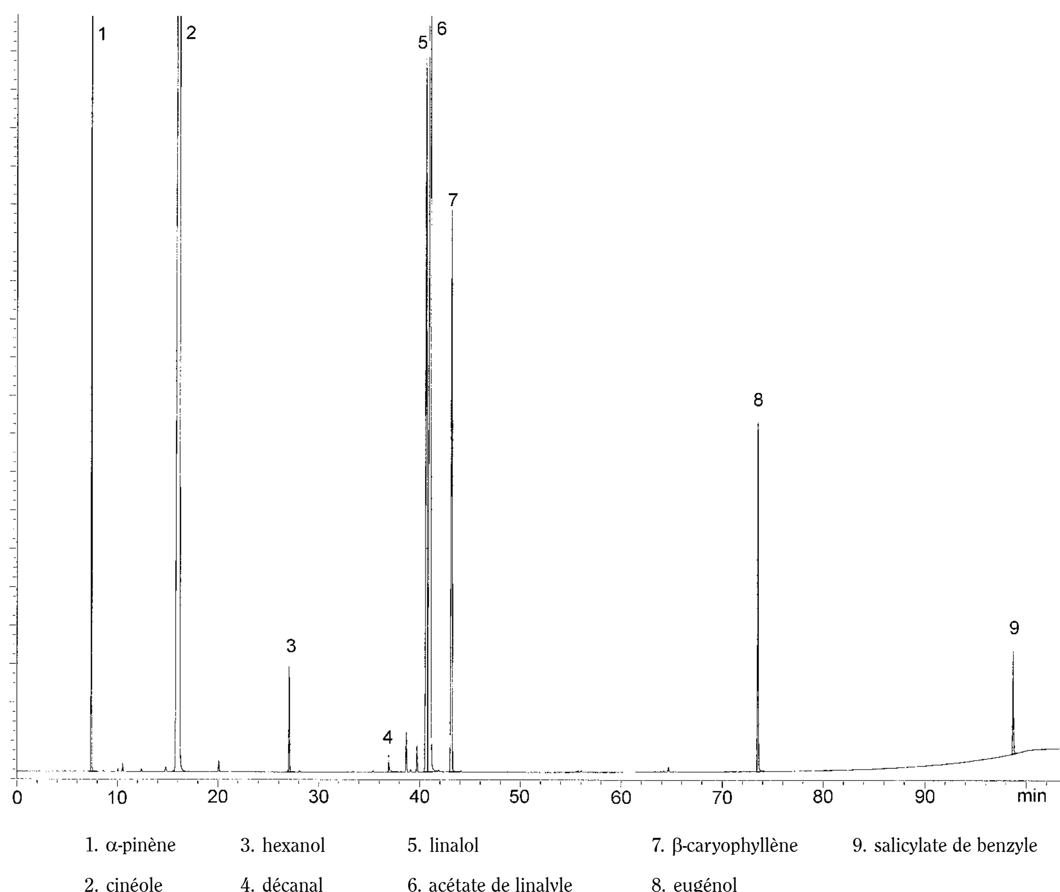
**Falsification**. Dans les cas appropriés, la recherche d'une ou de plusieurs falsifications peut être effectuée par chromatographie sur couche mince (*2.2.27*), par chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) en utilisant si nécessaire une colonne chirale, ou par tout autre moyen approprié.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

En complément de l'essai de conformité indiqué dans les monographies spécifiques, il est nécessaire de vérifier la conformité du système chromatographique par l'essai suivant, à effectuer périodiquement dans le cadre de la qualification des performances.

Le chromatogramme de la figure 2098.-1 est donné à titre d'exemple.

*Solution témoin* : *huile essentielle SCR*. Si nécessaire, la solution témoin peut être diluée avec de l'*heptane R*.




1. α-pinène 2. cinéole 3. hexanol 4. décanal 5. linalol 6. acétate de linalyle 7. β-caryophyllène 8. eugénol 9. salicylate de benzyle

Figure 2098.-1. – *Chromatogramme pour l'essai du profil chromatographique des huiles essentielles*

Monographies générales

*Colonne* :
– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 60 m, Ø = 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (0,25 μm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Rapport de division* : 1:500. Le rapport de division/volume d'injection peut être ajusté pour s'adapter à un appareillage spécifique, à condition que la charge de la colonne reste la même.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 15 | 70 |
| | 15 - 100 | 70 → 240 |
| | 100 - 105 | 240 |
| Chambre à injection | | 250 |
| Détecteur | | 270 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 μL.

*Identification des composants* : utilisez le chromatogramme fourni avec l'*huile essentielle SCR*.

*Conformité du système* : solution témoin :
– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au linalol et à l'acétate de linalyle,
– *rapport signal/bruit* : au minimum 100 pour le pic dû au décanal.
– *limites* : la teneur pour cent de chacun des 9 composants est comprise dans les limites indiquées sur la notice fournie avec l'*huile essentielle SCR*.

CONSERVATION

En récipient étanche, bien rempli, à l'abri de la lumière.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :
– le nom scientifique de la matière première végétale utilisée,
– dans les cas appropriés, le type d'huile essentielle et/ou le chémotype,
– dans les cas appropriés, la méthode de production,
– dans les cas appropriés, le nom et la concentration de tout antioxydant ajouté,
– dans les cas appropriés, les étapes de traitement additionnelles, non spécifiées sous Définition.

**01/2008:1579**
**corrigé 6.4**

## HUILES GRASSES VÉGÉTALES

### Olea herbaria

DÉFINITION

Les huiles grasses végétales sont principalement des triglycérides d'acides gras sous forme solide ou liquide. Elles peuvent contenir de petites quantités d'autres lipides tels que des cires, des acides gras libres, des glycérides partiels ou des substances insaponifiables. Les huiles grasses végétales sont obtenues à partir des graines, du fruit ou du noyau de plantes diverses par pression et/ou extraction au moyen de solvants, puis sont éventuellement raffinées et hydrogénées. Un antioxydant approprié peut être ajouté si nécessaire.

*L'huile vierge* est une huile obtenue à partir de matières premières d'une qualité particulière par des moyens mécaniques (par exemple, pression à froid, centrifugation).

*L'huile raffinée* est une huile obtenue par pression et/ou extraction au moyen de solvants, suivie soit d'un raffinage alcalin puis d'une décoloration et d'une désodorisation éventuelle, soit d'un raffinage physique.

*L'huile hydrogénée* est une huile obtenue par pression et/ou extraction au moyen de solvants suivie, soit d'un raffinage alcalin soit d'un raffinage physique, puis d'une décoloration éventuelle, suivi d'un séchage, d'une hydrogénation puis encore d'une décoloration et d'une désodorisation.

Seules les huiles obtenues par raffinage alcalin sont utilisées dans la fabrication de préparations parentérales.

PRODUCTION

Des mesures appropriées sont prises pour assurer que l'huile satisfait à la limite en benzo[a]pyrène décidée par l'Autorité compétente. Une limite de 2,0 ppb est fixée dans le Règlement (CE) n° 208/2005.

*OBTENTION D'UNE HUILE BRUTE*

Lorsque la plante présente une teneur élevée en huile, cette huile est généralement obtenue par pression avec chauffage suivie d'une extraction. En revanche, lorsque la teneur en huile est faible, elle est généralement obtenue par extraction directe.

**Procédés mécaniques**

A. Pression

*Pression au moyen d'une presse à vis à haute pression.* Cette opération comprend tout ou partie des étapes suivantes : nettoyage, séchage, écossage ou décorticage, broyage, cuisson et floconnage.

Le *nettoyage* permet de supprimer les substances étrangères. Le *séchage* peut s'avérer utile lorsque le degré d'humidité des graines est supérieur au degré souhaitable pour le traitement ultérieur de l'huile. Le *décorticage* permet d'obtenir une farine à teneur protéique élevée grâce à une réduction des fibres et d'abaisser le taux des impuretés présentes dans l'huile. La *cuisson* a plusieurs fonctions : elle permet d'achever la rupture des cellules huileuses, de diminuer la viscosité de l'huile, de coaguler les protéines dans la farine, d'ajuster le degré d'humidité, de stériliser les graines, de détoxifier les composés indésirables des graines (par exemple, le gossypol pour le coton) et de fixer certains phosphatides dans le tourteau pour diminuer ainsi les pertes induites par le raffinage. L'efficacité du procédé de pression est telle qu'il ne reste que 3 pour cent à 6 pour cent d'huile dans le tourteau.

*Pression humide au moyen d'une presse à vis.* Cette presse travaille à l'aide de cages dans lesquelles sont chargées les grappes (cas du fruit du palmier) ; ces cages sont ensuite dirigées vers un stérilisateur horizontal en présence de vapeur vive et avec chauffage. Cette étape permet l'inactivation des enzymes, la séparation des fruits de la grappe, la coagulation des protéines, etc. Après passage dans un autoclave à chaud, la pulpe est envoyée sur la presse à vis. L'huile est séparée de l'eau et des impuretés par centrifugation et séchage sous vide.

*Prépression suivie d'une extraction par un solvant.* Les étapes de ce procédé de pression sont identiques à celles décrites ci-dessus. La prépression permet avant tout d'obtenir une excellente perméabilité du tourteau, ce qui favorisera l'extraction par le solvant. L'extraction s'effectue dans un appareil à percolation ou à immersion. L'efficacité du procédé d'extraction par le solvant est telle que le taux d'huile résiduelle dans la farine est généralement inférieur à 1 pour cent.

B. Centrifugation

La centrifugation consiste à séparer la phase huileuse de la phase aqueuse contenant les constituants hydrosolubles et les particules solides résiduelles. Cette opération peut être effectuée à l'aide de :
– centrifugeuses auto-débourbeuses à bol ou à assiettes,
– superdécanteurs c'est-à-dire de turbines à axe horizontal, munies d'un bol cylindrique puis légèrement conique dans lequel tourne une vis continue raclant les parois du bol. Vis

Monographies générales

et bol tournent à des vitesses différentes. Les particules solides sont éliminées vers la partie conique du bol, l'huile s'écoulant à l'autre extrémité.

**Extraction au moyen de solvants**. Les étapes indiquées ci-après précèdent l'extraction : afin de désolidariser la cosse de la graine et de permettre à l'humidité contenue dans les graines de parvenir à un équilibre, ces dernières sont maintenues pendant environ une semaine à une température inférieure à 24 °C. Elles sont ensuite nettoyées, broyées, écossées (décortiquées) et transformées en flocons. Le solvant le plus couramment utilisé est un mélange composé principalement de *n*-hexane et de méthylpentanes (Eb : 65-70 °C) appelé communément « hexane ». En raison du risque majeur que présente ce mélange (inflammabilité et explosion), on peut également utiliser des gaz liquéfiés et supercritiques.

*RAFFINAGE*

Le raffinage a pour objectif de supprimer les impuretés et les agents de contamination de l'huile, tout en préservant autant que possible les triglycérides et en réduisant la perte d'huile. La teneur en substances indiquées ci-après est par conséquent réduite :

- acides gras libres qui peuvent détériorer l'huile par oxydation, provoquer un goût fumé en cas de chauffage et une saveur piquante (par raffinage alcalin),
- eau qui favorise les réactions d'hydrolyse enzymatique (par raffinage alcalin, séchage),
- glycérides partiels qui peuvent engendrer une émulsion et un goût amer (par neutralisation, lavage),
- phosphatides et composés phosphorés qui présentent des propriétés émulsifiantes, peuvent induire des dépôts, un noircissement de l'huile en cas de chauffage, un aspect trouble et une mauvaise stabilité organoleptique (par raffinage alcalin),
- colorants tels que chlorophylle (par raffinage alcalin), caroténoïdes (par décoloration),
- glycolipides qui peuvent former des solutions colloïdales lorsqu'ils sont mélangés à l'eau,
- hydrocarbures libres, paraffine, cires et substances résineuses,
- métaux (Fe, Cu, Pb, Sn, Pt, Pd, etc.) qui sont de puissants catalyseurs d'oxydation,
- pigments tels que le gossypol (dans l'huile de coton) ou mycotoxines telles que l'aflatoxine (principalement dans les graines d'arachide),
- pesticides,
- produits d'oxydation : aldéhydes, peroxydes,
- protéines qui peuvent induire des réactions allergiques,
- insaponifiable : stérols, tocophérols et autres vitamines,
- hydrocarbures aromatiques polycycliques.

**Procédé alcalin**. Ce procédé comprend les étapes suivantes : dégommage éventuel, neutralisation au moyen de bases, lavage et séchage.

*Dégommage.* Au cours de cette étape de raffinage, à savoir un traitement à base d'eau et/ou d'acide phosphorique et/ou de chlorure de sodium, les phosphatides, les composés phosphorés et les métaux sont éliminés. Cette étape dépend de la nature de l'huile.

*Neutralisation au moyen de bases.* Cette étape a pour objectif de ramener la teneur en acides gras libres à un taux inférieur à 0,1 pour cent. Les acides gras sont convertis en savons insolubles dans l'huile, également appelés pâtes de neutralisation. Par ailleurs, d'autres substances peuvent être éliminées par adsorption sur ces savons, en l'occurrence des mucilages, des phosphatides, des produits d'oxydation, des colorants, etc. Toute substance qui devient insoluble dans l'huile lors de l'hydratation est supprimée. La neutralisation au moyen de bases présente l'inconvénient de saponifier une partie de l'huile neutre si l'opération n'est pas correctement effectuée.

*Lavage.* Cette opération permet d'éliminer, au moyen d'eau chaude, l'excédent de savon et de bases ainsi que les résidus de métaux, les phosphatides et autres impuretés présentes à l'état de traces.

*Séchage.* Avant de passer à une autre étape, telle que la décoloration par exemple, il convient d'éliminer sous vide l'eau résiduelle.

**Procédé physique**. Le procédé physique consiste en un traitement à la vapeur, dans des conditions de vide poussé et à une température supérieure à 235 °C. Cette technique ne peut être utilisée que pour des huiles dont la teneur en phosphatides et en métaux est naturellement faible (huile de palme et de coco) ou dont les phosphatides et les métaux ont été éliminés par traitement acide à base d'acide phosphorique concentré, suivi d'un traitement par adsorption à base de terres décolorantes activées (huile de tournesol, de colza, de soja). Cette technique ne peut être appliquée à des huiles sensibles à la chaleur (huile de coton) car elles noircissent.

**Décoloration**. La méthode de décoloration traditionnelle correspond à une adsorption au moyen de terres décolorantes (naturelle ou activée) ou de charbon (activé ou non) de l'huile qui est généralement chauffée à 90 °C pendant 30 min sous vide. Des adsorbants de silice synthétique peuvent également y être ajoutés. Les substances telles que les caroténoïdes ou la chlorophylle, qui subsistent à l'état de traces après le raffinage, sont éliminées au cours de la décoloration.

**Désodorisation**. L'étape de désodorisation permet d'éliminer les flaveurs, les substances volatiles et les éventuels solvants d'extraction résiduels. Elle consiste à injecter de la vapeur sèche dans l'huile maintenue sous vide et à température élevée. Les températures varient en fonction de l'huile : 200-235 °C pendant 1,5-3 h ou plus de 240 °C pendant 30 min.

L'une des principales réactions secondaires de cette étape réside dans la décoloration thermique due à la destruction des caroténoïdes lorsque la température est supérieure à 150 °C. Cette technique implique la perte des substances qui peuvent être distillées (acides gras libres, stérols, tocophérols, partie de l'huile raffinée) et peut induire une isomérisation *cis-trans* des doubles liaisons des acides gras insaturés.

*DÉCIRAGE*

Le décirage (ou winterisation, ou frigélisation) consiste en une élimination des substances solides et des cires par filtration à basse température. Ces substances solides et cires peuvent modifier l'aspect de l'huile et provoquer des dépôts.

*HYDROGÉNATION*

L'hydrogénation de l'huile séchée et/ou décolorée s'effectue au moyen d'un catalyseur (par exemple, Ni, Pt, Pd), à une température située environ entre 100 °C et 200 °C, sous pression d'hydrogène. Le catalyseur est ensuite supprimé par filtration à 90 °C. L'hydrogène doit être pur : exempt de poisons de catalyseur, exempt d'eau, à faible teneur en dioxyde de carbone, de méthane et d'azote. De petites quantités de polymères peuvent être obtenues. Des acides gras *trans* sont formés durant une hydrogénation partielle.

*PURIFICATION CHROMATOGRAPHIQUE*

En cas d'applications requérant un degré de pureté élevé, telles que l'usage parentéral, l'huile peut être purifiée moyennant un passage à travers une colonne remplie de terres activées. L'utilisation d'un solvant peut, dans certains cas, améliorer l'efficacité de cette opération. Les molécules à forte polarité telles que les substances oxydées, les acides, les alcools, les glycérides partiels et les stérols libres sont éliminées en priorité.

Lorsque l'huile est utilisée dans la fabrication de préparations parentérales, les limites fixées pour l'indice d'acide, l'indice de peroxyde et la teneur en eau dans la monographie peuvent être différentes.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– dans les cas appropriés, que l'huile est obtenue par pression ou extraction,
– dans les cas appropriés, que l'huile convient à la fabrication de préparations parentérales.

**01/2008:0084**

# IMMUNOSÉRUMS D'ORIGINE ANIMALE POUR USAGE HUMAIN

## Immunosera ex animale ad usum humanum

DÉFINITION

Les immunosérums d'origine animale pour usage humain sont des préparations liquides ou cryodesséchées, contenant des immunoglobulines ou des fragments d'immunoglobuline purifiés obtenus à partir du sérum ou du plasma d'animaux immunisés de différentes espèces.

Les immunoglobulines ou les fragments d'immunoglobuline ont la capacité de neutraliser spécifiquement ou de se lier avec l'antigène utilisé pour l'immunisation. Les antigènes peuvent être des microbes ou d'autres toxines, des antigènes d'origine humaine, des suspensions d'antigènes bactériens ou viraux ou des venins de serpents, de scorpions ou d'araignées. La préparation est destinée à être administrée par voie intraveineuse ou intramusculaire, après dilution dans les cas appropriés.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit être établi que le procédé de production utilisé donne de façon reproductible des immunosérums dont l'innocuité, l'activité chez l'homme et la stabilité sont acceptables.

Tout réactif d'origine biologique utilisé pour la production d'immunosérum doit être exempt de toute contamination bactérienne, fongique ou virale. Les exigences générales du chapitre *5.1.7. Sécurité virale* s'appliquent à la fabrication des immunosérums d'origine animale pour usage humain, en complément des exigences plus spécifiques concernant la sécurité virale qui figurent dans cette monographie. La méthode de préparation comprend une ou plusieurs étapes dont il a été démontré qu'elles permettent d'éliminer ou d'inactiver les agents infectieux connus.

Les méthodes utilisées pour la production sont validées, efficaces, reproductibles et n'affectent pas l'activité biologique du produit.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

*Préparation de référence.* Un lot démontré approprié lors des essais cliniques, ou un autre lot représentatif est utilisé comme préparation de référence pour les essais de protéines de haute masse moléculaire et les essais de pureté.

*ANIMAUX*

Les animaux utilisés appartiennent à une espèce approuvée par l'Autorité compétente, ils sont en bonne santé et exclusivement réservés à la production d'immunosérums. Des essais sont effectués sur les animaux pour démontrer qu'ils sont exempts d'une liste définie d'agents infectieux. L'introduction d'animaux dans une colonie est effectuée selon des procédures définies, qui comportent une définition des mesures de quarantaine. Dans les cas appropriés, des agents spécifiques supplémentaires peuvent être recherchés selon la situation géographique de l'établissement où sont élevés les animaux. Leur nourriture provient d'une source contrôlée et aucune protéine animale n'y est ajoutée. Les fournisseurs d'animaux sont certifiés par l'Autorité compétente.

Si les animaux reçoivent un traitement antibiotique, une période d'attente appropriée avant la collecte de sang ou de plasma est respectée. Les antibiotiques pénicilliniques ne sont pas utilisés. Si un vaccin vivant est administré aux animaux, une période d'attente appropriée est imposée entre la vaccination et le prélèvement de sérum ou de plasma pour la production de l'immunosérum.

*IMMUNISATION*

Les antigènes utilisés sont, dans les cas appropriés, identifiés et caractérisés et, si nécessaire, démontrés exempts d'agents infectieux étrangers. Chaque antigène est identifié par son nom et un numéro de lot ; les informations sur leur source et leur préparation sont enregistrées.

Les animaux sélectionnés sont isolés pendant au moins 1 semaine, puis sont immunisés selon un schéma défini avec des injections de rappel à intervalles appropriés. Des adjuvants peuvent être utilisés.

La santé générale des animaux est surveillée et la production d'anticorps spécifiques est contrôlée à chaque cycle de l'immunisation.

Les animaux subissent un examen minutieux avant le prélèvement du sang ou du plasma. Si un animal présente une quelconque lésion pathologique non liée au procédé d'immunisation, cet animal et les animaux du même groupe ne doivent pas être utilisés, à moins qu'il ne soit évident que leur utilisation ne compromettra pas l'innocuité du produit.

*PRÉLÈVEMENT DU SANG OU DU PLASMA*

Le prélèvement du sang se fait par ponction veineuse ou par plasmaphérèse. La zone de ponction est rasée, nettoyée et désinfectée. Les animaux peuvent être anesthésiés dans des conditions qui n'affectent pas la qualité du produit. Sauf indication contraire, un conservateur antimicrobien peut être ajouté. Le sang ou le plasma sont prélevés de manière à maintenir le produit stérile. Le prélèvement est réalisé en un lieu différent du lieu de séjour ou d'élevage des animaux et du lieu de purification des immunosérums. Si le sang ou le sérum doit être conservé avant la poursuite des étapes de production, des précautions sont prises pour éviter une contamination microbienne.

Plusieurs échantillons unitaires de plasma ou de sérum peuvent être mélangés avant la purification. Avant d'être purifiés, les échantillons unitaires ou mélangés subissent les essais suivants.

**Recherches de virus contaminants**. Si un conservateur antimicrobien est ajouté, il doit être neutralisé avant d'effectuer les essais, ou les essais sont effectués sur un échantillon prélevé avant l'ajout du conservateur antimicrobien. Chaque mélange subit des essais *in vitro* appropriés pour déceler des virus contaminants.

Un essai de virus est effectué sur chaque mélange par inoculation à des cultures cellulaires capables de déceler une large gamme de virus significatifs pour le produit considéré.

**Activité**. Effectuez un titrage d'activité biologique comme indiqué dans la monographie et exprimez les résultats en Unités Internationales par millilitre, dans les cas appropriés. Une méthode *in vitro* validée peut également être utilisée.

**Teneur en protéines**. Diluez le produit à examiner dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L jusqu'à obtention d'une solution contenant environ 15 mg de protéines dans 2 mL. Dans un tube à centrifugation à fond rond, introduisez 2 mL de cette solution. Ajoutez 2 mL d'une solution de *molybdate de sodium R* à 75 g/L et 2 mL d'un mélange de 1 volume d'*acide sulfurique exempt d'azote R* et de 30 volumes d'*eau R*. Agitez, centrifugez pendant 5 min, séparez le surnageant et laissez égoutter le tube renversé sur un papier filtre. Effectuez le dosage de l'azote dans le caillot après minéralisation par l'acide sulfurique (*2.5.9*). Calculez la teneur en protéines en multipliant le résultat par 6,25. La teneur se situe dans les limites approuvées.

*PURIFICATION ET INACTIVATION VIRALE*
Les immunoglobulines sont concentrées et purifiées à partir du sérum ou du plasma par précipitation fractionnée, par chromatographie, par immunoadsorption ou par d'autres méthodes chimiques ou physiques. Elles peuvent subir ensuite un traitement enzymatique. Les méthodes sont sélectionnées et validées afin d'éviter une contamination à toutes les étapes du traitement et d'éviter la formation d'agrégats protéiques pouvant modifier les caractéristiques immunobiologiques du produit. Dans le cas d'un produit qui doit contenir des immunoglobulines fragmentées, les méthodes sont sélectionnées et validées pour garantir une fragmentation totale. Les procédés de purification utilisés sont tels qu'ils n'entraînent pas la formation de composants supplémentaires pouvant compromettre la qualité et l'innocuité du produit. Sauf exception justifiée et autorisée, l'élimination et/ou l'inactivation des virus sont effectuées selon des procédures validées. Ces procédures sont sélectionnées pour éviter la formation de polymères ou d'agrégats et minimiser la division des F(ab)'2 en fragments Fab', sauf si le produit doit être constitué de fragments Fab'.

Après la purification et le traitement pour éliminer et/ou inactiver les virus, un stabilisant peut être ajouté au produit intermédiaire, qui peut être conservé pendant une période définie au vu des données de stabilité.

Un produit intermédiaire ne peut être utilisé pour la préparation du vrac final que s'il satisfait aux exigences suivantes.

**Pureté**. Opérez par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans des conditions non réductrices (*2.2.31*), par comparaison avec une préparation de référence. L'intensité des bandes est comparée et il n'y a pas de bande supplémentaire.

*VRAC FINAL*
Le vrac final est préparé à partir d'un produit intermédiaire unique ou d'un mélange de produits intermédiaires obtenus à partir d'animaux de la même espèce. Des produits intermédiaires ayant des spécificités différentes peuvent être mélangés.
Un conservateur antimicrobien ou un stabilisant peuvent être ajoutés. Si un conservateur antimicrobien a été ajouté au sang ou au plasma, la même substance est utilisée en tant que conservateur antimicrobien dans le vrac final.

Un vrac final ne peut être utilisé pour la préparation du lot final que s'il satisfait aux exigences suivantes.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode physicochimique appropriée. Elle n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). L'immunosérum satisfait à l'essai de stérilité.

*LOT FINAL*
Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles et inviolables. Les récipients sont fermés de façon à prévenir toute contamination.
Un lot final ne peut être libéré que s'il satisfait aux exigences spécifiées ci-après sous Identification, Essai et Activité. Si les essais Osmolatité, Teneur en protéines, Distribution de taille moléculaire, Conservateur antimicrobien, Stabilisant, Pureté, Protéines étrangères, Albumine et le titrage d'activité ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent être omis sur le lot final.

*Reconstituez la préparation à examiner, comme indiqué sur l'étiquette, immédiatement avant d'effectuer l'identification, les essais (sauf ceux de solubilité et de teneur en eau) et le dosage.*

## IDENTIFICATION

L'identité est établie par des essais immunologiques et, si nécessaire, par la détermination de son activité biologique. Les essais peuvent également servir à l'identification.

## CARACTÈRES

Les immunosérums sont des liquides limpides ou opalescents, incolores ou faiblement jaunes. Ils ne présentent aucune turbidité. Les produits cryodesséchés se présentent sous forme de poudre ou de masse solide friable blanche ou légèrement jaune. Après reconstitution, ils ont les mêmes caractéristiques que les préparations liquides.

## ESSAI

**Solubilité**. Au contenu d'un récipient de la préparation à examiner, ajoutez le volume de liquide indiqué sur l'étiquette. La préparation se dissout complètement dans le temps indiqué sur l'étiquette.

**Volume extractible** (*2.9.17*). L'immunosérum satisfait à l'exigence de volume extractible.

**pH** (*2.2.3*). Le pH est dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Osmolalité** (*2.2.35*) : au minimum 240 mosmol/kg après dilution, dans les cas appropriés.

**Teneur en protéines** : 90 pour cent à 110 pour cent de la quantité indiquée sur l'étiquette, et sauf exception justifiée et autorisée, au maximum 100 g/L.

Diluez la préparation à examiner dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L jusqu'à obtention d'une solution contenant environ 15 mg de protéines dans 2 mL. Dans un tube à centrifugation à fond rond, introduisez 2 mL de cette solution. Ajoutez 2 mL d'une solution de *molybdate de sodium R* à 75 g/L et 2 mL d'un mélange de 1 volume d'*acide sulfurique exempt d'azote R* et de 30 volumes d'*eau R*. Agitez, centrifugez pendant 5 min, séparez le surnageant et laissez égoutter le tube renversé sur un papier filtre. Effectuez le dosage de l'azote dans le caillot après minéralisation par l'acide sulfurique (*2.5.9*). Calculez la teneur en protéines en multipliant le résultat par 6,25.

**Distribution de taille moléculaire**. Opérez par chromatographie liquide (*2.2.29* ou *2.2.30*). L'immunosérum est conforme à la spécification approuvée pour le produit considéré.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode physicochimique appropriée. Elle n'est pas inférieure à la teneur minimale reconnue comme étant efficace ni supérieure à 115 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

**Phénol** (*2.5.15*) : maximum 2,5 g/L pour les préparations contenant du phénol.

**Stabilisant**. Déterminez la teneur en stabilisant par une méthode physicochimique appropriée. La quantité de stabilisant n'est pas inférieure à 80 pour cent ni supérieure à 120 pour cent de la quantité indiquée sur l'étiquette.

**Pureté**. Opérez par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans des conditions non réductrices (*2.2.31*), par comparaison avec une préparation de référence. Aucune bande supplémentaire n'est trouvée dans la préparation à examiner.

**Protéines étrangères**. Après examen par des essais de précipitation avec des immunosérums spécifiques, seules des protéines de l'espèce animale déclarée sont mises en évidence, sauf indication contraire, par exemple si du matériel d'origine humaine est utilisé pendant la production.

**Albumine**. Sauf indication contraire dans la monographie, le produit, examiné par électrophorèse, ne contient pas plus d'albumine que la limite approuvée pour le produit considéré, et dans tous les cas, contient au maximum 3 pour cent.

**Eau** (*2.5.12*) : au maximum 3 pour cent.

**Stérilité** (*2.6.1*). L'immunosérum satisfait à l'essai de stérilité.

**Pyrogènes** (*2.6.8*). Sauf indication contraire justifiée et autorisée, l'immunosérum satisfait à l'essai des pyrogènes. Sauf indication contraire, injectez à chaque lapin 1 mL par kilogramme de masse corporelle.

ACTIVITÉ

Effectuez un titrage d'activité biologique comme indiqué dans la monographie et exprimez les résultats en Unités Internationales par millilitre, dans les cas appropriés. Une méthode *in vitro* validée peut également être utilisée.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière, à la température indiquée sur l'étiquette. Les immunosérums ne doivent pas être des solutions congelées.

*Date de péremption*. La date de péremption est calculée à partir du début du titrage d'activité.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- le nombre d'Unités Internationales par millilitre, dans les cas appropriés,
- la quantité de protéines par récipient,
- dans le cas des immunosérums cryodesséchés :
  - le nom et la quantité du liquide de reconstitution à ajouter,
  - la mention « à utiliser immédiatement après reconstitution »,
  - le temps requis pour une complète dissolution,
- la voie d'administration,
- les conditions de conservation,
- la date de péremption, sauf dans le cas des récipients de moins de 1 mL, conditionnés en emballage unitaire. La date de péremption peut alors être omise sur l'étiquette du récipient, à condition qu'elle figure sur celle de l'emballage extérieur, accompagnée de l'indication que le récipient doit rester dans l'emballage jusqu'au moment de l'utilisation,
- le nom de l'espèce animale d'origine,
- le nom et la quantité de tout agent antimicrobien, de tout stabilisant et de tout autre excipient.



**01/2008:0030**

# IMMUNOSÉRUMS POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Immunosera ad usum veterinarium

DÉFINITION

Les immunosérums pour usage vétérinaire sont des préparations renfermant des immunoglobulines, des immunoglobulines purifiées ou des fragments d'immunoglobulines obtenus à partir de sérum ou de plasma d'animaux immunisés. Ils peuvent constituer des préparations brutes d'antisérums polyclonaux ou des préparations purifiées.

Les immunoglobulines ou fragments d'immunoglobulines ont la capacité de neutraliser spécifiquement l'antigène utilisé pour l'immunisation. Les antigènes comprennent des toxines microbiennes ou autres, des antigènes bactériens ou viraux, des venins de serpents et des hormones. La préparation est destinée à une administration parentérale pour fournir une immunité passive.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Les immunosérums sont obtenus à partir de sérum ou de plasma d'animaux sains, immunisés par administration d'un antigène ou de plusieurs antigènes appropriés.
Il doit être démontré que la méthode de production donne de façon constante des lots d'immunosérums d'innocuité (*5.2.6*) et d'efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes.

*ANIMAUX DONNEURS*

Les animaux utilisés sont exclusivement réservés à la production d'immunosérums. Ils doivent être maintenus dans des conditions les protégeant autant que possible de l'introduction de maladies. Des essais sont effectués sur les animaux donneurs et sur tous les animaux en contact avec eux et il est démontré qu'ils sont exempts d'une liste définie d'agents infectieux.
Ces essais sont renouvelés à intervalles appropriés. La liste des agents pour lesquels des essais sont effectués inclue non seulement les agents qui sont pertinents pour l'animal donneur mais aussi ceux qui sont pertinents pour l'espèce cible recevant le produit. S'il n'a pas été démontré que les animaux donneurs sont exempts d'un agent pertinent, une justification doit être donnée et une procédure d'inactivation ou de purification validée sera incluse dans le procédé de fabrication. La nourriture des animaux provient d'une source contrôlée. Si les animaux donneurs sont des poulets, utilisez des poulets d'un élevage exempt de microorganismes pathogènes spécifiés (*5.2.2*). Si les espèces utilisées sont concernées, des mesures sont prises afin d'éviter toute contamination par les agents responsables des encéphalopathies spongiformes transmissibles.
Les animaux introduits dans le troupeau doivent autant que possible provenir d'une source connue et disposer d'un historique de leur naissance et de leur élevage. L'introduction d'animaux dans le troupeau respecte des procédures spécifiées, parmi lesquelles des mesures définies de quarantaine.
Pendant la période de quarantaine, les animaux sont placés en observation et subissent des essais afin d'établir qu'ils sont exempts des agents indiqués sur la liste définie pour les animaux donneurs. Il peut être nécessaire de rechercher des agents supplémentaires chez les animaux en quarantaine, en fonction de l'historique connu de leur naissance et de leur élevage ou de toute information manquante concernant leur origine.

Tout traitement médical de routine ou thérapeutique administré aux animaux pendant ou après la période de quarantaine doit être enregistré.

*ANTIGÈNE IMMUNISANT*

Les principes décrits dans la section Production de la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)* s'appliquent à la production de l'immunogène. L'antigène utilisé est identifié et caractérisé. Les matières premières utilisées pour la préparation de l'antigène doivent être contrôlées pour réduire autant que possible tout risque de contamination par des agents étrangers. L'antigène peut être mélangé avec un adjuvant approprié. L'immunogène doit être produit par lots. Les lots doivent être préparés et contrôlés de façon à garantir pour chaque lot une innocuité équivalente et l'absence d'agents étrangers ainsi que la production d'une réponse immunitaire satisfaisante et reproductible.

*IMMUNISATION*

Les animaux donneurs sont immunisés selon un schéma défini. Pour chaque animal, les détails concernant la dose d'antigène immunisant, la voie d'administration et les dates d'administration doivent être enregistrés. Les animaux sont maintenus sous surveillance médicale générale et l'apparition d'anticorps spécifiques est contrôlée aux étapes appropriées de la procédure d'immunisation.

*PRÉLÈVEMENT DU SANG OU DU PLASMA*

Les animaux sont minutieusement examinés avant chaque prélèvement. Seuls des animaux sains peuvent être utilisés comme donneurs. Le prélèvement du sang est fait par ponction veineuse ou plasmaphérèse. La zone de ponction est rasée, nettoyée et désinfectée. La méthode de prélèvement et le volume à prélever à chaque fois doivent être spécifiés. Le sang ou le plasma sont prélevés de façon à conserver la stérilité du produit. Si le sérum ou le plasma sont conservés dans l'attente d'un traitement ultérieur, des précautions sont prises pour éviter une contamination microbienne.
Le prélèvement du sang ou du plasma est effectué en dehors du lieu où les animaux sont maintenus ou élevés et du lieu où l'immunosérum est ultérieurement traité.

Des critères clairs doivent être établis pour déterminer le temps écoulé entre l'immunisation et le premier prélèvement de sang ou de plasma ainsi que le temps écoulé entre les prélèvements ultérieurs et la durée de la période sur laquelle les prélèvements sont effectués. Les critères appliqués doivent tenir compte

de l'effet des prélèvements sur la santé et le bien-être de l'animal ainsi que de l'effet, à plus ou moins long terme, sur la reproductibilité de la production des lots de produit fini.

Le taux de clairance des résidus pouvant survenir du fait de l'antigène immunisant ou de médicaments administrés doit être pris en compte. En cas de risque de résidus issus de substances chimiques, il peut être envisagé d'inclure une période de retrait pour le produit fini. Si l'agent immunisant est un organisme vivant, il se peut que le temps écoulé entre l'immunisation et le prélèvement doive tenir compte du temps nécessaire au donneur pour éliminer l'immunogène, en particulier si des organismes vivants résiduels peuvent être néfastes au receveur.

*PRÉPARATION DU PRODUIT FINI*

Plusieurs prélèvements individuels de plasma ou de sérum peuvent être mélangés pour former un vrac destiné à la préparation d'un lot. Le nombre de prélèvements pouvant être utilisés pour produire un vrac et la taille du vrac doivent être définis. Si un mélange n'est pas effectué, la procédure de production doit être très minutieusement contrôlée pour garantir une reproductibilité satisfaisante du produit.

La substance active doit subir une procédure de purification et/ou d'inactivation sauf si l'omission d'une telle étape a été justifiée et autorisée par l'Autorité compétente. La procédure appliquée doit avoir été validée et il doit avoir été établi qu'elle ne nuit pas à l'activité biologique du produit. Les études de validation doivent établir la capacité de la procédure à inactiver ou à éliminer tous les contaminants potentiels, comme les agents pathogènes pouvant être transmis par l'animal donneur à l'espèce cible receveuse, et les agents infectieux comme ceux qui sont responsables d'infections ubiquistes chez les animaux donneurs et qui sont difficiles à éliminer chez ces animaux donneurs.

En ce qui concerne les immunosérums purifiés, les globulines contenant les substances immunisantes peuvent être obtenues à partir de l'immunosérum brut par traitement enzymatique et précipitation fractionnée, ou par d'autres méthodes physiques ou chimiques appropriées.

**Conservateurs antimicrobiens**. Les conservateurs antimicrobiens sont employés pour empêcher l'altération de la préparation ou éviter des effets indésirables suite à une contamination microbienne de l'immunosérum pendant son utilisation. Les conservateurs antimicrobiens ne sont pas incorporés dans les préparations cryodesséchées ; cependant, en fonction de la période maximale d'utilisation recommandée de l'immunosérum après reconstitution, ils peuvent être incorporés dans le diluant des préparations multidoses cryodesséchées. Généralement, il n'est pas acceptable d'incorporer un conservateur antimicrobien dans les préparations liquides unidoses, mais l'ajout d'un conservateur antimicrobien peut être acceptable, par exemple lorsque le même immunosérum est réparti en récipients unidoses et multidoses et n'est pas destiné à une utilisation chez des espèces pouvant être consommées. Dans le cas de préparations multidoses liquides, la nécessité d'un conservateur antimicrobien est évaluée en fonction de la possibilité de contamination pendant l'utilisation de l'immunosérum et de la période maximale d'utilisation recommandée du récipient entamé.

Au cours de la phase de développement, l'efficacité du conservateur antimicrobien pendant toute la durée de validité doit être démontrée à l'Autorité compétente.

L'efficacité du conservateur antimicrobien est évaluée comme décrit au chapitre *5.1.3* ; dans le cas d'une préparation multidose, des échantillons sont également prélevés afin de contrôler l'effet du conservateur antimicrobien sur la durée proposée de conservation après ouverture. Lorsque ni les critères A ni les critères B ne peuvent être respectés, dans les cas justifiés les critères suivants sont appliqués aux immunosérums pour usage vétérinaire : bactéries, pas d'augmentation à 24 h et 7 jours, réduction de 3 log à 14 jours, pas d'augmentation à 28 jours ; champignons, pas d'augmentation à 14 jours et 28 jours.

L'addition d'antibiotiques en tant que conservateurs antimicrobiens n'est pas acceptable.

Sauf indication contraire dans la monographie, le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable, qui sont ensuite fermés pour exclure toute contamination.

La préparation peut être cryodesséchée.

*Contrôles en cours de fabrication.* Des essais appropriés sont effectués en cours de fabrication, par exemple sur des échantillons provenant des prélèvements avant qu'ils ne soient mélangés pour former un vrac.

*ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT*

Les essais nécessaires à la démonstration de la conformité d'un lot de produit sont variables et dépendent d'un certain nombre de facteurs, y compris la méthode détaillée de production. Les essais devant être effectués par un fabricant sur un produit particulier sont choisis en accord avec l'Autorité compétente. Si un produit est soumis à un procédé validé d'inactivation des agents étrangers, l'essai des agents étrangers peut ne pas être effectué sur ce produit sous réserve de l'autorisation de l'Autorité compétente. Si un produit est soumis à un procédé validé d'inactivation de mycoplasmes, l'essai des mycoplasmes peut ne pas être effectué sur ce produit sous réserve de l'autorisation de l'Autorité compétente.

Seul peut être libéré pour utilisation un lot qui satisfait à chacune des exigences le concernant indiquées ci-après sous Identification, Essai et Activité et/ou dans la monographie spécifique concernée. En accord avec l'Autorité compétente, certains essais peuvent être omis si des essais en cours de fabrication donnent une garantie au moins équivalente de la conformité du lot ou si d'autres essais validés par rapport à la méthode de la Pharmacopée ont été effectués.

Certains essais, par exemple les essais de conservateur antimicrobien, des protéines étrangères et de l'albumine, peuvent être effectués par le fabricant sur le vrac final plutôt que sur le(s) lot(s) ou sous-lots de produit fini préparés à partir du vrac. Dans certaines circonstances, par exemple si les prélèvements sont faits dans des poches de plasmaphérèse, chaque poche constituant par essence un lot, les essais peuvent être effectués sur des mélanges d'échantillons, avec l'accord de l'Autorité compétente.

Il est admis que, conformément aux Prescriptions générales (section 1.1. Généralités), en ce qui concerne un immunosérum reconnu, l'application en routine de l'essai d'innocuité peut ne pas être exigée par l'Autorité compétente dans l'intérêt du bien-être des animaux si un nombre suffisant de lots consécutifs a été produit et s'il a été établi que ces lots ont satisfait à l'essai, démontrant ainsi la reproductibilité du procédé de fabrication. Des modifications significatives du procédé de fabrication peuvent nécessiter le rétablissement des essais de routine pour à nouveau établir la reproductibilité. Le nombre de lots consécutifs devant être testés dépend d'un certain nombre de facteurs comme le type d'immunosérum, la fréquence de production des lots et l'expérience acquise sur l'immunosérum lors des essais d'innocuité au cours du développement et lors de l'application des essais d'innocuité effectués sur chaque lot. Sans préjuger de la décision de l'Autorité compétente, à la lumière des informations disponibles pour un immunosérum donné, le contrôle de 10 lots consécutifs sera généralement suffisant pour la plupart des produits. Pour les produits présentant un risque inhérent quant à leur innocuité, il peut être nécessaire de continuer à effectuer l'essai d'innocuité sur chaque lot.

*Essais sur animaux.* En accord avec les dispositions de la Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, les essais doivent être effectués de façon à utiliser un nombre minimal d'animaux et à causer un minimum de douleur, de souffrance, de détresse ou de dommage prolongé. Les critères concernant l'évaluation des essais dans les monographies doivent s'appliquer dans ce cadre. Par exemple, s'il est indiqué

Monographies générales

qu'un animal est considéré comme étant positif, infecté, etc. si surviennent des signes cliniques typiques ou la mort, l'animal en question doit alors, dès l'obtention d'indications suffisantes d'un résultat positif, soit être euthanasié, soit être traité de façon appropriée pour éviter toute souffrance inutile. Conformément aux Prescriptions générales, des méthodes d'essai de substitution peuvent être utilisées pour démontrer la conformité à la monographie et l'utilisation de tels essais est particulièrement encouragée si elle conduit au remplacement ou à la réduction de l'utilisation d'animaux ou à la réduction de leurs souffrances.

**pH** (*2.2.3*). Le pH des immunosérums bruts et purifiés doit se situer dans les limites approuvées pour les produits.

**Formaldéhyde**. Si le formaldéhyde est utilisé pour la production d'immunosérum, un essai de détection du formaldéhyde libre est effectué comme prescrit sous Essai.

**Autres agents d'inactivation**. Lorsqu'un autre procédé d'inactivation est employé, des essais appropriés sont effectués pour démontrer que l'agent d'inactivation est éliminé soit totalement, soit jusqu'à un taux résiduel acceptable.

**Essai d'activité effectué sur chaque lot**. S'il existe une monographie spécifique pour le produit, l'essai décrit sous Activité n'est pas nécessairement effectué en essai de routine des immunosérums. Le type d'essai d'activité à effectuer sur chaque lot dépend des indications déclarées du produit. Des essais *in vitro* doivent être utilisés autant que possible. Les types d'essais exigés peuvent comprendre la mesure des anticorps dirigés contre des organismes infectieux spécifiques, la détermination du type d'anticorps (par exemple neutralisant ou opsonisant). Tous les essais doivent être validés. Les critères d'acceptabilité doivent être fixés par rapport à un lot dont il a été établi qu'il était conforme aux exigences spécifiées sous Activité si une monographie spécifique existe pour le produit, et dont l'efficacité a été démontrée satisfaisante, conformément aux indications déclarées pour le produit.



**Immunoglobulines totales**. Un essai relatif aux immunoglobulines totales et/ou aux gammaglobulines totales et/ou aux classes d'immunoglobulines spécifiques doit être effectué. Les résultats obtenus doivent satisfaire aux limites fixées pour le produit en accord avec l'Autorité compétente. La concentration en immunoglobulines dans le lot n'est pas supérieure à celle dont l'innocuité a été démontrée lors des études d'innocuité et, à moins que l'essai d'activité effectué sur chaque lot ne couvre de manière spécifique toutes les immunoglobulines appropriées, la concentration en immunoglobulines dans le lot n'est pas inférieure à celle du (des) lot(s) dont l'efficacité a été démontrée lors des études d'efficacité.

**Protéines totales**. Pour les produits dont des indications déclarées se rapportent à la teneur en protéines, de même qu'il est demandé de démontrer que la teneur dans le lot n'est pas supérieure à la limite supérieure indiquée, il doit être établi que la teneur en protéines totales dans le lot n'est pas inférieure à celle du (des) lot(s) dont l'efficacité a été démontrée lors des études d'efficacité.

**Agents étrangers**. En plus de l'essai décrit sous Essai, des essais spécifiques peuvent être exigés selon la nature de la préparation, son risque de contamination et l'utilisation du produit. En particulier, des essais spécifiques concernant des agents pathogènes potentiels importants peuvent être exigés si le donneur et le receveur sont de même espèce et si ces agents ne peuvent être décelés avec fiabilité lors de l'essai général de détection décrit sous Essai.

**Eau**. Dans les cas appropriés, le procédé de cryodessiccation est vérifié par une détermination de la teneur en eau et il est établi que la teneur en eau est conforme aux limites fixées pour le produit.

IDENTIFICATION

L'identité du produit est établie par des essais immunologiques et, si nécessaire, par la détermination de son activité biologique. L'essai de l'activité peut également servir à l'identification.

ESSAI

*Les exigences suivantes s'appliquent aux immunosérums liquides et aux immunosérums cryodesséchés reconstitués.*

**Protéines étrangères**. Les protéines des immunosérums, précipitées par les antisérums spécifiques des protéines plasmatiques d'une série d'espèces appropriée, sont exclusivement celles de l'espèce animale déclarée comme ayant fourni l'immunosérum.

**Albumine**. Les immunosérums purifiés satisfont à l'essai de l'albumine. Sauf indication contraire dans la monographie, les immunosérums purifiés, examinés par électrophorèse, ne contiennent éventuellement de l'albumine qu'à l'état de traces et la teneur en albumine de la préparation reconstituée le cas échéant n'est en aucun cas supérieure à 30 g/L.

**Protéines totales**. Diluez la préparation à examiner avec une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L pour obtenir une solution présumée contenir environ 15 mg de protéines dans 2 mL. Dans un tube à centrifugation à fond rond, introduisez 2 mL de cette solution. Ajoutez 2 mL d'une solution de *molybdate de sodium R* à 75 g/L et 2 mL d'un mélange de 1 volume d'*acide sulfurique exempt d'azote R* et de 30 volumes d'*eau R*. Agitez, centrifugez pendant 5 min, éliminez le surnageant et laissez s'égoutter le tube retourné sur un papier filtre. Effectuez le dosage de l'azote dans le culot de centrifugation après minéralisation par l'acide sulfurique (*2.5.9*). Calculez la teneur en protéines en multipliant le résultat par 6,25. Les résultats obtenus ne sont pas supérieurs à la limite maximale indiquée sur l'étiquette.

**Conservateur antimicrobien**. Déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode physicochimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à la valeur minimale efficace préalablement établie, ni supérieure à 115 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

**Formaldéhyde** (*2.4.18*). Les préparations traitées par le formaldéhyde contiennent au maximum 0,5 g/L de formaldéhyde libre, sauf s'il a été démontré qu'une teneur plus élevée est bien tolérée.

**Stérilité** (*2.6.1*). Les immunosérums pour usage vétérinaire satisfont à l'essai de stérilité. Lorsque le volume du liquide contenu dans le récipient est supérieur à 100 mL, il est recommandé d'utiliser, si possible, la technique de filtration sur membrane. Si cette technique est utilisée, le temps d'incubation du milieu ne doit pas être inférieur à 14 jours. Lorsque la technique de filtration sur membrane ne peut être employée, la méthode d'inoculation directe peut être utilisée. Lorsque le volume de liquide dans chaque récipient est d'au moins 20 mL, la prise d'essai à utiliser pour chaque milieu de culture est d'au minimum 10 pour cent de ce volume, ou 5 mL en choisissant la valeur la plus petite. Le nombre approprié d'unités à examiner (*2.6.1*) représente 1 pour cent du lot avec un minimum de 4 et un maximum de 10.

**Mycoplasmes** (*2.6.7*). Les immunosérums pour usage vétérinaire satisfont à l'essai des mycoplasmes.

**Innocuité**. Un essai est effectué sur une des espèces pour lesquelles le produit est recommandé. Sauf si une surdose est spécifiquement contre-indiquée sur l'étiquette, il est administré par la voie indiquée 2 fois la dose maximale recommandée pour l'espèce utilisée. En cas d'avertissement contre l'administration d'une surdose, une dose unique est administrée. Pour les produits destinés aux mammifères, utilisez 2 animaux de l'âge minimal pour lequel le produit est recommandé. Pour les produits aviaires, utilisez au minimum 10 oiseaux de l'âge minimal recommandé. Les oiseaux sont maintenus

en observation pendant 21 jours. Les autres espèces sont maintenues en observation pendant 14 jours. Il ne se produit aucune réaction anormale, locale ou générale.

**Agents étrangers**. Effectuez une recherche des agents étrangers par inoculation de cultures cellulaires sensibles aux agents pathogènes de l'espèce de l'animal donneur et de cellules sensibles aux agents pathogènes de chacune des espèces cibles receveuses indiquées sur l'étiquette (*2.6.25*). Placez les cellules en observation pendant 14 jours. Pendant cette période, effectuez au moins un passage. Les cellules sont examinées quotidiennement pour déceler tout effet cytopathogène et elles sont examinées à la fin des 14 jours afin de déceler la présence d'un agent hémadsorbant. Le lot satisfait à l'essai si aucun signe de la présence d'agents étrangers n'est décelé.

Pour les immunosérums d'origine aviaire, si un essai effectué sur cultures cellulaires est insuffisant pour détecter d'éventuels agents étrangers, effectuez un essai par inoculation d'oeufs embryonnés obtenus à partir d'élevages de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (*5.2.2*) ou, par toute autre méthode appropriée (réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) par exemple).

ACTIVITÉ

Effectuez un essai de l'activité approprié.

S'il existe une monographie spécifique, effectuez le titrage biologique prescrit dans la monographie et exprimez le résultat en Unités Internationales par millilitre, lorsqu'elles existent.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière, à une température de 5 ± 3 °C. Les préparations liquides ne doivent pas être congelées.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- que la préparation est à usage vétérinaire,
- si la préparation est purifiée ou non,
- le nombre minimal d'Unités Internationales par millilitre lorsqu'elles existent,
- le volume de la préparation contenu dans le récipient,
- les indications du produit,
- le mode d'emploi comprenant la durée de l'intervalle entre les administrations et le nombre maximal d'administrations recommandé,
- la (les) espèce(s) cible(s) receveuse(s) auxquelles l'immunosérum est destiné,
- les doses recommandées pour les différentes espèces,
- la (les) voie(s) d'administration,
- le nom de l'espèce des animaux donneurs,
- la teneur maximale en protéines totales,
- le nom et la quantité de tout agent antimicrobien ou de tout autre excipient,
- les contre-indications pour l'utilisation de l'immunosérum, y compris tout avertissement nécessaire concernant les dangers de l'administration d'une surdose,
- dans le cas des immunosérums cryodesséchés :
  - le nom ou la composition et la quantité du liquide à ajouter,
  - la période pendant laquelle l'immunosérum peut être utilisé après reconstitution.

**01/2008:1435**

# PLANTES POUR TISANES

## Plantae ad ptisanam

DÉFINITION

Les plantes pour tisanes sont constituées exclusivement d'une ou plusieurs drogues végétales destinées à des préparations aqueuses buvables par décoction, infusion ou macération. La préparation est réalisée au moment de l'emploi.

Les plantes pour tisanes sont le plus souvent présentées en vrac ou en sachet-dose.

Les drogues végétales utilisées satisfont aux monographies appropriées individuelles de la Pharmacopée Européenne ou en leur absence à la monographie générale *Drogues végétales (1433)*.

Les recommandations sur la qualité microbiologique des plantes pour tisanes (*5.1.4. – Catégorie 4*) prennent en compte le mode de préparation préconisé (intervention d'eau bouillante ou non).

IDENTIFICATION

L'identité des drogues végétales présentes dans les plantes pour tisanes est vérifiée par des examens botaniques.

ESSAI

La proportion des drogues végétales présentes dans les plantes pour tisanes est vérifiée par des méthodes appropriées.

Les plantes pour tisanes présentées en sachet-dose satisfont à l'essai suivant.

**Uniformité de masse**. Déterminez la masse moyenne de 20 unités prélevées au hasard en procédant de la façon suivante : pesez un sachet-dose pour tisane plein ; ouvrez-le sans perdre de fragments. Videz-le complètement en vous aidant d'un pinceau. Pesez le sachet vide et calculez la masse du contenu par différence. Répétez l'opération sur les 19 autres sachets-doses. Sauf exception justifiée, la masse individuelle du contenu de 2 au plus des 20 unités peut s'écarter de la masse moyenne du contenu d'un pourcentage plus élevé que celui qui est indiqué dans le tableau ci-après, et la masse du contenu d'aucune unité ne peut s'écarter de plus du double de ce pourcentage.

| Masse moyenne | Ecarts limites en pourcentage de la masse moyenne |
|---|---|
| moins de 1,5 g | 15 pour cent |
| 1,5 g à 2,0 g inclus | 10 pour cent |
| plus de 2,0 g | 7,5 pour cent |

CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

**07/2010:1434**

# PRÉPARATIONS À BASE DE DROGUES VÉGÉTALES

## Plantae medicinales praeparatae

DÉFINITION

Les préparations à base de drogues végétales sont des produits homogènes obtenus en soumettant les drogues végétales à des traitements tels que l'extraction, la distillation, l'expression, le fractionnement, la purification, la concentration ou la fermentation.

Ce sont, par exemple, des extraits, des huiles essentielles, des jus d'expression, des exsudats ayant subi un traitement, ou des drogues végétales ayant subi une opération de réduction de taille pour des applications spécifiques (par exemple, divisées pour des tisanes ou pulvérisées pour une encapsulation).

Les plantes pour tisane satisfont à la monographie *Plantes pour tisanes (1435).*

*REMARQUE* : le terme *concassé* utilisé dans la législation communautaire européenne sur les médicaments à base de plantes décrit une drogue végétale divisée ou pulvérisée. Ce terme est traduit dans la Pharmacopée Européenne par *finement divisé*.

Le terme *préparations à base de drogues végétales* est synonyme du terme *préparations à base de plantes* utilisé dans la législation communautaire européenne sur les médicaments à base de plantes.

**01/2008:0125**

# PRÉPARATIONS RADIOPHARMACEUTIQUES

## Radiopharmaceutica

DÉFINITION

Dans le cadre de la présente monographie générale, sont considérées comme préparations radiopharmaceutiques :

– médicament radiopharmaceutique : tout médicament qui, lorsqu'il est prêt à l'emploi, contient un ou plusieurs radionucléides (isotopes radioactifs), incorporés à des fins médicales,
– générateur radionucléidique : tout système contenant un radionucléide parent déterminé servant à la production d'un radionucléide de filiation, obtenu par élution ou par toute autre méthode et utilisé dans un médicament radiopharmaceutique,
– trousse pour préparation radiopharmaceutique : toute préparation qui doit être reconstituée et/ou combinée avec des radionucléides dans le produit radiopharmaceutique final, généralement avant son administration,
– précurseur radiopharmaceutique : tout autre radionucléide produit pour le marquage d'une autre substance, avant administration.

Un nucléide est une espèce atomique caractérisée par le nombre de protons et de neutrons contenus dans son noyau (donc par son numéro atomique Z et son nombre de masse A) ainsi que par son état énergétique. Les isotopes d'un élément sont des nucléides ayant le même numéro atomique mais des nombres de masse différents. Les nucléides qui sont constitués d'un arrangement instable de protons et de neutrons se transforment spontanément, avec une probabilité statistique constante, en une autre combinaison, stable ou instable, de protons et de neutrons. Ces nucléides sont dits radioactifs et sont appelés radionucléides. Le nucléide instable initial est appelé radionucléide parent et celui auquel il donne naissance, nucléide de filiation.

La décroissance ou transformation radioactive peut s'effectuer par émission de particules chargées, capture d'électrons (CE) ou transition isomérique (TI). Les particules chargées émises par le noyau peuvent être des particules alpha (noyau d'hélium, nombre de masse 4) ou bêta de charge négative (appelés « électrons » en général) ou positive, (appelés « positons » en général). L'émission par le noyau de particules chargées peut s'accompagner d'une émission de rayonnements gamma. Des rayonnements gamma sont également émis au cours des transitions isomériques. Ces émissions de rayonnements gamma peuvent être partiellement remplacées par l'éjection d'électrons dits électrons de conversion interne. Ce phénomène, de même que celui de la capture d'électrons, entraîne une émission secondaire de rayons X (due à la réorganisation des électrons dans l'atome). Enfin, cette émission secondaire peut à son tour être partiellement substituée par l'éjection d'électrons dits électrons Auger. Les radionucléides présentant un déficit en neutrons peuvent se désintégrer en émettant des positons ; ils sont appelés émetteurs de positons. Les positons s'annihilent au contact des électrons, et ce processus s'accompagne généralement de l'émission de deux photons gamma émis à 180° l'un de l'autre, avec une énergie de 511 keV (rayonnement d'annihilation).

La décroissance d'un radionucléide est régie par les lois de la probabilité, avec une constante de désintégration caractéristique, et suit une loi exponentielle. Le temps nécessaire pour qu'une quantité donnée du radionucléide ait décru jusqu'à la moitié de sa valeur initiale est appelé période ou demi-vie ($T_{1/2}$).

Le pouvoir pénétrant des différents rayonnements varie considérablement selon leur nature et leur énergie. Les particules alpha sont totalement absorbées dans la matière sur une épaisseur de quelques micromètres à quelques dizaines de micromètres. Les particules bêta sont totalement absorbées dans la matière sur une épaisseur de quelques millimètres à quelques centimètres. Les rayonnements gamma sont atténués, mais jamais totalement absorbés (il faut par exemple plusieurs centimètres de plomb pour obtenir une diminution d'un facteur 10). Pour la plupart des substances absorbantes : plus la substance absorbante est dense, plus le parcours des particules alpha et bêta est court et l'atténuation des rayonnements gamma importante.

Chaque radionucléide est caractérisé par une période invariable, exprimée en unités de temps, et par la nature et l'énergie de son (ses) rayonnement(s). Cette énergie est exprimée en électronvolts (eV), kiloélectronvolts (keV) ou mégaélectronvolts (MeV).

En général l'expression « radioactivité » est utilisée pour décrire le phénomène de décroissance radioactive et pour décrire la quantité physique (activité) de ce phénomène. La radioactivité d'une préparation est le nombre de désintégrations ou transformations nucléaires se produisant dans cette préparation par unité de temps.

Dans le Système International d'unités (SI), la radioactivité est exprimée en becquerel (Bq), un becquerel correspondant à 1 transformation nucléaire par seconde. La mesure absolue de la radioactivité ne peut être effectuée que dans un laboratoire spécialisé, mais l'identification et la mesure du rayonnement peuvent être réalisées de façon relative, par comparaison à des préparations étalons fournies par des laboratoires agréés par les autorités compétentes.

**Pureté radionucléidique** : pour un radionucléide donné, rapport, exprimé en pourcentage, de la radioactivité attribuable à ce radionucléide à la radioactivité totale de la préparation radiopharmaceutique. La liste des impuretés radionucléidiques à considérer est donnée dans chaque monographie spécifique, avec les limites correspondantes.

**Pureté radiochimique** : pour un radionucléide donné, rapport, exprimé en pourcentage, de la radioactivité attribuable à la forme chimique indiquée à la radioactivité totale attribuable à ce radionucléide dans la préparation radiopharmaceutique. La liste des impuretés radiochimiques à considérer est donnée dans chaque monographie spécifique, avec les limites correspondantes.

**Pureté chimique** : dans les monographies sur les préparations radiopharmaceutiques la pureté chimique exigée est fixée par spécification de limites pour les impuretés chimiques.

**Entraîneur isotopique** : isotope stable de l'élément considéré, qui se trouve présent dans la préparation radioactive ou lui est ajouté sous la même forme chimique que le radionucléide.

**Radioactivité spécifique** : radioactivité d'un radionucléide par unité de masse de l'élément ou de la forme chimique considérée.

**Concentration radioactive** : radioactivité d'un nucléide par unité de volume.

**Radioactivité totale** : radioactivité d'un nucléide par unité (flacon, capsule, ampoule, générateur, etc).

**Matière première** : tout constituant utilisé pour la production d'une préparation radiopharmaceutique.

**Durée de validité** : durée pendant laquelle la conformité à toutes les spécifications de la monographie est exigée. La mention « Date de péremption : ... (date et, si nécessaire, temps) » doit être clairement indiquée.

PRODUCTION

Chaque monographie de préparation radiopharmaceutique décrit de façon aussi précise que possible la méthode de production utilisée pour obtenir le radionucléide. Celui-ci peut être présent dans la préparation radiopharmaceutique sous différentes formes :

- élément sous forme atomique ou moléculaire ; exemples : [$^{133}$Xe], [$^{15}$O]$O_2$ ;
- sous forme d'ion ; exemples : [$^{131}$I]iodure, [$^{99m}$Tc]pertechnétate ;
- sous forme associée ou liée à une molécule organique, par chélation (exemple : oxine[$^{111}$In]) ou liaison covalente (exemple : 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-glucose).

Il existe en pratique différents procédés permettant de produire des radionucléides qui seront utilisés dans des préparations radiopharmaceutiques ou comme préparations radiopharmaceutiques :

- bombardement neutronique de matières cibles (généralement dans des réacteurs nucléaires),
- bombardement de matières cibles par des particules chargées (dans des accélérateurs tels que cyclotrons),
- fission nucléaire de nucléides lourds de matières cibles (généralement après bombardement par des neutrons ou des particules chargées),
- générateur radionucléidique.

*BOMBARDEMENT PAR DES NEUTRONS OU DES PARTICULES CHARGÉES*

La réaction nucléaire et sa probabilité de survenir par unité de temps dépendent de la nature et des propriétés physiques de la matière cible et de la nature, de l'énergie et de la quantité des particules incidentes.

La transformation nucléaire résultant d'un bombardement particulaire peut être figurée de la façon suivante :

noyau cible (particule incidente, particule ou rayonnement émis) noyau résultant.



Exemples : $^{58}Fe(n,\gamma)^{59}Fe$

$^{18}O(p,n)^{18}F$

Des réactions parasites peuvent s'ajouter à la réaction nucléaire souhaitée. Ces réactions dépendent de l'énergie des particules incidentes et de la pureté de la matière cible. Elles peuvent donner naissance à des impuretés radionucléidiques.

*FISSION NUCLÉAIRE*

Un petit nombre de nucléides ayant un nombre atomique élevé sont fissibles et la réaction la plus fréquemment utilisée est la fission de l'uranium-235 sous l'action de neutrons, dans un réacteur nucléaire. L'iode-131, le molybdène-99 et le xénon-133 peuvent être produits par fission nucléaire de l'uranium-235. Leur extraction, à partir d'un mélange de plus de 200 radionucléides, doit être contrôlée avec soin afin de limiter autant que possible les impuretés radionucléidiques.

*GÉNÉRATEURS RADIONUCLÉIDIQUES*

Les systèmes générateurs de radionucléides utilisent un radionucléide parent à période relativement longue, qui en général décroît en donnant un radionucléide de filiation à période plus courte.

Le radionucléide de filiation est ensuite séparé du radionucléide parent, par un procédé chimique ou physique, ce qui permet de l'utiliser même à une distance importante du site de production du générateur, malgré sa période courte.

*MATIÈRES CIBLES*

La composition isotopique et la pureté de la matière cible déterminent les proportions relatives du radionucléide principal et des impuretés radionucléidiques éventuelles. L'emploi de matières cibles enrichies, dans lesquelles l'abondance du nucléide cible a été artificiellement accrue, permet d'améliorer le rendement de production et la pureté du radionucléide souhaité.

La forme chimique, la pureté et l'état physique de la cible, les additifs chimiques ainsi que les conditions de bombardement et l'environnement direct physique et chimique déterminent l'état chimique et la pureté chimique des radionucléides produits.

En cours de production des radionucléides et particulièrement des radionucléides ayant une vie courte, il n'est pas possible de déterminer les critères de qualité avant de poursuivre la production et la fabrication des préparations radiopharmaceutiques. Par conséquent, chaque lot de matières cibles devra être testé dans un essai de production avant d'être utilisé en routine dans la production du radionucléide considéré et dans la fabrication des préparations radiopharmaceutiques. De cette façon, il sera vérifié que la cible utilisée dans des conditions bien déterminées permet de produire le radionucléide considéré avec les spécifications de qualité et de quantité souhaitées.

Les matières cibles sont contenues dans un récipient sous forme gazeuse, liquide ou solide, pour être irradiées par un faisceau de particules. En cas de bombardement neutronique, l'emploi d'ampoules de quartz ou de récipients en aluminium ou titanium de haute pureté est courant. Il est indispensable de vérifier l'absence de risques d'interaction entre le récipient et son contenu dans les conditions d'irradiation (température, pression, temps).

Pour le bombardement par des particules chargées, on utilise généralement un récipient en aluminium ou autre métal, comportant des orifices d'entrée et de sortie et une enveloppe de refroidissement ainsi que, généralement, une fenêtre cible constituée d'une feuille métallique mince. La nature et l'épaisseur de la fenêtre ont une influence déterminante sur le rendement de la réaction nucléaire, et peuvent également affecter la pureté radionucléidique.

La description du procédé de production doit clairement spécifier les aspects suivants :

- nature de la matière cible,
- configuration du récipient de la matière cible,
- chargement de la matière cible dans le dispositif d'irradiation,
- méthode d'irradiation (de bombardement),
- séparation du radionucléide souhaité,

et en évaluer tous les effets sur l'efficacité de la production, en termes de qualité et de quantité du radionucléide produit.

L'état chimique du radionucléide séparé peut jouer un rôle majeur dans l'ensemble des traitements ultérieurs.

*PRÉCURSEURS DE SYNTHÈSE*

En règle générale, ces précurseurs ne sont pas produits à grande échelle. Certains sont synthétisés par le laboratoire de production radiopharmaceutique, d'autres sont fournis par des fabricants ou laboratoires spécialisés.

Les essais d'identification, la détermination de la pureté chimique et le dosage doivent être effectués selon des procédures validées.

Lorsque des lots de précurseurs sont acceptés sur la base des données figurant dans les certificats d'analyse, il convient d'obtenir les preuves requises pour démontrer la fiabilité et la reproductibilité des analyses effectuées par le fabricant, et il faut réaliser au moins un essai d'identification. Il est recommandé de tester le lot de précurseurs dans des essais préliminaires de production avant de l'utiliser en routine dans la fabrication de préparations radiopharmaceutiques, de façon à vérifier que ce précurseur permet d'obtenir la préparation

radiopharmaceutique concernée avec ses spécifications de quantité et de qualité souhaitées pour autant que les conditions bien déterminées de production aient été respectées.

*CONTRÔLE DU SYSTÈME DE PRODUCTION*

Toutes les opérations, de la préparation de la cible à la distribution de la préparation radiopharmaceutique finale, doivent être décrites de façon claire et documentée, incluant leur impact sur la pureté du produit final et l'efficacité du procédé. Si possible, des contrôles en cours de production sont à effectuer à chaque étape et leurs résultats seront consignés, afin de pouvoir localiser la cause de toute anomalie par rapport à la procédure normale de production.

a) La production des préparations radiopharmaceutiques peut mettre en oeuvre certains processus mécanisés et automatisés utilisés dans l'industrie pharmaceutique, sous réserve de les adapter à la spécificité de la matière première radioactive et aux exigences de la radioprotection.

b) Pour les préparations radiopharmaceutiques incluant des radionucléides à demi-vie courte (comme par exemple certains émetteurs de positons), les systèmes de production sont généralement télécommandés et la radiosynthèse automatisée. Pour les radionucléides à période très courte (moins de 20 min), le contrôle du bon fonctionnement du système de production constitue un moyen important de vérifier la qualité de la préparation radiopharmaceutique avant sa libération.

c) Chaque procédure de production doit être validée par plusieurs essais préliminaires afin de vérifier que, dans des conditions bien déterminées, elle permet d'obtenir la préparation radiopharmaceutique concernée avec ses spécifications de quantité et de qualité souhaitées.

d) La fabrication de la quantité de la préparation à administrer au patient, en médecine nucléaire, met généralement en oeuvre une radioactivité limitée, à partir de préparations radiopharmaceutiques prêtes à l'emploi, de générateurs, de trousses ou de précurseurs radioactifs. Tous les facteurs susceptibles d'affecter la qualité du produit (pureté radiochimique et stérilité, par exemple) doivent être clairement identifiés, et des mesures appropriées de radioprotection doivent être prises.



IDENTIFICATION

**Décroissance radioactive** : la radioactivité décroît en suivant une loi exponentielle. La constante de désintégration est caractéristique pour chaque radionucléide.

La courbe de décroissance exponentielle (courbe de décroissance) est décrite par l'équation :

$$A_t = A_o e^{-\lambda t}$$

$A_t$ = radioactivité au temps $t$,

$A_o$ = radioactivité au temps $t = 0$,

$\lambda$ = constante de désintégration, caractéristique du radionucléide considéré,

e = base des logarithmes népériens.

Il existe entre la période $T_{1/2}$ et la constante de désintégration $\lambda$ une relation de la forme :

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} \qquad (\ln 2 \approx 0,693)$$

Un radionucléide peut être identifié par sa période et/ou par la nature et l'énergie du ou des rayonnements émis, comme prescrit dans la monographie.

**Mesure de la période**. La période est mesurée à l'aide d'un appareil de détection approprié, par exemple une chambre à ionisation, un compteur de Geiger-Müller, un compteur à scintillation (cristal solide, liquide) ou des détecteurs semi-conducteurs. La préparation à examiner est utilisée soit telle quelle, soit diluée, soit desséchée dans une coupelle après dilution appropriée. Dans les conditions expérimentales utilisées, la prise d'essai doit être suffisante pour permettre la détection pendant une durée supérieure à plusieurs fois la période estimée, sans toutefois être trop importante en raison du risque de pertes de comptage liées par exemple au temps mort.

La source radioactive est préparée de façon à éviter toute perte de substance en cours de manipulation. Les sources liquides (solutions) sont placées dans des flacons ou tubes scellés. Les sources solides (résidus de dessiccation contenus dans une coupelle) sont protégées par un film d'acétate de cellulose adhésif ou tout autre matériau.

Plusieurs comptages sont effectués sur la même source dans des conditions de géométrie identiques et à des intervalles de temps correspondant habituellement à une demi-période, pendant une durée totale de l'ordre de 3 périodes environ. Il convient de vérifier le bon fonctionnement de l'appareillage au moyen d'une source de longue période et, si nécessaire (voir Mesure de la radioactivité), une correction sera apportée pour tenir compte des changements du taux de comptage de cette source.

On peut établir ensuite une courbe en portant en abscisse le temps et en ordonnée le logarithme de la réponse de l'instrument (taux de comptage, par exemple). La période calculée ne s'écarte pas de plus de 5 pour cent de la valeur indiquée dans la Pharmacopée, sauf indication contraire.

**Détermination de la nature et de l'énergie du rayonnement**. La nature et l'énergie du rayonnement émis peuvent être déterminées par plusieurs procédés, notamment la construction d'une courbe d'atténuation et la spectrométrie. La méthode de la courbe d'atténuation peut être utilisée pour l'analyse des rayonnements d'électrons. L'identification des rayonnements gamma et des rayonnements X détectables se fait essentiellement par spectrométrie.

La méthode de la *courbe d'atténuation* est utilisée soit pour les émetteurs d'électrons purs, lorsque l'on ne dispose pas de spectromètre pour rayonnements bêta, soit pour les émetteurs bêta/gamma, lorsqu'on ne dispose pas de spectromètre pour rayonnements gamma. Cette méthode, qui repose sur l'estimation de l'énergie maximale du rayonnement bêta, ne donne que des valeurs approximatives. La source, convenablement installée de façon à assurer des conditions de géométrie constantes, est placée face à la fenêtre mince d'un compteur de Geiger-Müller ou d'un compteur proportionnel ; elle est protégée comme indiqué plus haut. On compte le nombre d'impulsions produites par la source, puis on interpose successivement entre celle-ci et le compteur, 6 écrans (au moins) en aluminium, de masse surfacique croissante jusqu'à la valeur seuil au-delà de laquelle, pour un émetteur bêta pur, l'addition d'écrans supplémentaires n'affecte plus le taux de comptage. Les écrans sont disposés de telle sorte que les conditions géométriques restent constantes. On construit alors une courbe en portant en abscisse la masse surfacique des écrans (exprimée en milligrammes par centimètre carré) et en ordonnée le logarithme du taux de comptage en présence de chacun des écrans. Une autre courbe est établie de la même manière avec une préparation étalon. Les coefficients d'atténuation massique sont calculés à partir de la partie médiane des courbes, qui est pratiquement linéaire.

Le *coefficient d'atténuation massique* $\mu_m$, exprimé en centimètres carrés par milligramme, est fonction du spectre de l'énergie du rayonnement bêta ainsi que de la nature et des propriétés physiques de l'écran. Il permet donc d'identifier les émetteurs bêta. Il est calculé à l'aide de l'expression :

$$\mu_m = \frac{\ln A_1 - \ln A_2}{m_2 - m_1}$$

$m_1$ = masse surfacique de l'écran le plus léger,

$m_2$ = masse surfacique de l'écran le plus lourd, $m_1$ et $m_2$ étant compris dans la partie linéaire de la courbe,

$A_1$ = taux de comptage pour la masse surfacique $m_1$,

$A_2$ = taux de comptage pour la masse surfacique $m_2$.

Le coefficient d'atténuation massique $\mu_m$ ainsi calculé ne doit pas s'écarter de plus de 10 pour cent du coefficient obtenu dans des conditions identiques avec une préparation étalon du même radionucléide.

Le parcours maximal des particules bêta est un facteur additionnel qui peut-être utilisé pour la détermination de l'énergie bêta. Il est calculé à partir de la courbe décrite ci-dessus. Il représente la masse par unité de surface correspondant à l'intersection des extrapolations de la partie descendante rectilinéaire de la courbe d'atténuation et de la ligne horizontale du bruit de fond.

Des *compteurs à scintillation liquide* peuvent être utilisés pour établir le spectre de rayonnement des émetteurs $\alpha$ et $\beta^-$ (voir « Mesure de la radioactivité »).

La *spectrométrie gamma* est utilisée pour identifier les radionucléides par l'énergie et l'intensité de leurs rayonnements gamma et X.

Les détecteurs semi-conducteurs au germanium sont ceux utilisés de préférence en spectrométrie gamma et X. Des détecteurs à l'iodure de sodium activé au thallium sont également employés, mais leur résolution en énergie est beaucoup plus faible.

Le système de détection doit être étalonné, car l'efficacité de détection est fonction de l'énergie des rayonnements gamma et X ainsi que de la forme de la source et de la distance source-détecteur. L'efficacité de détection peut être mesurée à l'aide d'une source étalonnée du radionucléide étudié ; il est également possible, pour des travaux d'ordre plus général, d'établir une courbe de l'efficacité en fonction de l'énergie des rayonnements gamma et X, à partir des résultats obtenus avec une série de sources étalonnées de divers radionucléides.

Le spectre de rayonnement d'un radionucléide émettant des rayonnements gamma et X est spécifique de ce radionucléide ; il est caractérisé par l'énergie et le nombre des photons produits lors de transitions d'un niveau d'énergie bien déterminé vers un autre niveau d'énergie du noyau. Cette propriété contribue à l'identification et l'évaluation quantitative des radionucléides présents dans une source. Elle permet l'estimation du degré de pureté radionucléidique grâce à la détection des pics autres que ceux qui sont attendus.

La spectrométrie gamma permet de vérifier la loi de décroissance de la radioactivité, car l'amplitude des pics décroît en fonction de la période. Il est donc possible de détecter la présence dans la source d'une impureté radioactive de période différente, en identifiant le ou les pics caractéristiques dont l'amplitude décroît à une vitesse différente de celle attendue pour le radionucléide considéré. La détermination de la période correspondant aux pics parasites, par des mesures répétées effectuées sur l'échantillon, aide à l'identification de l'impureté.

Le *Tableau des caractéristiques des radionucléides mentionnés dans la Pharmacopée Européenne* (*5.7*) résume les caractéristiques physiques les plus généralement reconnues des radionucléides entrant dans la composition des préparations qui font l'objet de monographies dans la Pharmacopée Européenne. Il indique en outre les caractéristiques physiques des principales impuretés potentielles de ces radionucléides.

L'expression « probabilité d'une transition » désigne la probabilité de transformation, par la transition considérée, d'un noyau se trouvant dans un état énergétique donné. Les termes « intensité » et « abondance » sont utilisés fréquemment au lieu de « probabilité ».

L'expression « probabilité d'émission » désigne la probabilité avec laquelle un atome radioactif peut donner naissance à la particule ou au rayonnement considéré.

Qu'elle soit entendue dans un sens ou dans l'autre, l'intensité est généralement rapportée à 100 désintégrations.

MESURE DE LA RADIOACTIVITÉ

La radioactivité d'une préparation est généralement identifiée à une date et, si nécessaire, à un temps déterminé.

La mesure absolue de la radioactivité d'un échantillon donné est possible si le schéma de désintégration du radionucléide est connu mais, en pratique, l'obtention de résultats exacts exige l'application de nombreuses corrections. C'est pour cela qu'il est plus courant d'effectuer la mesure à l'aide d'une source primaire. Les sources primaires peuvent ne pas être disponibles pour les radionucléides de courte vie, par exemple pour les émetteurs de positons. Les instruments de mesure sont étalonnés en utilisant des étalons appropriés pour les radionucléides concernés. Des étalons sont disponibles auprès des laboratoires agréés par l'Autorité compétente.

Les chambres d'ionisation et les compteurs de Geiger-Müller peuvent être utilisés pour les émetteurs bêta et bêta/gamma, les compteurs à scintillation ou à semi-conducteur et les chambres d'ionisation conviennent pour les émetteurs gamma, et les émetteurs bêta de faible énergie nécessitent l'emploi d'un compteur à scintillation liquide. La détection et la quantification des émetteurs alpha requièrent un équipement spécial et une technique particulière. Il est essentiel, pour permettre la comparaison exacte des sources radioactives, d'opérer dans des conditions de mesure similaires pour les échantillons et les étalons.

Pour le comptage par scintillation liquide des émetteurs bêta de faible énergie, l'échantillon est dissous dans une solution contenant une ou plusieurs (souvent deux) substances organiques fluorescentes (scintillateurs primaire et secondaire), qui convertissent une partie de l'énergie de désintégration en photons lumineux ; ceux-ci sont détectés par un photomultiplicateur et à leur tour convertis en impulsions électriques. Dans le cas des mesures comparatives par scintillation liquide, il convient d'appliquer une correction d'atténuation lumineuse ; les mesures directes doivent être effectuées, si possible, dans des conditions similaires (volumes et types de solutions, par exemple) pour la source à examiner et la source étalon.

Toutes les mesures de radioactivité doivent être corrigées par soustraction du mouvement propre dû à la radioactivité ambiante et aux signaux parasites générés par l'équipement lui-même.

Avec certains appareillages, quand les comptages sont effectués à des niveaux d'activité élevés, il peut être nécessaire d'apporter une correction de perte par coïncidence due au temps mort du détecteur et de l'équipement électronique associé. Dans le cas d'un système de comptage ayant un temps mort $\tau$ après chaque impulsion, cette correction est de la forme :

$$N = \frac{N_{obs}}{1 - N_{obs}\tau}$$

$N$ = taux de comptage réel par seconde,

$N_{obs}$ = taux de comptage observé par seconde,

$\tau$ = temps mort, en secondes.

Avec certains équipements, la correction est automatique. Les corrections de perte par coïncidence doivent être apportées avant la correction du mouvement propre.

Monographies générales

Si le temps de l'opération de mesure $t_m$ n'est pas très court et négligeable, comparé à la période $T_{1/2}$, la désintégration pendant le temps de la mesure doit être prise en compte. Après avoir corrigé les valeurs transmises par l'instrument (taux de comptage, courant d'ionisation, etc.) pour le mouvement propre et, si nécessaire, pour des pertes dues à des effets électroniques, la désintégration durant la période de mesure est :

$$R_{corr} = \frac{R\dfrac{t_m \ln 2}{T_{1/2}}}{1 - \exp\left(-\dfrac{t_m \ln 2}{T_{1/2}}\right)}$$

$R_{corr}$ = valeur transmise par l'instrument, tenant compte de la correction au début de la mesure individuelle,

$R$ = valeur transmise par l'instrument avant la correction pour la décroissance, mais déjà corrigée pour le mouvement propre.

Les résultats des mesures de radioactivité présentent des variations liées principalement au caractère aléatoire de la transformation nucléaire. Il est nécessaire d'enregistrer un nombre suffisant d'impulsions pour compenser les variations du nombre de transformations par unité de temps. L'écart type étant la racine carrée du taux de comptage, 10 000 impulsions au moins sont nécessaires pour obtenir un écart type relatif inférieur ou égal à 1 pour cent (intervalle de confiance : 1 sigma).

Toute indication de radioactivité est accompagnée de l'indication de la date et, si nécessaire, du temps de la mesure, avec mention du fuseau horaire de référence (GMT, CET). La radioactivité à d'autres dates ou temps peut être déterminée graphiquement ou calculée à partir de la loi exponentielle ou de tables.

La radioactivité d'une solution est exprimée par unité de volume, ce qui donne la concentration radioactive.

PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE

Pour établir la pureté radionucléidique d'une préparation radiopharmaceutique, il faut connaître la radioactivité (et donc l'identité) de chaque radionucléide présent. La méthode la mieux adaptée, en général, à l'étude de la pureté radionucléidique est la spectrométrie gamma. Cette méthode n'est toutefois pas absolument fiable : en effet, elle ne permet généralement pas de déceler facilement les impuretés émettrices alpha et bêta et, lorsqu'on utilise un détecteur à l'iodure de sodium, les pics dus aux impuretés émettrices gamma sont souvent masqués par le spectre du radionucléide principal.

Les monographies particulières décrivent la pureté radionucléidique requise (par exemple : le spectre de rayonnement gamma ne diffère pas de manière significative de celui d'une préparation étalon), et prescrivent parfois des limites pour certaines impuretés radionucléidiques spécifiques (par exemple : le cobalt-60 dans le cobalt-57). Ces exigences sont nécessaires, mais ne peuvent apporter à elles seules la garantie qu'une préparation est de pureté radionucléidique suffisante pour pouvoir être employée en médecine humaine. A cet effet, le fabricant doit examiner le produit de manière plus approfondie et, notamment, rechercher des impuretés à longue période dans les préparations de radionucléides à période courte, après un temps de décroissance approprié. Il peut ainsi obtenir des informations sur la qualité des méthodes de fabrication et l'efficacité des contrôles qu'il met en oeuvre. Dans le cas où 2 ou plusieurs radionucléides émetteurs de positons doivent être identifiés et/ou différenciés, comme par exemple des 18F-impuretés dans des préparations 13N, la détermination de la période doit être faite en plus de la spectrométrie gamma.

Comme les radionucléides présents dans une préparation radiopharmaceutique possèdent des périodes différentes, la pureté radionucléidique varie dans le temps. Toutes les exigences concernant la pureté radionucléidique doivent être applicables pendant toute la durée de validité. Parfois il est difficile d'effectuer ces essais avant d'autoriser la libération du lot pour l'emploi lorsque la période du radionucléide dans la préparation est courte. Dans ce cas, l'essai consiste en un contrôle qualité de la production.

PURETÉ RADIOCHIMIQUE

La pureté radiochimique est déterminée par séparation des différentes substances chimiques contenant le radionucléide considéré, puis estimation de la radioactivité associée à la substance chimique déclarée. Les impuretés radiochimiques peuvent avoir différentes origines :

– production du radionucléide,
– traitements chimiques ultérieurs,
– séparation préparative incomplète,
– altérations chimiques en cours de conservation.

Toute indication de radioactivité spécifique doit être applicable pendant toute la durée de validité.

En principe, la détermination de la pureté radiochimique peut être réalisée par toute méthode de séparation analytique. Les monographies de préparations radiopharmaceutiques peuvent par exemple utiliser des techniques de chromatographie sur papier (*2.2.26*), chromatographie sur couche mince (*2.2.27*), électrophorèse (*2.2.31*), chromatographie d'exclusion (*2.2.30*), chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*), chromatographie liquide (*2.2.29*). Les procédures analytiques à mettre en oeuvre sont décrites dans les monographies. Certaines précautions spécifiques de radioprotection sont en outre à prendre en considération.

Dans un environnement hospitalier, la chromatographie sur couche mince et la chromatographie sur papier sont utilisées le plus souvent. Pour la chromatographie sur papier et la chromatographie sur couche mince, le volume de prise d'essai spécifié dans la monographie est déposé sur la ligne de dépôt, comme prescrit dans les méthodes générales. Il est préférable de ne pas diluer la préparation à examiner, mais il faut également éviter de déposer des quantités trop importantes de radioactivité sous peine de pertes de comptage (par coïncidence) lors de la mesure de la radioactivité. Compte tenu des très faibles masses de substances radioactives déposées, il est admis d'ajouter un entraîneur si la monographie le spécifie. Après développement et séchage du support, on détermine la position des surfaces radioactives soit par autoradiographie soit par mesure de la radioactivité sur toute la longueur du chromatogramme au moyen de compteurs à collimateur appropriés ou en découpant le chromatogramme en bandelettes et en effectuant un comptage sur chacune d'elles. La position des taches ou des bandes permet leur identification chimique par comparaison à des solutions des mêmes substances chimiques (non radioactives) révélées par une méthode de détection appropriée.

La radioactivité peut être mesurée par intégration à l'aide d'un enregistreur automatique ou d'un compteur numérique. Le rapport des surfaces sous les pics donne le rapport des concentrations radioactives des substances chimiques. Lorsque les chromatogrammes sont découpés, ce sont les rapports des radioactivités respectivement mesurées qui donnent le rapport des concentrations des substances chimiques radioactives.

RADIOACTIVITÉ SPÉCIFIQUE

La radioactivité spécifique est généralement calculée à partir de la concentration radioactive (radioactivité volumique) et de la concentration chimique de la substance étudiée, après avoir vérifié que la radioactivité est attribuable au seul radionucléide considéré (pureté radionucléidique) et à la seule espèce chimique considérée (pureté radiochimique).

La radioactivité spécifique varie dans le temps. Toute indication de radioactivité spécifique est accompagnée d'une indication de date et de temps, et doit être applicable pendant toute la durée de validité.

PURETÉ CHIMIQUE

La pureté chimique est déterminée par quantification des impuretés chimiques spécifiées dans la monographie.

PURETÉ ÉNANTIOMÉRIQUE

Dans certains cas, la pureté stéréoisomérique est à vérifier.

DISTRIBUTION PHYSIOLOGIQUE

Un essai de distribution physiologique est prescrit, si nécessaire, dans le cas de certaines préparations radiopharmaceutiques. L'observation, chez une espèce animale appropriée (généralement le rat ou la souris), du profil de distribution de la radioactivité dans des organes, tissus ou compartiments physiologiques spécifiés peut fournir une indication fiable sur la distribution prévisible chez l'homme, et par conséquent l'adéquation de la substance à l'usage prévu.

La description détaillée du mode opératoire et les exigences relatives à la distribution physiologique figurent dans la monographie spécifique de la préparation radiopharmaceutique.

Une distribution physiologique chez l'animal conforme aux spécifications exigées permet d'estimer que la distribution du composé radioactif aux cibles biologiques chez l'homme sera adéquate et que la distribution aux autres organes et tissus sera limitée.

En règle générale, l'essai est effectué comme suit.

La préparation à examiner est injectée à trois animaux par voie intraveineuse. Le cas échéant, la monographie spécifie l'espèce, le sexe, la souche et la masse corporelle ou l'âge des animaux. La solution injectée est la préparation radiopharmaceutique destinée à l'usage humain. Le cas échéant, les produits sont préalablement reconstitués suivant les instructions du fabricant. Dans certains cas, il peut être nécessaire de procéder à une dilution immédiatement avant l'injection.

L'administration se fait généralement par voie intraveineuse, dans les veines caudales. D'autres veines telles que les veines saphène, fémorale, jugulaire ou pénienne peuvent également être utilisées dans des cas spéciaux. Les animaux présentant des signes d'extravasation de la solution (observés au moment de l'injection ou au cours des mesures ultérieures de radioactivité tissulaire) sont éliminés de l'essai.

Immédiatement après l'injection, chaque animal est placé dans une cage séparée permettant de recueillir les excréments et d'éviter toute contamination de la surface corporelle de l'animal.

Après un intervalle de temps spécifié à compter de l'injection, les animaux sont euthanasiés par une méthode appropriée, puis disséqués. Un dosage de radioactivité est effectué sur les organes et tissus concernés, au moyen d'un instrument approprié comme décrit par ailleurs dans la présente monographie. La distribution physiologique est alors calculée, l'activité mesurée dans chacun des organes ou tissus prélevés étant exprimée en termes de pourcentage. A cet effet, la radioactivité dans un organe peut être rapportée à l'activité injectée, calculée à partir de la radioactivité mesurée dans la seringue avant et après l'injection. Pour certaines préparations radiopharmaceutiques, il peut être intéressant de déterminer le rapport radioactivité/masse en effectuant une pesée des échantillons de tissus prélevés.

Une préparation satisfait à l'essai si la distribution de radioactivité observée chez au moins deux des trois animaux répond à tous les critères spécifiés.

STÉRILITÉ

Les préparations radiopharmaceutiques pour administration parentérale doivent être préparées dans des conditions visant à exclure toute contamination microbienne et à garantir leur stérilité. L'essai de stérilité est effectué comme décrit dans la méthode générale (*2.6.1*). Sa réalisation présente des difficultés particulières dans le cas des préparations radiopharmaceutiques, du fait de la courte période de certains radionucléides, de la taille réduite des lots et des risques d'irradiation. Il n'est pas toujours possible d'attendre le résultat de l'essai de stérilité pour autoriser la libération du lot en question. Dans ces cas, la libération paramétrique (*5.1.1*) d'un produit fabriqué par un procédé entièrement validé est la méthode de préférence. L'essai de stérilité doit être effectué en tant que contrôle qualité supplémentaire de la production en cas de production aseptique.

Si la taille d'un lot d'une préparation radiopharmaceutique est limitée à un seul ou à une petite quantité d'échantillons (par exemple des préparations radiopharmaceutiques thérapeutiques ou de très courte durée de vie), l'échantillonnage du lot pour l'essai de stérilité ne peut pas être appliqué. Si la préparation radiopharmaceutique a été stérilisée par filtration et/ou produite par un procédé aseptique (*5.1.1*), la validation du procédé est essentielle.

Si la demi-vie du radionucléide est très courte (par exemple inférieure à 20 min), l'administration de la préparation au patient s'effectue généralement « en-ligne » avec un système de production validé.

Pour des raisons de sécurité (niveau élevé de radioactivité), il n'est pas possible d'utiliser pour les préparations radiopharmaceutiques les prises d'essai spécifiées dans l'essai de stérilité (*2.6.1*). La filtration sur membrane est la méthode à utiliser de préférence, afin de réduire les risques d'irradiation de l'opérateur.

Nonobstant les prescriptions relatives à l'emploi des agents antimicrobiens de la monographie *Préparations parentérales (0520)*, l'addition de tels agents aux préparations radiopharmaceutiques conditionnées en récipients multidoses n'est pas obligatoire, sauf prescription explicite dans la monographie particulière.

ENDOTOXINES BACTÉRIENNES ET PYROGÈNES

Un essai des endotoxines bactériennes est prescrit pour certaines préparations radiopharmaceutiques. L'essai est effectué comme décrit dans la méthode générale (*2.6.14*), en prenant les précautions nécessaires pour réduire les risques d'irradiation de l'opérateur.

La concentration limite en endotoxines bactériennes est spécifiée dans la monographie.

Lorsque la préparation radiopharmaceutique est source d'interférence, par inhibition ou activation, et qu'il n'est pas possible d'éliminer le(s) facteur(s) d'interférence, le recours à l'essai des pyrogènes (*2.6.8*) peut être spécifiquement prescrit.

La réalisation de ces essais avant autorisation de libération du lot est parfois difficile lorsque la période du radioélément contenu dans la préparation est brève. L'essai constitue alors un contrôle qualité de la production.

CONSERVATION

En récipient étanche bénéficiant d'une protection suffisante pour éviter l'irradiation du personnel par les rayonnements primaires ou secondaires et satisfaisant aux règlements nationaux et internationaux régissant le stockage des substances radioactives. Au cours de la conservation, les récipients peuvent brunir sous l'effet du rayonnement. Ce brunissement ne traduit pas nécessairement une altération de la préparation.

Les préparations radiopharmaceutiques ont une durée de validité courte, et la date de péremption doit être clairement indiquée.

ÉTIQUETAGE

L'étiquetage des préparations radiopharmaceutiques est conforme aux réglementations nationales et européennes régissant la matière.

L'étiquette du récipient primaire indique :

- le nom ou la référence de la préparation,
- le nom du fabricant,
- un numéro d'identification,
- pour les préparations liquides et gazeuses : la radioactivité totale contenue dans le récipient ou la concentration radioactive par millilitre à la date et (si nécessaire) au temps indiqué, ainsi que le volume de liquide contenu dans le récipient,

– pour les préparations solides (par exemple cryodesséchées) : la radioactivité totale à la date et (si nécessaire) au temps indiqué. La préparation est considérée liquide après la reconstitution avec une solution appropriée,
– pour les capsules : la radioactivité par capsule à la date et (si nécessaire) au temps indiqué, ainsi que le nombre de capsules contenues dans le récipient.

L'étiquetage peut être adapté dans certains cas (par exemple : préparations radiopharmaceutiques contenant des radionucléides de courte durée de vie).

L'étiquette de l'emballage externe indique en outre :
– la voie d'administration,
– la durée de validité ou la date de péremption,
– le nom et la concentration de tout conservateur antimicrobien ajouté,
– le cas échéant, les conditions de conservation particulières.

**01/2010:1063**

# PRODUITS ALLERGÈNES

## Producta allergenica

*La présente monographie ne s'applique pas aux substances chimiques exclusivement utilisées pour le diagnostic des dermatites de contact, aux produits obtenus par synthèse chimique, aux allergènes obtenus par la méthode dite de l'ADN recombinant ; elle ne s'applique pas nécessairement aux produits allergènes à usage vétérinaire.*



### DÉFINITION

Les produits allergènes sont des préparations pharmaceutiques obtenues à partir d'extraits de matières premières d'origine naturelle contenant des allergènes, c'est à dire des substances qui entraînent et/ou provoquent des réactions allergiques. Les composants allergènes sont le plus souvent de nature protéique. Les produits allergènes sont destinés soit au diagnostic *in vivo* soit au traitement des maladies allergiques attribuées à ces allergènes.

Les produits allergènes sont disponibles sous forme de produits finis et de produits finis à usage nominal. Ils sont généralement présentés sous la forme de préparations parentérales, de préparations ophtalmiques, de préparations pour inhalation, de préparations orales, de préparations sublinguales ou de préparations pour épreuves cutanées.

Les produits destinés au *diagnostic in vivo* sont habituellement, pour les épreuves cutanées, des extraits non modifiés dans une solution de glycérol à 50 pour cent *V/V*. Pour les épreuves intradermiques ou les épreuves de provocation par administration nasale, oculaire ou bronchique, des dilutions appropriées peuvent être préparées à partir d'extraits aqueux ou glycérinés, ou par reconstitution d'extraits non modifiés lyophilisés.

Les produits destinés à une *immunothérapie spécifique* peuvent être des extraits non modifiés ou des extraits modifiés par voie chimique et/ou par adsorption sur différents vecteurs (par exemple l'hydroxyde d'aluminium, le phosphate de calcium ou la tyrosine).

### PRODUCTION

#### *MATIÈRES PREMIÈRES*

Les matières premières utilisées pour la préparation de produits allergènes sont des matières d'origine animale ou végétale, principalement des pollens, des moisissures, des acariens, des fragments d'épithélium, phanères (poils, plumes par exemple) et/ou squames d'animaux, des venins d'hyménoptères, des insectes et certains aliments.

Lorsque la fabrication de produits allergènes fait intervenir des matières d'origine humaine ou animale, les exigences du chapitre *5.1.7. Sécurité virale* s'appliquent.

Les matières premières sont définies par leur origine, leur nature, la méthode de récolte ou de production utilisée et le prétraitement appliqué. Des méthodes de contrôle et des critères d'acceptation portant sur leur identité et leur pureté sont établis. Les critères d'acceptation appliqués doivent assurer la reproductibilité, tant du point de vue qualitatif que quantitatif, de la matière première allergène. Les matières premières sont conservées et transportées dans des conditions contrôlées, justifiées par des données de stabilité.

La récolte ou la production, ainsi que les traitements appliqués aux matières premières, sont conduits de façon à garantir, autant que possible, leur uniformité d'un lot à l'autre.

Les teneurs en solvants résiduels, métaux lourds et pesticides susceptibles d'être présents sont déterminées sur un certain nombre de lots, selon un plan d'échantillonnage justifié. Les solvants résiduels et les pesticides sont respectivement limités selon les principes définis dans les chapitres généraux *2.4.24. Identification et contrôle des solvants résiduels* et *2.8.13. Résidus de pesticides*.

**Pollens**. La teneur en contaminants chimiques potentiels tels que pesticides, métaux lourds et solvants doit être aussi réduite que possible. La teneur en pollens étrangers, déterminée par comptage au microscope, doit être limitée à 1 pour cent pour la totalité des pollens et à 0,5 pour cent pour un même morphotype. La teneur en spores de moisissures détectables ne doit pas dépasser 1 pour cent. La contamination par des particules d'origine végétale autres que des pollens doit être aussi réduite que possible. La limite maximale de contamination admise doit être justifiée.

**Moisissures**. La présence de contaminants biologiquement actifs tels que les mycotoxines des moisissures doit être aussi réduite que possible et toute présence justifiée. Des mesures appropriées doivent être mises en oeuvre pour éviter la contamination par des espèces étrangères. Des précautions doivent être prises pour limiter la présence de constituants allergènes dans les milieux de culture des moisissures utilisées comme matières premières. L'emploi de milieux contenant des substances d'origine animale ou humaine doit être justifié et, si nécessaire, les milieux doivent faire l'objet d'un traitement approprié permettant d'inactiver ou d'éliminer d'éventuels agents pathogènes transmissibles.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que les produits allergènes obtenus à partir de moisissures et destinés à l'administration parentérale satisferaient à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il leur était appliqué.

**Acariens**. Des mesures appropriées doivent être mises en oeuvre pour éviter la contamination par des espèces étrangères. Des précautions doivent être prises pour limiter la présence de constituants allergènes dans les milieux de culture des acariens utilisés comme matières premières. L'emploi de milieux contenant des substances d'origine animale ou humaine doit être justifié et, si nécessaire, les milieux doivent faire l'objet d'un traitement approprié permettant d'inactiver ou d'éliminer d'éventuels agents pathogènes transmissibles.

**Fragments d'épithélium, phanères et/ou squames d'animaux**. Ils doivent être obtenus à partir d'animaux sains, sélectionnés afin d'éviter le risque de transmission d'agents pathogènes.

**Venins d'hyménoptères**. L'espèce d'hyménoptère dont est extrait le venin est identifiée et spécifiée. Les méthodes de collecte des insectes et d'extraction du venin sont décrites et doivent assurer l'obtention d'une matière première de qualité appropriée.

**Aliments**. La dénomination scientifique de l'espèce animale ou végétale (espèce, variété, souche, etc.) est indiquée ainsi que, dans les cas appropriés, la partie utilisée. Les aliments doivent être de qualité appropriée à la consommation humaine. Leur origine et leur stade de transformation sont indiqués.

*PROCÉDÉ DE PRODUCTION*

Les produits allergènes sont généralement obtenus par extraction à partir des matières premières, et éventuellement purification, au moyen de méthodes appropriées dont il a été établi qu'elles préservent les propriétés allergéniques des composants. Dans le cas des allergènes pour lesquels le nombre de patients disponibles est insuffisant pour permettre de déterminer l'activité biologique *in vivo* ou *in vitro*, l'exigence minimale est le rapport d'extraction, qui indique la proportion relative (*m/V*) des matières premières allergènes et des solvants. Les produits allergènes présentés sous forme de préparations parentérales, de préparations ophtalmiques, de préparations pour inhalation et de préparations pour épreuves cutanées sont fabriqués dans des conditions aseptiques.

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des produits allergènes destinés à d'autres voies d'administration, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le chapitre *5.1.4. Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles*.

Toutes les préparations allergènes sont produites dans des conditions visant à limiter la dégradation enzymatique, qu'elle soit exogène ou endogène.

La purification éventuelle est destinée à réduire la teneur en composants irritants potentiels de faible masse moléculaire et en composants non allergènes.

Les produits allergènes peuvent contenir des conservateurs antimicrobiens appropriés, dont la nature et la concentration doivent être justifiées.

Le procédé de production comprend différentes étapes :

– matière première,
– substance active : il s'agit en général d'un extrait allergène modifié ou non modifié, dans les cas appropriés conservé dans des conditions assurant sa stabilité, par exemple sous forme lyophilisée,
– produit fini.

Toutes les autres étapes du procédé de production sont considérées comme intermédiaires.

*PRÉPARATION DE RÉFÉRENCE INTERNE*

Une préparation représentative appropriée est sélectionnée comme préparation de référence interne (PRI), caractérisée et utilisée pour vérifier la reproductibilité de la production d'un lot à l'autre. La PRI est conservée en quantités unitaires appropriées dans des conditions assurant sa stabilité, par exemple sous forme lyophilisée.

**Caractérisation de la préparation de référence interne**. *Le niveau de caractérisation des PRI dépend de la matière première, du niveau de connaissance des composants allergènes et de la disponibilité de réactifs adéquats, ainsi que de l'utilisation prévue. La PRI caractérisée est utilisée comme référence pour le contrôle des lots de substances actives et d'intermédiaires ainsi que, si possible, pour le contrôle des lots de produits finis.*

La PRI est caractérisée par sa teneur en protéines et son profil protéique, déterminés par des méthodes appropriées (telles que la focalisation isoélectrique, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium, l'immunoélectrophorèse, l'électrophorèse capillaire, des techniques chromatographiques et la spectrométrie de masse).

Les composants allergènes peuvent être détectés par des méthodes appropriées (par exemple l'immunotransfert ou la radio-immunoélectrophorèse croisée). Leur caractérisation peut comprendre l'identification des allergènes pertinents par des techniques sérologiques ou autres, au moyen de sérums (individuels ou en mélange) de patients allergiques ou d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques.

Une détermination des teneurs en allergènes pertinents est effectuée chaque fois que possible. Le choix des composants allergènes pertinents à déterminer doit être justifié. Chaque allergène est si possible identifié et désigné selon la nomenclature internationale reconnue.

L'activité biologique de la première PRI est déterminée sur des patients par des techniques *in vivo* telles que les réactions cutanées et exprimée en unités d'activité biologique, sauf lorsque le nombre de patients disponible est insuffisant, auquel cas l'activité biologique de la première PRI est déterminée par une méthode *in vitro*. Par la suite, il est possible d'établir l'activité biologique des PRI suivantes par des méthodes *in vitro*, par comparaison aux résultats obtenus avec la première PRI. La mesure de l'activité *in vitro* peut être effectuée par un immunodosage approprié (par exemple un dosage fondé sur l'inhibition de la capacité de fixation des anticorps immunoglobulines E spécifiques).

IDENTIFICATION

Les essais d'identification sont effectués à une étape aussi tardive que possible du procédé de production. Dans le cas de produits à usage nominal, le contrôle est effectué sur la substance active et/ou à l'étape intermédiaire entre la substance active et le produit fini.

L'identité est confirmée par comparaison avec le profil protéique de la PRI, établi au moyen de méthodes appropriées (par exemple la focalisation isoélectrique, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium, l'immunoélectrophorèse, l'immunotransfert, la chromatographie liquide ou la spectrométrie de masse).

Exceptionnellement, si l'on ne dispose pas d'une PRI, il est admis d'utiliser un lot représentatif du produit pour confirmer l'identité.

ESSAI

Les essais sont effectués à une étape aussi tardive que possible du procédé de production. Dans le cas de produits à usage nominal, le contrôle est effectué sur la substance active et/ou à l'étape intermédiaire entre la substance active et le produit fini.

Divers essais biochimiques et immunologiques ont été développés pour la caractérisation qualitative et quantitative des allergènes. Si, dans certains cas, ces méthodes ne peuvent pas être appliquées, notamment pour la détermination de l'activité allergénique et du profil allergénique et/ou protéique, il convient d'en apporter la justification.

**Eau** (*2.5.12* ou *2.5.32*) : au maximum 5 pour cent pour les produits lyophilisés.

Pour les lyophilisats oraux, une teneur en eau supérieure à 5 pour cent peut être admise dans des cas justifiés et autorisés.

**Stérilité** (*2.6.1*). Les produits allergènes présentés sous la forme de préparations parentérales, de préparations ophtalmiques, de préparations pour inhalation ou de préparations pour épreuves cutanées satisfont à l'essai de stérilité.

**Contamination microbienne**. Pour les produits allergènes non obligatoirement stériles, des recommandations sont fournies dans le chapitre *5.1.4. Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles*.

**Teneur en protéines** (*2.5.33*) : 80 pour cent à 120 pour cent de la valeur déclarée, sauf exception justifiée et autorisée. Si l'activité biologique peut être déterminée, l'essai de teneur en protéines est effectué comme contrôle de la reproductibilité de lot à lot et la teneur en protéines est comprise entre 50 pour cent et 150 pour cent de la valeur déclarée.

**Profil protéique**. Le profil protéique, déterminé par des méthodes appropriées, correspond à celui de la PRI. La présence des composants allergènes pertinents est si possible vérifiée. Le choix des composants allergènes pertinents à rechercher doit être justifié.

*Selon le produit allergène considéré, divers essais complémentaires, dont certains présentant une sélectivité accrue, peuvent être effectués. Pour les produits allergènes à usage thérapeutique, toutefois, un essai validé permettant de mesurer l'activité (activité allergénique totale, détermination d'allergènes individuels ou tout autre essai justifié) doit dans tous les cas être mis en oeuvre.*

**Aluminium** (*2.5.13*) : pour les produits allergènes adsorbés sur de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium, 80 pour cent à 120 pour cent de la teneur déclarée, avec dans tous les cas un maximum de 1,25 mg par dose humaine sauf exception justifiée et autorisée.

**Calcium** (*2.5.14*) : pour les produits allergènes adsorbés sur du phosphate de calcium, 80 pour cent à 120 pour cent de la teneur déclarée.

**Profil allergénique**. Les composants allergènes pertinents sont identifiés par des techniques appropriées au moyen d'anticorps d'origine humaine ou animale spécifiques de ces allergènes.

**Activité allergénique totale** : 50 pour cent à 150 pour cent de la valeur déclarée, déterminé par inhibition de la capacité de fixation des anticorps immunoglobulines E spécifiques ou par une méthode *in vitro* équivalente appropriée.

**Allergènes individuels** : pour chacun des composants allergènes pertinents, 50 pour cent à 200 pour cent de la valeur déclarée, déterminé par une méthode appropriée.

CONSERVATION

Sauf exception justifiée et autorisée, les produits allergènes adsorbés ne doivent pas être congelés.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- le nom du produit allergène,
- l'activité biologique et/ou la teneur en protéines et/ou le rapport d'extraction,
- la voie d'administration et l'utilisation prévue,
- les conditions de conservation,
- dans les cas appropriés, le nom et la concentration du conservateur antimicrobien ajouté,
- dans les cas appropriés, pour les préparations lyophilisées :
  - le nom, la composition et le volume de liquide à ajouter pour la reconstitution,
  - la durée de validité après reconstitution,
- dans les cas appropriés, que la préparation est stérile,
- dans les cas appropriés, le nom et la concentration de l'adsorbant utilisé.

**01/2008:1483**

## PRODUITS COMPORTANT UN RISQUE DE TRANSMISSION D'AGENTS D'ENCÉPHALOPATHIES SPONGIFORMES ANIMALES

### Producta cum possibili transmissione vectorium enkephalopathiarum spongiformium animalium

DÉFINITION

Les produits comportant un risque de transmission d'agents d'encéphalopathies spongiformes animales sont issus de tissus ou de sécrétions d'animaux réceptifs aux encéphalopathies spongiformes transmissibles autrement que par épreuve expérimentale. Cette monographie s'applique à toutes les substances ou préparations obtenues à partir de ces animaux ainsi qu'à toutes les substances ou préparations pour lesquelles des produits obtenus à partir de ces animaux sont utilisés en tant que substances actives ou excipients ou sont utilisés au cours de la production, par exemple comme produits de départ, matières premières ou réactifs.

PRODUCTION

La production est conforme au chapitre *5.2.8. Réduction du risque de transmission des agents des encéphalopathies spongiformes animales par les médicaments à usage humain et vétérinaire.*

**01/2008:1468**

## PRODUITS DE FERMENTATION

### Producta ab fermentatione

*La présente monographie s'applique aux produits indirects de l'expression génétique obtenus par fermentation. Elle ne s'applique pas :*

- *aux monographies de la Pharmacopée relatives aux vaccins à usage humain ou vétérinaire ;*
- *aux produits obtenus au moyen de lignées cellulaires continues d'origine humaine ou animale ;*
- *aux produits directs de l'expression génétique résultant de la transcription et de la traduction des acides nucléiques en protéines, avec ou sans modification post-traductionnelle ;*
- *aux produits obtenus par hémisynthèse à partir d'un produit de fermentation et aux produits obtenus par transformation biocatalytique ;*
- *aux milieux concentrés entiers ou aux produits bruts de fermentation.*

*Cette monographie donne des spécifications générales traitant du développement et de la fabrication des produits de fermentation. Ces spécifications ne sont pas nécessairement complètes pour un cas donné et des spécifications complémentaires ou supplémentaires peuvent être imposées dans une monographie ou par l'Autorité compétente.*

DÉFINITION

Dans le cadre de la présente monographie, les produits de fermentation sont définis comme des substances pharmaceutiques, actives ou inactives, obtenues par fermentation contrôlée en tant que produits indirects de l'expression génétique. Ce sont des métabolites primaires ou secondaires de microorganismes tels que des bactéries, des levures, des moisissures ou des algues unicellulaires, modifiés ou non par des techniques traditionnelles ou par la méthode dite de l'ADN recombinant (ADNr). Ces métabolites comprennent des vitamines, des acides aminés, des antibiotiques, des alcaloïdes et des polyosides.

Ils peuvent être obtenus par différents processus de fermentation (par lot ou continue) suivis de diverses étapes de traitement (extraction, concentration, purification, isolation).

PRODUCTION

La production est effectuée par un procédé qui a été validé et s'est avéré approprié. Le degré de validation requis est fonction du caractère plus ou moins critique de l'étape de production considérée.

CARACTÉRISATION DU MICROORGANISME PRODUCTEUR

L'historique du microorganisme utilisé pour la production est documenté. Le microorganisme fait l'objet d'une caractérisation adéquate. Cette caractérisation peut inclure la détermination du phénotype, la mise en oeuvre de méthodes macroscopiques

et microscopiques et d'essais biochimiques ainsi que, dans les cas appropriés, la détermination du génotype et des essais de génétique moléculaire.

PROCESSUS UTILISANT UN SYSTÈME DE LOT DE SEMENCE

La *banque de cellules primaires* est une suspension homogène ou un lyophilisat des cellules originelles, réparti dans des récipients individuels aux fins de conservation. La viabilité et la productivité des cellules dans les conditions de conservation choisies et leur aptitude à assurer un processus de production satisfaisant après conservation doivent être démontrées.

La multiplication de la banque de cellules primaires peut être réalisée au moyen d'un système de lot de semence utilisant une banque de cellules de travail.

La *banque de cellules de travail* est une suspension homogène ou un lyophilisat du matériel cellulaire issu de la banque de cellules primaires, réparti en quantités égales dans des récipients individuels aux fins de conservation (par exemple dans l'azote liquide).

La production peut être effectuée par lot ou en culture continue et est arrêtée dans des conditions fixées.

Tous les récipients d'une banque de cellules sont conservés dans des conditions identiques. Une fois retirés de leur lieu de conservation, les récipients individuels (ampoules, flacons ou pailles) ne sont pas réintroduits dans la banque de cellules.

PROCESSUS UTILISANT LA CROISSANCE PAR ÉTAPES EN CULTURES

Le contenu d'un des récipients constituant la banque de cellules de travail est utilisé, si nécessaire après remise en suspension, pour préparer un inoculum dans un milieu approprié. Après une période de croissance appropriée, les cultures sont utilisées pour lancer le processus de fermentation, si nécessaire après pré-culture dans un pré-fermenteur. Les conditions à appliquer à chaque étape du processus sont définies et doivent être réalisées lors de chaque cycle de production.

CONTRÔLE DES MODIFICATIONS

Si le processus de production fait l'objet d'une modification entraînant un changement significatif du profil d'impuretés du produit, les étapes critiques associées à ce changement du profil d'impuretés font l'objet d'une revalidation.

Si le microorganisme utilisé pour la production subit une modification entraînant un changement significatif du profil d'impuretés du produit, les étapes critiques du processus de production associées à ce changement, notamment les procédures de purification et d'isolation, font l'objet d'une revalidation.

La revalidation doit notamment permettre de démontrer que les nouvelles impuretés présentes dans le produit, du fait de la modification effectuée, sont adéquatement contrôlées par les procédures d'essai mises en oeuvre. Des essais complémentaires ou alternatifs sont, si nécessaire, introduits avec des limites appropriées. Si la modification apportée au processus se traduit par une augmentation de la concentration d'une impureté, l'acceptabilité de cette augmentation est établie.

Lorsqu'une banque de cellules primaires est remplacée, les étapes critiques du processus de production doivent faire l'objet d'une revalidation permettant de démontrer que la qualité et l'innocuité du produit n'en sont pas affectées. Une attention particulière doit être portée aux éventuelles modifications du profil d'impuretés du produit dans le cas où un microorganisme nouveau, ou modifié, est introduit dans le processus.

MATIÈRES PREMIÈRES

Les matières premières utilisées pour la fermentation et/ou les traitements ultérieurs sont de qualité appropriée à l'usage auquel elles sont destinées. Elles font l'objet de contrôles visant à vérifier qu'elles satisfont à des spécifications écrites.

Le taux de contamination des milieux et de l'air utilisé pour l'aération doit être suffisamment faible pour garantir que, en cas de contamination microbienne, celle-ci n'affectera pas la qualité, la pureté et l'innocuité du produit. L'addition en cours de fermentation de composants tels que des éléments nutritifs, des précurseurs et des substrats est réalisée dans des conditions aseptiques.

CONTRÔLES EN COURS DE PRODUCTION

Des contrôles en cours de production sont effectués pour vérifier la stabilité des conditions dans lesquelles sont réalisés la fermentation et les traitements ultérieurs, ainsi que la qualité du produit isolé. Il y a lieu, en particulier, de vérifier que toute contamination microbienne affectant la qualité, la pureté et l'innocuité du produit sera détectée par les contrôles effectués.

Les conditions de production peuvent être surveillées par des contrôles et mesures appropriés portant par exemple, selon le cas, sur :

– la température,
– le pH,
– le taux d'aération,
– le taux d'agitation,
– la pression,

et par le suivi de la concentration du métabolite recherché.

TRAITEMENTS POST-FERMENTATION

En fin de fermentation, le microorganisme producteur est inactivé ou éliminé. D'autres traitements sont appliqués pour réduire à un niveau acceptable les résidus issus du milieu de culture et assurer l'obtention d'un produit de qualité constante.

Différents procédés de purification peuvent être employés, par exemple, le traitement au charbon actif, l'ultrafiltration, l'extraction par solvant. Il doit être démontré que le ou les procédés choisis permettent de réduire au minimum ou d'éliminer :

– les résidus des microorganismes producteurs, milieux de culture, substrats et précurseurs,
– les produits de transformation indésirables des substrats et précurseurs.

Si nécessaire, des essais appropriés sont effectués, soit comme contrôles en cours de production, soit sur le produit de fermentation isolé.

IDENTIFICATION, ESSAI ET DOSAGE

Les exigences auxquelles le produit doit satisfaire pendant toute sa durée de validité, ainsi que les méthodes d'essai spécifiques s'y rattachant, sont spécifiées dans les monographies particulières.

**07/2009:2034**

# SUBSTANCES POUR USAGE PHARMACEUTIQUE

## Corpora ad usum pharmaceuticum

DÉFINITION

Les substances pour usage pharmaceutique sont des substances organiques ou inorganiques, quelles qu'elles soient, utilisées en tant que substances actives ou excipients pour la production de médicaments pour usage humain ou vétérinaire. Elles peuvent être obtenues à partir de sources naturelles ou produites par extraction à partir de matières premières, par fermentation ou par synthèse.

Cette monographie générale ne s'applique ni aux drogues végétales, ni aux drogues végétales pour préparations homéopathiques, ni aux préparations à base de drogues végétales, ni aux extraits, ni aux teintures mères pour préparations homéopathiques, qui font l'objet de monographies générales distinctes (*Drogues végétales (1433)*, *Drogues*

*végétales pour préparations homoéopathiques (2045), Préparations à base de drogues végétales (1434), Extraits (0765), Teintures mères pour préparations homéopathiques (2029)*). Elle ne s'applique pas aux matières premières pour préparations homéopathiques, sauf lorsqu'il existe une monographie spécifique sur la substance dans la partie non homéopathique de la Pharmacopée.

Lorsqu'une substance pour usage pharmaceutique qui ne fait pas l'objet d'une monographie spécifique de la Pharmacopée est incorporée dans un médicament préparé pour les besoins spécifiques d'un malade déterminé, la nécessité de conformité à la présente monographie générale est décidée à la lumière d'une évaluation du risque qui prend en compte la qualité disponible et l'usage auquel le médicament est destiné.

Lorsque la fabrication de médicaments fait intervenir des substances pour usage pharmaceutique d'origine humaine ou animale, les exigences du chapitre *5.1.7. Sécurité virale* s'appliquent.

Les substances pour usage pharmaceutique peuvent être utilisées soit en l'état soit comme matières premières dans le cadre d'une formulation pour la préparation de médicaments. Selon la formulation, certaines substances peuvent être utilisées soit comme substances actives soit comme excipients. Les substances solides peuvent faire l'objet de traitements tels que le compactage, l'enrobage, la granulation, la réduction en poudre de finesse donnée, ou autres. Une monographie s'applique à une substance traitée avec ajout d'excipients seulement si ce traitement est mentionné dans la section Définition de cette monographie.

Monographies générales

*Qualités spéciales d'une substance pour usage pharmaceutique*. Sauf mention contraire ou restriction explicite dans les monographies, toute substance pour usage pharmaceutique est destinée à être utilisée chez l'homme et l'animal et est de qualité appropriée à la fabrication de toutes les formes pharmaceutiques dans lesquelles elle peut être utilisée.

*Polymorphisme*. En règle générale, les monographies spécifiques ne traitent pas de formes cristallines ou amorphes particulières, sauf si la biodisponibilité de la substance en est affectée. Sauf indication contraire, toutes les formes d'une substance pour usage pharmaceutique satisfont aux exigences de la monographie de cette substance.

## PRODUCTION

Les substances pour usage pharmaceutique sont produites par des procédés conçus pour assurer une qualité reproductible et satisfaire aux exigences des monographies ou de spécifications approuvées.

Les dispositions du chapitre général *5.10* s'appliquent au contrôle des impuretés dans les substances pour usage pharmaceutique.

Que la monographie d'une substance pour usage pharmaceutique spécifie ou non que la substance :

- est une protéine recombinante ou une autre substance dont l'obtention découle directement d'une modification génétique, dans les cas appropriés, la substance satisfait également aux exigences de la monographie générale *Produits obtenus par la méthode dite de l'ADN recombinant (0784)*,
- est obtenue à partir d'animaux sensibles aux encéphalopathies spongiformes transmissibles autrement que par épreuve expérimentale, dans les cas appropriés, la substance satisfait également aux exigences de la monographie générale *Produits comportant un risque de transmission d'agents d'encéphalopathies spongiformes animales (1483)*,
- est une substance obtenue par un procédé de fermentation, indépendamment du fait que les microorganismes impliqués sont modifiés par des procédés traditionnels ou par la technologie dite de l'ADN recombinant (ADNr), dans les cas appropriés, la substance satisfait également aux exigences de la monographie générale *Produits de fermentation (1468)*.

Lorsque des solvants sont utilisés en cours de production, ils sont de qualité appropriée ; de plus, leur toxicité et leur taux résiduel sont pris en considération (*5.4*). Si de l'eau est utilisée en cours de production, elle est de qualité appropriée.

Si une substance est produite ou traitée en vue d'obtenir une certaine forme ou qualité, cette forme ou qualité particulière de la substance satisfait aux exigences de la monographie. Certains essais de caractéristiques liées à la fonctionnalité peuvent être décrits pour contrôler des propriétés susceptibles d'affecter l'adéquation de la substance et, par suite, les propriétés des formes pharmaceutiques où elle est utilisée.

Les *substances pulvérisées* peuvent faire l'objet d'un traitement visant à obtenir un certain degré de finesse (*2.9.35*).

Les *substances compactées* font l'objet d'un traitement visant à augmenter la taille des particules ou à leur conférer une forme spécifique et/ou à accroître la masse volumique de la substance.

Les *substances actives enrobées* se composent de particules de la substance, enrobées d'un ou plusieurs excipients appropriés.

Les *substances actives granulées* sont des particules de taille et/ou forme spécifiées, produites par granulation à partir de la substance directement ou au moyen d'un ou plusieurs excipients appropriés.

Si le traitement des substances fait intervenir des excipients, ces derniers satisfont aux exigences de leur monographie respective ou, si une telle monographie n'existe pas, de la spécification approuvée.

Lorsque les substances actives subissent un traitement faisant intervenir des excipients pour produire, par exemple, des substances enrobées ou granulées, le traitement est effectué selon les bonnes pratiques de fabrication. Les substances ainsi traitées sont considérées comme des intermédiaires dans la fabrication d'un médicament.

## CARACTÈRES

Les indications figurant sous la rubrique Caractères (par exemple concernant la solubilité ou une éventuelle température de décomposition) ne sont pas à interpréter de manière stricte, et ne constituent pas des exigences. Elles sont données à titre d'information.

L'existence d'un possible polymorphisme peut être signalée sous Caractères, afin d'attirer l'attention de l'utilisateur sur cette caractéristique dont il peut avoir à tenir compte lors de la formulation d'une préparation.

## IDENTIFICATION

Lorsque la rubrique Identification d'une monographie comporte 2 sous-rubriques intitulées « Première identification » et « Seconde identification », le ou les essais de la « Première identification » peuvent être utilisés en toutes circonstances. Le ou les essais de la « Seconde identification » peuvent être utilisés dans les pharmacies à condition qu'il puisse être démontré que la substance ou la préparation provient bien d'un lot attesté conforme à toutes les autres exigences de la monographie.

Certaines monographies comportent deux ou plusieurs ensembles d'essais pour les besoins de la première identification qui sont équivalents et peuvent être utilisés de façon indépendante. Un ou plusieurs de ces ensembles contiennent habituellement un renvoi à un essai de la rubrique Essai de la monographie. Il peut être utilisé pour simplifier le travail quand l'analyste effectue à la fois l'identification et les essais prescrits. Par exemple, l'un des ensembles renvoie à un essai de pureté énantiomèrique, alors que l'autre ensemble prescrit un essai du pouvoir rotatoire spécifique : le but des deux essais est le même, c'est-à-dire une vérification de la présence de l'énantiomère voulu.

## ESSAI

**Polymorphisme** (*5.9*). Si la nature d'une forme cristalline ou amorphe impose certaines restrictions quant à son utilisation dans des préparations, la nature de la forme cristalline

ou amorphe spécifiquement considérée est identifiée, sa morphologie est convenablement contrôlée et son identité est indiquée sur l'étiquette.

**Substances apparentées**. Dans les substances actives, les impuretés organiques sont déclarées, identifiées chaque fois qu'il est possible et qualifiées selon les indications du tableau 2034.-1, ou du tableau 2034.-2 pour les peptides obtenus par synthèse chimique, sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée.

Tableau 2034.-1. – *Déclaration, identification et qualification des impuretés organiques dans les substances actives*

| Utilisation | Dose maximale journalière | Seuil de déclaration | Seuil d'identification | Seuil de qualification |
|---|---|---|---|---|
| Usage humain ou usage humain et vétérinaire | ≤ 2 g/jour | > 0,05 pour cent | Soit > 0,10 pour cent soit > 1,0 mg par jour, en prenant le plus petit des deux | Soit > 0,15 pour cent soit > 1,0 mg par jour, en prenant le plus petit des deux |
| Usage humain ou usage humain et vétérinaire | > 2 g/jour | > 0,03 pour cent | > 0,05 pour cent | > 0,05 pour cent |
| Usage vétérinaire uniquement | Non applicable | > 0,10 pour cent | > 0,20 pour cent | > 0,50 pour cent |

Tableau 2034.-2. – *Déclaration, identification et qualification des impuretés organiques dans les peptides obtenus par synthèse chimique*

| Seuil de déclaration | Seuil d'identification | Seuil de qualification |
|---|---|---|
| > 0,1 pour cent | > 0,5 pour cent | > 1,0 pour cent |

Des seuils spécifiques peuvent s'appliquer dans le cas d'impuretés connues pour être très actives ou pour avoir des effets toxiques ou pharmacologiques inattendus.

Si une monographie spécifique n'apporte pas un contrôle approprié d'une nouvelle impureté, un essai approprié doit être mis au point et ajouté aux spécifications de la substance.

Les exigences ci-dessus ne s'appliquent pas aux produits biologiques ou biotechnologiques, aux oligonucléotides, aux produits radiopharmaceutiques, aux produits de fermentation et produits hémisynthétiques dérivés, aux produits bruts d'origine animale ou végétale ou aux produits végétaux.

**Solvants résiduels**. La teneur en solvants résiduels est limitée selon les principes définis dans le chapitre *5.4*, par la méthode générale *2.4.24* ou une autre méthode appropriée. Si une détermination quantitative d'un solvant résiduel est effectuée et qu'un essai de perte à la dessiccation n'est pas effectué, il est tenu compte de la teneur en solvant résiduel dans le calcul de la teneur lors du dosage de la substance et dans celui du pouvoir rotatoire spécifique et de l'absorbance spécifique.

**Qualité microbiologique**. Les monographies spécifiques présentent des critères d'acceptation de la qualité microbiologique lorsqu'un tel contrôle est nécessaire. Le tableau *5.1.4.-2. – Critères d'acceptation de la qualité microbiologique des substances pour usage pharmaceutique non stériles* du chapitre *5.1.4. Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles* présente des recommandations quant à la qualité microbiologique qui sont d'une application générale pour les substances sujettes à contamination microbienne. En fonction de la nature de la substance et de l'utilisation à laquelle elle est destinée, des critères d'acceptation différents peuvent être justifiés.

**Stérilité** (*2.6.1*). Les substances pour usage pharmaceutique destinées à la préparation de formes stériles sans autre procédé approprié de stérilisation, ou présentées comme substances de qualité « stérile », satisfont à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*). Les substances pour usage pharmaceutique présentées comme substances de qualité « exempte d'endotoxines bactériennes » satisfont à l'essai des endotoxines bactériennes. La limite et la méthode d'essai à utiliser (s'il ne s'agit pas de la méthode A de gélification) sont indiquées dans la monographie de la substance. La limite est calculée selon les *Recommandations pour la réalisation de l'essai des endotoxines bactériennes* du chapitre *2.6.14. Essai des endotoxines bactériennes*, sauf si une limite inférieure est justifiée au vu des résultats obtenus sur les lots de production, ou est exigée par l'Autorité compétente. Lorsqu'un essai des endotoxines bactériennes est prescrit, il n'est pas exigé d'essai des pyrogènes.

**Pyrogènes** (*2.6.8*). Les substances pour usage pharmaceutique pour lesquelles il est justifié d'utiliser l'essai des pyrogènes plutôt que celui des endotoxines bactériennes et qui sont présentées comme substances de qualité « exempte de pyrogènes », satisfont à l'essai des pyrogènes. La limite et la méthode d'essai à utiliser sont indiquées dans la monographie de la substance, ou approuvées par l'Autorité compétente. Sous réserve de validation comparative appropriée, l'essai des endotoxines bactériennes peut remplacer celui des pyrogènes.

**Propriétés supplémentaires**. Le contrôle de propriétés particulières (caractéristiques physiques, caractéristiques liées à la fonctionnalité par exemple) peut être nécessaire pour certains procédés de fabrication ou certaines formulations. Des qualités spéciales d'une substance (stérile, exempte d'endotoxines, apyrogène, ...) peuvent être produites en vue de la fabrication de préparations pour administration parentérale ou d'autres formes pharmaceutiques, et des exigences appropriées peuvent alors être spécifiées dans la monographie de la substance.



## DOSAGE

Sauf exception justifiée et autorisée, les teneurs en substances pour usage pharmaceutique sont déterminées, au moyen de méthodes appropriées.

## ÉTIQUETAGE

D'une manière générale, l'étiquetage est régi par des accords internationaux et par des règlements supranationaux et nationaux. Les indications figurant sous la rubrique Etiquetage ne constituent donc pas une liste exhaustive et, par ailleurs, seules sont obligatoires aux fins de la Pharmacopée, les indications d'étiquetage nécessaires pour démontrer la conformité ou non conformité à la monographie. Toute autre information est donnée à titre de recommandation. Lorsque le terme « étiquette » est employé dans la Pharmacopée, les indications, peuvent figurer sur le récipient, sur l'emballage, sur une notice qui accompagne l'emballage, sur le certificat d'analyse qui accompagne le produit, selon la décision de l'Autorité compétente.

Dans les cas appropriés, l'étiquette indique que la substance :

- est destinée à un usage spécifique,
- présente une forme cristalline distincte,
- possède un degré de finesse spécifique,
- a fait l'objet d'un compactage,
- a fait l'objet d'un enrobage,
- a fait l'objet d'une granulation,
- est stérile,
- est exempte d'endotoxines bactériennes,
- est apyrogène,
- contient des agents régulateurs d'écoulement.

Dans les cas appropriés, l'étiquette indique :

- le degré d'hydratation,
- le nom et la concentration de tout excipient.

Monographies générales

01/2009:0153

# VACCINS POUR USAGE HUMAIN

## Vaccina ad usum humanum

DÉFINITION

Les vaccins pour usage humain sont des préparations contenant des antigènes ayant la propriété de créer chez l'homme une immunité active et spécifique contre l'agent infectant ou la toxine ou l'antigène élaborés par celui-ci. Les réponses immunitaires comprennent l'induction des mécanismes innés et adaptifs (cellulaires, humoraux) du système immunitaire. Il doit être démontré que les vaccins à usage humain possèdent une activité immunogène et une innocuité acceptables chez l'homme lorsqu'ils sont administrés selon le programme de vaccination préconisé.

Les vaccins pour usage humain peuvent être constitués par : des microorganismes entiers (bactéries, virus ou parasites), inactivés par des moyens chimiques ou physiques qui maintiennent des propriétés immunogènes adéquates ; des microorganismes vivants entiers naturellement avirulents ou qui ont été traités afin d'atténuer leur virulence tout en maintenant des propriétés immunogènes adéquates ; des antigènes extraits des microorganismes ou sécrétés par des microorganismes ou préparés par génie génétique ou synthèse chimique. Les antigènes peuvent être utilisés dans leur état d'origine ou ils peuvent être détoxifiés ou modifiés de toute autre manière, par des moyens chimiques ou physiques et peuvent être sous forme d'agrégats, de conjugats ou de polymères afin d'augmenter leur pouvoir immunogène. Les vaccins peuvent contenir un adjuvant. Si l'antigène est adsorbé sur un adjuvant minéral, le vaccin est appelé vaccin « adsorbé ».

Certains termes employés dans les monographies des vaccins pour usage humain sont définis dans le chapitre *5.2.1*.

Les *vaccins bactériens contenant des cellules entières* sont des suspensions d'opacité variable dans des liquides incolores ou sensiblement incolores ou ils peuvent être cryodesséchés. Ils peuvent être adsorbés. La concentration en bactéries vivantes ou inactivées est exprimée en Unités Internationales d'opacité, ou selon le cas, par dénombrement des germes dans une cellule compte-microbes ou pour les germes vivants, par culture.

Les *vaccins bactériens contenant des composants de bactérie* sont des suspensions ou des produits cryodesséchés. Ils peuvent être adsorbés. La teneur en antigène est déterminée par un dosage approprié validé.

Les *anatoxines bactériennes* sont préparées à partir de toxines par réduction de leur toxicité à un niveau acceptable ou par neutralisation complète de cette toxicité au moyen de méthodes physiques ou chimiques, tout en maintenant des propriétés immunogènes adéquates. Les toxines sont obtenues à partir de souches sélectionnées de microorganismes. La méthode de préparation est choisie de façon à transformer de manière irréversible la toxine en anatoxine. Les anatoxines sont purifiées. La purification est effectuée avant et/ou après détoxification. Les vaccins anatoxiniques peuvent être adsorbés.

Les *vaccins viraux* sont préparés à partir de virus cultivés soit sur animaux ou sur oeufs embryonnés, soit sur cultures cellulaires ou sur tissus appropriés, soit par la culture de cellules modifiées par génie génétique. Les vaccins viraux sont liquides et peuvent être d'opacité variable selon le type de préparation ou ils peuvent être cryodesséchés. Ils peuvent être adsorbés. Les préparations liquides et les préparations cryodesséchées reconstituées peuvent être colorées lorsqu'un indicateur de pH tel que le rouge de phénol a été utilisé dans le milieu de culture.

Les *vaccins à antigène de synthèse* sont généralement des liquides limpides ou incolores. La concentration des composants est habituellement exprimée par une teneur en antigène spécifique.

Les *vaccins combinés* sont des préparations ayant plusieurs composants et formulées de telle façon que plusieurs antigènes sont administrés simultanément. Les différents composants antigéniques sont destinés à protéger contre différents types ou souches d'un même organisme et/ou contre différents organismes. Un vaccin combiné peut être présenté par le fabricant soit sous forme d'une préparation unique liquide ou cryodesséchée soit sous forme de plusieurs constituants accompagnés des indications nécessaires pour le mélange avant emploi. Lorsqu'il n'existe aucune monographie pour une combinaison particulière, le vaccin est conforme à la monographie de chaque composant individuel, avec les modifications éventuellement approuvées par l'Autorité compétente.

Les *vaccins adsorbés* sont des suspensions ; ils peuvent laisser un dépôt au fond du récipient.

PRODUCTION

**Dispositions générales**. Il doit être établi que le procédé de production utilisé pour un produit donné permet d'obtenir de façon constante des lots comparables à celui pour lequel l'efficacité clinique, le pouvoir immunogène et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées. Les spécifications du produit, y compris les contrôles en cours de fabrication, doivent être établies. Des exigences spécifiques concernant la production, y compris les essais effectués en cours de fabrication figurent dans les monographies spécifiques. Dans des cas justifiés et autorisés, certains essais peuvent ne pas être effectués s'il peut être démontré par d'autres moyens, par exemple des essais de validation, que le procédé de production donne de façon régulière un produit qui est conforme à l'essai.

Sauf exception justifiée et autorisée, les vaccins sont préparés selon un système de lot de semence. Les méthodes de préparation sont conçues de façon à conserver les propriétés immunogènes adéquates, à rendre la préparation inoffensive et à prévenir la contamination par des agents étrangers.

Lorsque la fabrication de vaccins pour usage humain fait intervenir des matières d'origine humaine ou animale, les exigences générales du chapitre *5.1.7. Sécurité virale* s'appliquent en complément des exigences plus spécifiques concernant la sécurité virale qui figurent dans cette monographie ainsi que dans les chapitres *5.2.2. Elevage de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés pour la production et le contrôle de qualité des vaccins*, *5.2.3. Substrats cellulaires utilisés pour la production de vaccins pour usage humain*, *2.6.16. Essai des agents étrangers dans les vaccins viraux pour usage humain*, et dans les monographies spécifiques.

Sauf exception justifiée et autorisée, pour la production d'un lot final de vaccin, le nombre de passages d'un virus ou le nombre de subcultures d'une bactérie à partir du lot de semence primaire n'est pas supérieur à celui utilisé pour la production du vaccin qui s'est avéré satisfaisant en ce qui concerne l'innocuité et l'efficacité ou le pouvoir immunogène, lors d'essais cliniques.

Dans la mesure du possible, les vaccins sont exempts de substances reconnues comme ayant provoqué des réactions toxiques, des réactions allergiques ou d'autres réactions indésirables chez l'homme. Des additifs convenables, y compris des stabilisants et des adjuvants, peuvent être ajoutés pendant la préparation. La pénicilline et la streptomycine ne sont utilisées à aucun stade de la préparation ni ajoutées dans le produit final ; néanmoins, les lots de semence primaires préparés à l'aide de milieux contenant de la pénicilline ou de la streptomycine peuvent être utilisés pour la production dans des cas justifiés et autorisés.

La régularité de la production est une caractéristique importante de la production des vaccins. Les monographies relatives à des vaccins pour usage humain fournissent des limites concernant différents essais effectués en cours de production et sur le lot final. Ces limites peuvent se présenter sous la forme de valeurs maximales, de valeurs minimales ou de

tolérances minimales et maximales autour d'une valeur donnée. Si la conformité à ces limites est requise, elles ne suffisent pas nécessairement à garantir la régularité de la production pour un vaccin donné. Pour disposer d'essais pertinents, le fabricant doit donc définir pour chaque produit un ou plusieurs seuils appropriés d'intervention ou une ou plusieurs limites appropriées pour la libération du produit, à appliquer au vu des résultats obtenus sur des lots testés cliniquement et les lots utilisés pour démontrer la régularité de la production. Ces limites peuvent être affinées ultérieurement sur une base statistique, à la lumière des données de la production.

**Substrats pour la multiplication des microorganismes**. Les substrats utilisés satisfont aux exigences appropriées de la Pharmacopée (*5.2.2*, *5.2.3*) ou à défaut à celles décidées par l'Autorité compétente. L'utilisation des banques de cellules et des cultures cellulaires qui en sont issues est faite dans des conditions d'asepsie, dans un endroit où d'autres cellules ne sont pas manipulées. Il est démontré que le sérum et la trypsine utilisés dans la préparation des suspensions de cellules et des milieux sont exempts d'agents étrangers.

**Lots de semence/banques de cellules**. Le lot de semence primaire ou la banque de cellules sont identifiés par des données historiques, y compris des informations sur leur origine et leur manipulation ultérieure. Des mesures appropriées sont prises pour assurer qu'aucun agent étranger, ou toute autre substance indésirable, n'est présent dans un lot de semence primaire ou de travail ou dans une banque de cellules.

**Milieux de culture**. Les milieux de culture sont exempts, dans la mesure du possible, de substances reconnues comme ayant provoqué des réactions toxiques, des réactions allergiques ou d'autres réactions indésirables chez l'homme ; s'il est nécessaire d'employer de tels ingrédients pendant la production, il sera démontré que la quantité présente dans le lot final est telle que la préparation est inoffensive. Du sérum animal approuvé (mais non humain) peut être utilisé dans les milieux de culture pour la croissance cellulaire, mais le milieu final utilisé pour maintenir les cultures cellulaires en cours de multiplication virale ne contient pas de sérum animal sauf indication contraire. Les milieux de culture cellulaire peuvent contenir un indicateur de pH tel que le rouge de phénol et des antibiotiques approuvés à la plus faible concentration efficace, mais il est préférable d'utiliser un substrat exempt d'antibiotiques pendant la production.

**Multiplication et récolte**. La multiplication des cultures de semence et la récolte sont effectuées dans des conditions définies. La pureté de la récolte est vérifiée par des essais appropriés comme définis dans la monographie.

**Cellules témoins**. Dans les cas de vaccins produits sur cultures cellulaires, des cellules témoins sont maintenues et examinées selon les indications de la monographie. Ces cellules représentent un contrôle valable seulement si elles sont maintenues dans des conditions qui sont équivalentes pour l'essentiel à celles utilisées pour la culture cellulaire de production, y compris l'emploi des mêmes lots de milieux et les mêmes changements de milieu.

**Oeufs témoins**. Dans les cas de vaccins produits sur oeufs, des oeufs témoins sont maintenus et examinés selon les indications de la monographie.

**Purification**. Dans les cas appropriés, des procédés de purification validés peuvent être utilisés.

**Inactivation**. Les vaccins inactivés sont préparés à l'aide d'un procédé d'inactivation validé dont l'efficacité et la régularité ont été démontrées. Lorsqu'il est reconnu que des agents étrangers peuvent être présents dans une récolte, par exemple lorsque le vaccin est produit sur des oeufs provenant d'un élevage sain non EOPS, le procédé d'inactivation est également validé vis-à-vis d'une gamme de modèles d'agents étrangers représentatifs des agents étrangers potentiels. Un essai de mesure de l'efficacité du procédé d'inactivation est effectué aussitôt que possible après l'inactivation.

**Vrac final**. Le vrac final est préparé par mélange aseptique des différents ingrédients du vaccin. Dans le cas des vaccins non liquides pour administration par une voie autre que parentérale, le vrac final est préparé par mélange des différents ingrédients du vaccin dans des conditions appropriées.

*Adjuvants*. Un ou plusieurs adjuvants peuvent entrer dans la formulation d'un vaccin pour potentialiser et/ou moduler la réponse immunitaire vis-à-vis du/des antigène(s). Ces adjuvants peuvent figurer dans la formulation du vaccin final ou être présentés séparément. Un contrôle qualité et une caractérisation appropriés du/des adjuvant(s), seul(s) et combiné(s) à l'antigène (ou aux antigènes), sont essentiels pour une production reproductible. Des spécifications relatives à la qualité sont établies pour chaque adjuvant, seul et combiné à l'antigène (ou aux antigènes).

*Adsorbants utilisés comme adjuvants*. Les vaccins peuvent être adsorbés sur de l'hydroxyde d'aluminium, du phosphate d'aluminium, du phosphate de calcium ou d'autres adsorbants appropriés. Les adsorbants sont préparés dans des conditions particulières qui leur confèrent la forme physique et les propriétés d'adsorption appropriées.

Si un adsorbant est utilisé comme adjuvant et est généré *in situ* au cours de la production du vaccin, des spécifications de qualité sont établies pour chaque ingrédient et pour l'adsorbant généré dans le vaccin. Les spécifications de qualité visent en particulier à contrôler :

- la composition chimique qualitative et quantitative,
- la forme physique et les propriétés d'adsorption associées, dans les cas appropriés, notamment si l'adjuvant est présent en tant qu'adsorbant,
- l'interaction entre adjuvant et antigène,
- la pureté, notamment la teneur en endotoxines bactériennes et la qualité microbiologique,
- tout autre paramètre jugé indispensable à la fonctionnalité.

La stabilité de chaque adjuvant, seul et combiné à l'antigène (ou aux antigènes), notamment en ce qui concerne les paramètres critiques, est établie lors des études de développement.

*Conservateurs antimicrobiens*. Des conservateurs antimicrobiens sont employés pour empêcher l'altération de la préparation ou éviter des effets indésirables suite à une contamination microbienne du vaccin pendant son utilisation. Les conservateurs antimicrobiens ne sont pas incorporés dans les préparations cryodesséchées. Généralement, il n'est pas acceptable d'incorporer un conservateur antimicrobien dans les préparations liquides unidoses. Dans le cas de préparations multidoses liquides, la nécessité d'un conservateur antimicrobien est évaluée, compte tenu de la possibilité de contamination pendant l'utilisation du vaccin et de la période maximale d'utilisation recommandée du récipient entamé. Si le vaccin contient un conservateur antimicrobien, il est démontré que celui-ci n'affecte ni l'innocuité ni l'efficacité du vaccin. L'addition d'antibiotiques en tant que conservateurs antimicrobiens n'est généralement pas acceptable.

Au cours de la phase de développement, l'efficacité du conservateur antimicrobien pendant toute la durée de validité doit être démontrée à l'Autorité compétente.

L'efficacité du conservateur antimicrobien est évaluée comme décrit dans le chapitre *5.1.3*. Lorsque ni les critères A ni les critères B ne peuvent être respectés, dans les cas justifiés les critères suivants sont appliqués aux vaccins pour usage humain : bactéries, pas d'augmentation à 24 h et à 7 jours, réduction de 3 log à 14 jours, pas d'augmentation à 28 jours ; champignons, pas d'augmentation à 14 jours et à 28 jours.

**Stabilité des intermédiaires**. Pendant la production de vaccins, les intermédiaires sont obtenus à différents stades et sont conservés, parfois pour de longues durées. Ces intermédiaires incluent :

- des lots de semence et banques de cellules,
- des récoltes vivantes ou inactivées,

- des récoltes purifiées qui peuvent être des toxines ou des anatoxines, des polyosides, des suspensions bactériennes ou virales,
- des antigènes purifiés,
- des antigènes adsorbés,
- des polyosides conjugués,
- un vrac final,
- un vaccin dans son récipient final fermé, conservé à une température inférieure à celle utilisée pour les études de stabilité du produit final et destiné à être libéré sans nouvelle détermination de l'activité.

Sauf dans le cas où ils sont utilisés dans un bref délai, des études de stabilité sont conduites sur les intermédiaires dans les conditions de conservation prévues afin d'établir l'étendue prévue de la dégradation. Pour le vrac final, des études de stabilité peuvent être effectuées sur des échantillons représentatifs dans des conditions équivalentes à celles utilisées pour la conservation. Dans les cas appropriés, une durée de validité applicable dans les conditions de conservation prévues est établie au vue des études de stabilité pour chaque intermédiaire (sauf pour les lots de semence et les banques de cellules).

**Lot final**. Le lot final est préparé par répartition aseptique du vrac final dans des récipients stériles à fermeture inviolable qui sont fermés, dans les cas appropriés après cryodessiccation, de façon à prévenir toute contamination. Dans le cas des vaccins non liquides pour administration par une voie autre que parentérale, le lot final est préparé par répartition, dans des conditions appropriées, du vrac final dans des récipients stériles à fermeture inviolable. Dans des cas justifiés et autorisés, certains essais prescrits pour le lot final peuvent être effectués sur le vrac final s'il a été démontré que les opérations de fabrication ultérieures sont sans effet sur la conformité.

**Aspect**. Sauf exception justifiée et autorisée, chaque récipient (flacon, seringue ou ampoule) de chaque lot final est inspecté à l'oeil nu ou de façon automatisée pour vérifier si l'aspect est acceptable.

*Degré d'adsorption*. Sauf exception justifiée et autorisée, dans le cas d'un vaccin adsorbé, une spécification du degré d'adsorption pour la libération des lots est établie en fonction des résultats trouvés pour des lots utilisés lors des essais cliniques. A partir des données de stabilité obtenues pour le vaccin, il doit être démontré que le degré d'adsorption à la fin de la période de validité n'est pas inférieur à celui des lots utilisés pour les essais cliniques.

*Stabilité*. Pendant les études de développement, le maintien de l'activité du lot final pendant toute la durée de validité est démontré ; la perte d'activité dans les conditions de conservation recommandées est mesurée et une perte excessive peut indiquer que le vaccin n'est pas acceptable, même si l'activité reste supérieure au minimum acceptable.

*Date de péremption*. Sauf indication contraire, la date de péremption est calculée à partir du début de l'essai d'activité ou de la détermination du titre en virus selon le cas et pour les vaccins combinés à partir du début du premier essai d'activité ou détermination de titre. Pour les vaccins conservés à une température inférieure à celle utilisée pour les études de stabilité et destinés à être libérés sans nouvelle détermination de l'activité, la date de péremption est calculée à partir de la date de sortie des conditions de froid. Si pour un vaccin donné il n'est pas effectué de détermination de l'activité, la date de péremption du lot final est calculée à compter de la date de réalisation d'un essai indicatif de stabilité approuvé ou à défaut à compter de la date de lyophilisation ou de la date de conditionnement dans le récipient final. Dans le cas d'un vaccin combiné ayant des composants présentés en récipients séparés, la date de péremption correspond à celle du composant qui sera périmé en premier.

La date de péremption s'applique aux vaccins conservés dans les conditions prescrites.

**Essai sur animaux**. Conformément aux dispositions de la Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, les essais doivent être réalisés de telle façon qu'ils utilisent le moins d'animaux possible et qu'ils réduisent au minimum toutes douleur, souffrance, détresse ou nuisance durable. Les critères d'évaluation des essais dans les monographies doivent être mis en application en tenant compte de ces considérations. Par exemple, s'il est indiqué qu'un animal est considéré positif, infecté, etc., quand apparaissent des signes cliniques typiques ou en cas de mort de l'animal, alors, dès que l'indication suffisante d'un résultat positif est obtenue, l'animal en question doit être euthanasié ou recevoir un traitement approprié pour éviter toute souffrance inutile. Conformément aux Prescriptions Générales, des méthodes d'essai de remplacement peuvent être utilisées pour démontrer la conformité à la monographie et l'utilisation de tels essais est particulièrement encouragée quant elle entraîne le remplacement ou la réduction de l'utilisation d'animaux ou la réduction de leur souffrance.

## ESSAI

Les vaccins satisfont aux essais prescrits dans les monographies spécifiques, y compris dans les cas appropriés, aux essais figurant ci-après.

**pH** (*2.2.3*). Les vaccins liquides, après reconstitution dans les cas appropriés, satisfont aux limites de pH approuvées pour la préparation considérée.

**Adjuvant**. Si le vaccin contient un adjuvant, sa teneur est déterminée et il est démontré qu'elle est dans les limites acceptables par rapport à la teneur attendue (voir également les essais de l'aluminium et du calcium ci-après).

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg d'aluminium (Al) par dose humaine unitaire lorsqu'un adsorbant à base d'aluminium a été utilisé, sauf indication contraire.

**Calcium** (*2.5.14*) : au maximum 1,3 mg de calcium (Ca) par dose humaine unitaire lorsqu'un adsorbant à base de calcium a été utilisé, sauf indication contraire.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L en formaldéhyde libre dans le lot final lorsque le formaldéhyde a été utilisé pendant la préparation du vaccin, sauf indication contraire.

**Phénol** (*2.5.15*) : au maximum 2,5 g/L dans le produit final lorsque le phénol a été utilisé pendant la préparation du vaccin, sauf indication contraire.

**Eau** (*2.5.12*) : au maximum 3,0 pour cent *m/m* lorsque le vaccin est cryodesséché, sauf indication contraire.

**Volume extractible** (*2.9.17*). Sauf exception justifiée et autorisée, le vaccin satisfait aux exigences relatives au volume extractible.

**Endotoxines bactériennes**. Sauf exception justifiée et autorisée, un essai des endotoxines bactériennes est effectué sur le produit final. S'il n'est pas spécifié de limite dans la monographie spécifique, la teneur en endotoxines bactériennes, déterminée par une méthode appropriée (*2.6.14*), est inférieure à la limite approuvée pour le produit considéré.

## CONSERVATION

A l'abri de la lumière. Sauf indication contraire, les vaccins sont conservés à une température de 5 ± 3 °C et les vaccins liquides et adsorbés ne doivent pas être congelés.

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- le nom de la préparation,
- une référence qui identifie le lot final,
- la dose humaine recommandée et la voie d'administration,
- les conditions de conservation,
- la date de péremption,

– le nom et la concentration du conservateur antimicrobien, le cas échéant,
– le nom des antibiotiques, adjuvants, aromatisants et stabilisants présents, le cas échéant, dans le vaccin,
– dans les cas appropriés, que le vaccin est adsorbé,
– la mention des substances susceptibles de provoquer des réactions secondaires, des contre-indications pour l'utilisation du vaccin,
– dans le cas des vaccins cryodesséchés :
  – le nom ou la composition et le volume du liquide de reconstitution à ajouter,
  – la période pendant laquelle le vaccin doit être utilisé après reconstitution.

**01/2008:0062**

# VACCINS POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Vaccina ad usum veterinarium

*Dans le cas d'un vaccin mixte, les monographies individuelles, lorsqu'elles existent, s'appliquent aux composants du vaccin mixte, sous réserve, si nécessaire, des modifications indiquées (voir Essai (Innocuité) ci-après, Evaluation de l'innocuité des vaccins vétérinaires (5.2.6) et Evaluation de l'efficacité des vaccins vétérinaires (5.2.7)).*

### 1. DÉFINITION

Les vaccins pour usage vétérinaire sont des préparations contenant des substances antigéniques destinées à induire une immunité active spécifique contre des maladies provoquées par des bactéries, des toxines, des virus, des champignons ou des parasites. Ces vaccins, vivants ou inactivés, induisent une immunité active, qui peut être transmise passivement par les anticorps d'origine maternelle, envers les agents infectieux qu'ils contiennent, et parfois également envers des organismes apparentés du point de vue antigénique. Ils peuvent contenir des bactéries, des toxines, des virus ou des champignons, vivants ou inactivés, des parasites, des fractions antigéniques ou des substances élaborées par ces organismes et rendues inoffensives, mais ayant conservé tout ou partie de leurs propriétés antigéniques ; les vaccins peuvent également être constitués par des mélanges de ces divers composants. Les antigènes peuvent être préparés par la méthode dite de l'ADN recombinant. Des adjuvants appropriés peuvent être incorporés afin d'améliorer les propriétés immunisantes des vaccins.

Certains termes employés dans les monographies des vaccins pour usage vétérinaire sont définis sous *5.2.1*.

#### 1-1. *VACCINS BACTÉRIENS ET ANATOXINES BACTÉRIENNES*

Les vaccins et les anatoxines bactériens sont préparés à partir de cultures en milieux liquides ou solides adéquats, ou par d'autres procédés appropriés ; cette section ne s'applique pas aux vaccins bactériens préparés en cultures cellulaires ou sur animaux vivants. La souche de bactérie utilisée peut avoir été modifiée par génie génétique. L'identité, l'activité antigénique et la pureté de chaque culture bactérienne utilisée sont soigneusement contrôlées.

Les vaccins bactériens contiennent des bactéries vivantes ou inactivées, ou leurs composants antigéniques ; ce sont des préparations liquides d'opacité variable ou des préparations cryodesséchées.

Les anatoxines bactériennes sont préparées à partir de toxines, par réduction à un niveau très bas ou neutralisation complète de leur toxicité par des moyens physiques ou chimiques ; les moyens mis en oeuvre sont tels qu'ils n'altèrent pas l'activité immunisante du vaccin. Les toxines sont obtenues à partir de souches sélectionnées de microorganismes spécifiés, cultivés sur des milieux appropriés ou sont obtenues par d'autres méthodes appropriées, par exemple la synthèse chimique.

Les anatoxines peuvent être :
– liquides,
– précipitées par l'alun ou tout autre agent approprié,
– purifiées et/ou adsorbées sur du phosphate d'aluminium, de l'hydroxyde d'aluminium, du phosphate de calcium ou tout autre adsorbant spécifié dans les monographies.

Les anatoxines bactériennes sont des liquides limpides ou légèrement opalescents. Les anatoxines adsorbées se présentent sous forme de suspensions ou d'émulsions. Certaines anatoxines peuvent être cryodesséchées.

Sauf indication contraire, les dispositions et exigences mentionnées ci-après pour les vaccins bactériens s'appliquent de la même façon aux vaccins et aux anatoxines bactériennes et aux produits contenant un mélange de cellules bactériennes et d'anatoxine.

#### 1-2. *VACCINS VIRAUX*

Les vaccins viraux sont préparés par multiplication en cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*), dans des tissus, dans des microorganismes, dans des oeufs embryonnés ou, lorsqu'il n'y a aucune autre possibilité, dans un animal vivant, ou par tout autre moyen approprié. La souche de virus utilisée peut avoir été modifiée par génie génétique. Ce sont des préparations liquides ou cryodesséchées d'un ou de plusieurs virus ou de sous-unités ou peptides viraux.

Les vaccins viraux vivants sont préparés à partir de virus de virulence atténuée ou de faible virulence naturelle envers l'espèce cible.

Les vaccins inactivés sont soumis à un procédé validé d'inactivation du virus et peuvent être purifiés et concentrés.

#### 1-3. *VACCINS UTILISANT DES VECTEURS*

Les vaccins utilisant des vecteurs sont des préparations liquides ou cryodesséchées d'un ou de plusieurs microorganismes vivants (bactéries ou virus), non ou peu pathogènes, dans lesquels ont été insérés un ou plusieurs gènes exprimant des antigènes qui suscitent une réponse immunitaire protectrice vis-à-vis d'autres microorganismes.

### 2. PRODUCTION

#### 2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Les méthodes de préparation, qui varient selon le type de vaccin considéré, sont propres à assurer le maintien de l'intégrité et le pouvoir immunogène de l'antigène et à exclure toute contamination par des agents étrangers.

Les substances d'origine animale utilisées dans la production des vaccins pour usage vétérinaire sont conformes aux spécifications indiquées sous *5.2.5*. Les substances d'autre origine satisfont aux exigences de la Pharmacopée (lorsqu'une monographie correspondante existe) et sont préparées de manière à éviter la contamination du vaccin.

2-1-1. **Substrats de production**. Les cultures cellulaires utilisées pour la production de vaccins à usage vétérinaire sont conformes aux spécifications reprises sous *5.2.4*.

Lorsqu'il est fait référence, dans une monographie, à des élevages de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS), ces élevages sont conformes aux spécifications reprises sous *5.2.2*.

Lorsque, dans le cas des vaccins inactivés, l'agent infectieux est cultivé dans des embryons de poulet, ceux-ci proviennent soit d'élevages EOPS (*5.2.2*) soit d'élevages non-EOPS sains exempts de certains agents spécifiés et des anticorps correspondants, tel que prescrit dans la monographie. Il peut être nécessaire de démontrer l'efficacité du procédé d'inactivation envers certains contaminants potentiels spécifiés. L'utilisation d'oeufs provenant d'élevages EOPS (*5.2.2*) est obligatoire pour l'établissement d'une banque de cellules primaire et pour tous les passages d'un microorganisme jusqu'au lot de semence de travail compris.

Monographies générales

Lorsqu'il n'y a aucune alternative à l'emploi d'animaux ou des tissus animaux pour la production d'un vaccin vétérinaire, ces animaux seront exempts d'agents pathogènes spécifiés, dont la nature dépend de l'espèce source et de l'espèce cible du vaccin.

2-1-2. **Milieux utilisés pour la préparation des cultures d'ensemencement et pour la production**. La composition, au moins qualitative, des milieux utilisés pour la préparation des cultures d'ensemencement et pour la production est enregistrée. La qualité de chacun des ingrédients indiqués est spécifiée. Lorsque les milieux ou ingrédients sont revendiqués comme propriété industrielle, ceci est indiqué et une description appropriée est enregistrée. Pour ce qui est des substances d'origine animale, l'espèce source et le pays d'origine sont spécifiés, et ils satisfont aux critères indiqués dans la méthode *5.2.5*. Les méthodes utilisées pour la préparation des milieux, procédés de stérilisation compris, sont consignés.

Lors de la fabrication du produit, l'addition d'antibiotiques est normalement limitée aux liquides de culture cellulaire et autres milieux, aux inoculums injectés à des oeufs et aux produits récoltés à partir de tissus, cutanés ou autres.

2-1-3. **Lots de semence**

2-1-3-1. *Lots de semence bactériens*

2-1-3-1-1. Exigences générales. Les bactéries utilisées pour la production du vaccin sont caractérisées en termes de genre et d'espèce (et le cas échéant de variété). Chaque fois qu'il est possible, les bactéries utilisées pour la production sont cultivées dans un système de lot de semence. Chaque lot de semence primaire est soumis aux essais décrits ci-après. Un registre de l'origine des bactéries, de la date d'isolement, de l'historique des passages (y compris les procédés de purification et de caractérisation) et des conditions de conservation est tenu pour chaque lot de semence primaire. Un code spécifique d'identification est attribué à chaque lot de semence primaire.

2-1-3-1-2. Cultures. Le nombre minimal et le nombre maximal de subcultures effectuées pour chaque lot de semence avant l'étape de production sont spécifiés. Les méthodes utilisées pour la préparation des cultures de semence et celle des suspensions d'ensemencement, les techniques d'inoculation des bactéries, le titre et la concentration des inoculums et des milieux utilisés sont consignés. Il sera démontré que les subcultures réalisées ne modifient pas les caractéristiques de la semence (par exemple, dissociation ou propriétés antigéniques). Les conditions de conservation de chaque lot de semence sont consignées.

2-1-3-1-3. Identité et pureté. Il est établi, pour chaque lot de semence primaire, qu'il contient uniquement des bactéries de l'espèce et de la souche indiquées. Une description succincte de la méthode employée pour identifier chaque souche d'après ses caractéristiques biochimiques, sérologiques et morphologiques, et la distinguer autant que possible des souches apparentées, est enregistrée, ainsi que les méthodes de détermination de la pureté de la souche. Si le lot de semence s'avère contenir des organismes vivants, quels qu'ils soient, autres que les bactéries de l'espèce et de la souche indiquées, il est impropre à la production de vaccins.

2-1-3-2. *Lots de semence de virus*

2-1-3-2-1. Exigences générales. Les virus utilisés pour la production sont multipliés selon un système de lot de semence. Chaque lot de semence primaire est soumis aux essais décrits ci-après. Un registre de l'origine, la date de l'isolement, l'historique des passages (y compris les procédés de purification et de caractérisation) et des conditions de conservation est tenu pour chaque lot de semence. Un code d'identification est attribué à chaque lot de semence. Normalement, le virus utilisé pour la production d'un vaccin n'aura pas subi plus de 5 passages à partir du lot de semence primaire. Sauf indication contraire, les essais portant sur le lot de semence primaire qui sont décrits ci-après sont conduits sur des organismes n'ayant pas subi, en début d'essai, plus de 5 passages depuis le lot de semence primaire.

Lorsque le lot de semence primaire de virus se présente sous la forme d'une banque de cellules primaire porteuse du virus, les essais suivants sont effectués sur un volume approprié de virus obtenu par lyse des cellules de la banque de cellules primaire. Lorsque les essais appropriés ont été effectués sur des cellules lysées pour valider la banque de cellules primaire, il n'est pas nécessaire de les répéter.

2-1-3-2-2. Multiplication. La multiplication du virus au stade du lot de semence primaire et pour tous les passages ultérieurs est effectuée en culture cellulaire, dans des oeufs embryonnés ou chez des animaux dont il a été établi qu'ils sont appropriés à la production de vaccin (voir plus haut). Si des substances d'origine animale sont utilisées, elles satisfont aux spécifications prescrites sous *5.2.5*.

2-1-3-2-3. Identification. Une méthode permettant d'identifier la souche vaccinale et de la distinguer autant que possible des souches apparentées est utilisée.

2-1-3-2-4. Contamination bactérienne et fongique. Le lot de semence primaire satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*).

2-1-3-2-5. Mycoplasmes (*2.6.7*). Le lot de semence primaire satisfait à l'essai des mycoplasmes (méthode par culture et méthode d'épifluorescence en culture cellulaire).

2-1-3-2-6. Absence de virus étrangers. Les monographies peuvent contenir des spécifications relatives à l'absence d'agents étrangers ; dans le cas contraire, ce sont les spécifications ci-après qui s'appliquent.

Des préparations d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux contenant des taux élevés d'anticorps dirigés contre le virus de semence sont préparées, sous forme de lots, à l'aide d'un antigène ne dérivant d'aucun des passages de l'isolat de virus à partir duquel a été préparé le lot de semence primaire. Chaque lot de sérum est maintenu à 56 °C pendant 30 min afin d'inactiver le complément. Pour chaque lot, l'absence d'anticorps dirigés contre les contaminants potentiels du virus de semence est établie, de même que l'absence de toute action inhibitrice non spécifique sur la capacité des virus à infecter des cellules (ou, le cas échéant, des oeufs) et à se multiplier en leur sein. Si un tel sérum ne peut être obtenu, d'autres méthodes sont utilisées pour neutraliser ou éliminer spécifiquement le virus vaccinal.

Si le virus du lot de semence est susceptible d'affecter la conduite et la sensibilité de l'essai des virus étrangers, un échantillon du lot de semence primaire est traité avec une quantité aussi faible que possible de l'anticorps monoclonal ou polyclonal, de façon à neutraliser (autant que possible) ou à éliminer le virus vaccinal. Le mélange final virus-sérum aura, si possible, un titre en virus au moins équivalent à 10 doses de vaccin par 0,1 mL dans le cas des vaccins aviaires et par millilitre dans le cas d'autres vaccins. Dans le cas de vaccins aviaires, les recherches à effectuer sur les lots de semence figurent au chapitre *2.6.24*. Dans le cas de vaccins pour mammifères, une recherche des agents étrangers est effectuée comme suit sur le lot de semence ou le mélange de lot de semence et d'immunosérum.

Le mélange est inoculé à des cultures, de surface au moins égale à 70 $cm^2$, de cellules des types requis. L'inoculation peut avoir lieu à n'importe quel stade de la croissance correspondant à une confluence allant jusqu'à 70 pour cent. Au moins 1 tapis de chaque type cellulaire est conservé comme témoin. Les cultures font l'objet de contrôles quotidiens pendant une semaine. Elles sont ensuite congelées et décongelées à 3 reprises, puis centrifugées de façon à éliminer les débris de cellules et réinoculées à des cellules du même type que précédemment. Cette opération est répétée à 2 reprises. Le nombre de cellules obtenu au dernier passage, dans des récipients appropriés, devra être suffisant pour la réalisation des essais ci-après.

Monographies générales

Une recherche des agents cytopathogènes et hémadsorbants est effectuée selon les méthodes décrites sous *5.2.4*. Des techniques telles que l'immunofluorescence sont employées pour la détection d'agents de contamination spécifiques dans les cultures cellulaires. Le lot de semence primaire est inoculé à :

- des cellules primaires de l'espèce dont provient le virus,
- des cellules sensibles aux virus pathogènes pour les espèces auxquelles le vaccin est destiné,
- des cellules sensibles aux pestivirus.

Si le lot de semence primaire s'avère contenir des organismes vivants de quelque sorte que ce soit, autres que le virus appartenant à l'espèce et à la souche indiquées, ou des antigènes viraux étrangers, il est impropre à la production de vaccins.

2-1-4. **Inactivation**. Les vaccins inactivés sont soumis à un procédé validé d'inactivation. L'essai de cinétique d'inactivation décrit ci-après est effectué une seule fois pour un procédé de production donné. Les autres essais décrits ci-après sont à effectuer à chaque cycle de production. Lors des essais d'inactivation, il est indispensable de tenir compte du fait que dans les conditions de fabrication, les organismes peuvent être protégés physiquement de l'agent d'inactivation.

2-1-4-1. *Cinétique d'inactivation*. Il sera démontré que l'agent et le procédé d'inactivation employés assurent effectivement l'inactivation du microorganisme vaccinal dans les conditions de fabrication. Des données appropriées seront établies quant à la cinétique d'inactivation. Normalement, le temps nécessaire à l'inactivation ne dépassera pas 67 pour cent de la durée de l'étape d'inactivation.

2-1-4-2. *Aziridine*. Si l'agent d'inactivation employé est un dérivé de l'aziridine, il sera établi qu'il n'en reste aucun résidu à la fin de l'étape d'inactivation. Pour ce faire, il est possible de neutraliser l'agent d'inactivation par le thiosulfate puis de mettre en évidence la présence de thiosulfate résiduel dans la récolte inactivée après l'étape d'inactivation.

2-1-4-3. *Formaldéhyde*. Si l'agent d'inactivation employé est du formaldéhyde, un essai de détection du formaldéhyde libre est effectué comme prescrit sous Essai.

2-1-4-4. *Autres agents d'inactivation*. Lorsqu'un autre procédé d'inactivation est employé, des essais sont effectués permettant de démontrer que l'agent d'inactivation est éliminé soit totalement soit jusqu'à un taux résiduel acceptable.

2-1-4-5. *Bactérie/virus vivant(e) résiduel(le) et/ou essai de détoxication*. Un essai permettant de confirmer l'inactivation et/ou la détoxication est effectué immédiatement après l'étape d'inactivation et/ou de détoxication et, dans les cas appropriés, après la neutralisation ou l'élimination des résidus de l'agent d'inactivation ou de détoxication.

2-1-4-5-1. Vaccins bactériens. La méthode d'essai choisie sera appropriée aux bactéries considérées et comprendra au moins 2 passages sur les milieux utilisés en production ou, si la production est effectuée sur milieu solide, dans un milieu liquide approprié ou sur les milieux prescrits dans les monographies. Le produit est conforme si aucun microorganisme vivant n'est détecté.

2-1-4-5-2. Anatoxines bactériennes. L'essai choisi sera approprié à la toxine ou aux toxines présentes et le plus sensible des essais disponibles.

2-1-4-5-3. Vaccins viraux. La méthode d'essai choisie sera appropriée au virus considéré et comprendra au moins 2 passages sur cultures cellulaires, dans des oeufs embryonnés ou, s'il n'y a aucune autre méthode de sensibilité appropriée, chez des animaux. La quantité de cellules, d'oeufs ou d'animaux utilisés sera suffisante pour que l'essai soit suffisamment sensible. Pour les essais sur cultures cellulaires, un tapis de 150 $cm^2$ au moins de cultures cellulaires sont inoculées avec 1,0 mL de récolte inactivée. Aucun virus ou autre microorganisme vivant n'est détecté.

Le vrac final est préparé par mélange d'un ou de plusieurs lots d'antigène, qui satisfont à tous les essais indiqués, à des substances auxiliaires telles que des adjuvants, des conservateurs antimicrobiens, des stabilisants et des diluants.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION VACCINALE ET CHOIX DE LA SOUCHE VACCINALE*

Lors du choix de la composition vaccinale et du choix de la souche, parmi les éléments importants à évaluer figurent l'innocuité, l'efficacité et la stabilité. Les prescriptions décrites par les méthodes *5.2.6* et *5.2.7* concernent respectivement l'évaluation de l'innocuité et l'évaluation de l'efficacité ; ces indications peuvent être explicitées ou complétées par les exigences des monographies.

Dans le cas de vaccins vivants, on établit lors des études de développement, un titre maximal en virus ou un nombre maximal de bactéries acceptable du point de vue de l'innocuité. Ce titre est par la suite considéré comme le maximum acceptable lors de la libération de chaque lot de vaccin.

2-2-1. **Activité et pouvoir immunogène**. Les essais intitulés Activité et Pouvoir immunogène dans les monographies ont un double objectif :

- la rubrique Activité sert à établir, par un essai bien contrôlé réalisé dans des conditions expérimentales, l'activité minimale acceptable d'un lot de vaccin, qui doit être garantie pendant toute la durée de validité,
- les essais réalisés dans des conditions expérimentales contrôlées font normalement partie de la démonstration globale de l'efficacité du vaccin (voir chapitre *5.2.7*) ; la méthode mentionnée dans l'essai Pouvoir immunogène (en règle générale, elle renvoie à la rubrique Pouvoir Immunogène) convient pour une part à ce type de contrôle.

2-2-2. **Voie d'administration**. Lors du développement d'un vaccin, l'innocuité et le pouvoir immunogène sont démontrés pour chacune des voies d'administration recommandées. Les principales voies d'administration utilisées sont les suivantes, mais cette liste n'est pas exhaustive :

- intramusculaire,
- sous-cutanée,
- intraveineuse,
- ophtalmique,
- orale,
- nasale,
- transfixion dans les pattes,
- transfixion,
- intradermique,
- intrapéritonéal,
- *in ovo*.

2-2-3. **Méthodes d'administration**. Lors du développement d'un vaccin, l'innocuité et le pouvoir immunogène sont démontrés pour chacune des méthodes d'administration recommandées. Les principales méthodes d'administration utilisées sont les suivantes, mais cette liste n'est pas exhaustive :

- injection,
- eau de boisson,
- pulvérisation,
- collyre,
- scarification,
- implantation,
- immersion.

2-2-4. **Catégories d'animaux**. Il est parfois spécifié dans les monographies qu'un essai donné est à effectuer pour chaque catégorie d'animaux de l'espèce cible pour lequel le produit est recommandé ou peut être recommandé. Les principales catégories à prendre en compte sont les suivantes, mais cette liste n'est pas exhaustive.

Monographies générales

– *Mammifères* :
  – animaux gravides/animaux non gravides,
  – animaux principalement destinés à la reproduction/animaux principalement destinés à la production alimentaire,
  – animaux de l'âge (ou de la taille) minimal recommandé pour la vaccination.
– *Espèces aviaires* :
  – oiseaux principalement destinés à la production d'oeufs/oiseaux principalement destinés à la production de viande,
  – oiseaux avant ponte/oiseaux après le début de la ponte.
– *Poissons* :
  – poissons reproducteurs/poissons essentiellement destinés à la production alimentaire.

2-2-5. **Conservateurs antimicrobiens**. Les conservateurs antimicrobiens sont employés pour empêcher l'altération de la préparation ou éviter des effets indésirables suite à une contamination microbienne du vaccin se produisant pendant son utilisation, qui ne doit normalement pas dépasser 10 h après que le récipient a été entamé. Les conservateurs antimicrobiens ne sont pas incorporés dans les préparations cryodesséchées ; cependant, en fonction de la période maximale d'utilisation recommandée du vaccin après reconstitution, ils peuvent être incorporés dans le diluant des préparations multidoses cryodesséchées. Sauf exception justifiée et autorisée, il n'est pas acceptable d'incorporer un conservateur antimicrobien dans les préparations liquides unidoses mais l'ajout d'un conservateur antimicrobien peut être acceptable, par exemple lorsque le même vaccin est réparti en récipients unidoses et multidoses et lorsqu'il est utilisé pour des espèces qui ne sont pas destinées à la production alimentaire. Dans le cas de préparations multidoses liquides, la nécessité d'un conservateur antimicrobien est évaluée, compte tenu de la possibilité de contamination pendant l'utilisation du vaccin et de la période maximale d'utilisation recommandée du récipient entamé.

Au cours des études de développement, l'efficacité du conservateur antimicrobien pendant toute la période de validité sera démontrée de manière à satisfaire l'Autorité compétente.

L'efficacité du conservateur antimicrobien est évaluée comme décrit au chapitre *5.1.3* et, en outre, des échantillons sont prélevés à intervalles appropriés pour contrôler les effets du conservateur antimicrobien sur la durée proposée de conservation après ouverture. Dans des cas justifiés, lorsque ni les critères A, ni les critères B ne peuvent être respectés, les critères suivants s'appliquent aux vaccins à usage vétérinaire : bactéries, pas d'augmentation de 24 h à 7 jours, réduction de 3 log à 14 jours, pas d'augmentation à 28 jours ; champignons, pas d'augmentation à 14 jours ni à 28 jours.

L'addition d'antibiotiques en tant que conservateurs antimicrobiens n'est généralement pas acceptable.

2-2-6. **Stabilité**. La durée de validité proposée sera justifiée par les résultats d'études de stabilité, qui comprennent des déterminations soit du titre en virus, soit du nombre de bactéries, soit de l'activité, effectuées à intervalles réguliers, jusqu'à 3 mois au-delà de la date de péremption, sur au moins 3 lots successifs et représentatifs du vaccin conservés dans les conditions recommandées et, le cas échéant, des mesures de la teneur en humidité (dans le cas de produits cryodesséchés), des essais physiques sur les adjuvants, des essais chimiques sur les constituants des adjuvants et les conservateurs, et des mesures de pH.

La stabilité du vaccin reconstitué, dans les cas appropriés, est évaluée par rapport au mode d'emploi recommandé.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

Certains essais peuvent être effectués sur le vrac final plutôt que sur le lot final ou les lots finals qui en sont dérivés ; parmi ces essais figurent la détermination des teneurs en conservateur antimicrobien et en formaldéhyde libre, et la détermination d'activité des vaccins inactivés.

2-3-1. **Bactérie/virus vivant(e) résiduel(le) et/ou essai de détoxication**. Dans le cas de vaccins inactivés, si les substances auxiliaires interfèrent avec l'essai d'inactivation et/ou de détoxication, l'essai est effectué pendant la préparation du vrac final, après mélange des différents lots d'antigènes mais avant addition de substances auxiliaires ; l'essai d'inactivation ou de détoxication peut alors ne pas être effectué sur le vrac final et le lot final.

S'il existe un risque de réversion à la toxicité, l'essai de détoxication effectué au stade le plus avancé du procédé de production où la sensibilité de l'essai n'est pas compromise (par exemple après le mélange des différents lots d'antigènes, mais avant l'addition de substances auxiliaires) est important pour démontrer l'absence de réversion à la toxicité.

2-3-2. **Activité du lot**. Les méthodes d'essai décrites sous Activité ou Pouvoir immunogène ne sont généralement pas adaptées aux contrôles de routine des lots de vaccin.

Pour les vaccins vivants, on établit lors du développement le titre minimal en virus/nombre minimal de bactéries acceptable donnant des résultats satisfaisants à l'essai d'activité et aux autres études d'efficacité. Pour les contrôles de routine, il doit être démontré pour chaque lot que le vaccin possède, au moment de la libération, un titre en virus/nombre de bactéries suffisant pour que, au vu des études de stabilité, il contienne encore au terme de sa durée de validité et s'il est conservé dans les conditions recommandées, au moins le titre en virus/nombre de bactéries identifié comme minimum acceptable lors des études de développement.

Pour les vaccins inactivés, si l'essai décrit sous Activité n'est pas utilisé pour les contrôles de routine, un essai d'activité à effectuer sur chaque lot est établi lors du développement. L'objectif de cet essai est d'assurer que chaque lot du vaccin satisferait à l'essai décrit sous Activité ou Pouvoir immunogène si celui-ci lui était appliqué. Les critères d'acceptation de l'essai d'activité effectué sur chaque lot sont par conséquent établis par corrélation avec l'essai décrit sous Activité. Lorsqu'un essai d'activité effectué sur chaque lot est décrit dans une monographie, il est donné à titre d'exemple de méthode considérée comme appropriée après établissement de la corrélation avec l'essai d'activité. D'autres modèles d'essai peuvent également être utilisés.

2-3-3. **Lot final**. Sauf indication contraire dans la monographie, le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable, qui sont ensuite fermés de façon à empêcher toute contamination.

Seul un lot final qui est conforme à chacune des spécifications prescrites sous 3. Essais effectués sur chaque lot ci-après ou dans les monographies individuelles, peut être libéré. Sous réserve de l'autorisation de l'Autorité compétente, certains essais sur le lot final peuvent être omis si des essais réalisés en cours de fabrication donnent une garantie au moins équivalente de la conformité du lot final ou si d'autres essais validés par rapport à l'essai de la Pharmacopée ont été effectués.

Dans la plupart des cas, l'essai d'identification peut être combiné à l'essai d'activité effectué sur chaque lot pour éviter d'utiliser des animaux inutilement. Pour un vaccin donné, un essai *in vitro* validé peut être utilisé pour éviter d'utiliser des animaux inutilement.

Il est admis que, conformément aux Prescriptions générales (section 1.1. Généralités), l'application en routine de l'essai d'innocuité peut ne pas être exigée par l'Autorité compétente pour un vaccin établi, par souci de protection des animaux, si un nombre suffisant de lots consécutifs ont été produits et ont satisfait à l'essai, démontrant ainsi la régularité du procédé de fabrication. Des changements significatifs du procédé de fabrication peuvent nécessiter un rétablissement des essais de routine pour établir à nouveau la régularité de la production. Le nombre de lots consécutifs à contrôler dépend d'un certain nombre de facteurs comme le type de vaccin, la fréquence de la production des lots et l'expérience vis-à-vis du vaccin acquise pendant les essais d'innocuité en cours de développement et

pendant l'application de l'essai d'innocuité effectué sur chaque lot. Sans préjuger de la décision de l'Autorité compétente, à la lumière des informations disponibles pour un vaccin donné, le contrôle de 10 lots consécutifs sera généralement suffisant pour la plupart des produits. Pour les produits présentant un risque inhérent quant à leur innocuité, il peut être nécessaire de continuer à effectuer l'essai d'innocuité sur chaque lot.

*Essais sur animaux.* Conformément aux dispositions de la Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, les essais doivent être réalisés de telle façon qu'ils utilisent le moins d'animaux possible et qu'ils réduisent au minimum toutes douleur, souffrance, détresse ou nuisance durable. Les critères d'évaluation des essais dans les monographies doivent être mis en application en tenant compte de ces considérations. Par exemple, s'il est indiqué qu'un animal est considéré comme positif, infecté, etc. quand apparaissent des signes cliniques typiques, alors, dès qu'il apparaît clairement que le résultat ne sera pas affecté, il convient d'euthanasier l'animal en question ou de lui administrer un traitement approprié pour lui éviter toute souffrance inutile. Conformément aux Prescriptions générales, il est admis d'utiliser des méthodes d'essai de remplacement pour démontrer la conformité à la monographie, et l'utilisation de tels essais est particulièrement encouragée quand elle entraîne le remplacement ou la réduction de l'utilisation d'animaux ou la réduction de leur souffrance.

2-3-4-1 *Essais physiques.* Les vaccins à adjuvant huileux sont soumis à un essai de viscosité, par une méthode appropriée ; la viscosité doit se situer dans les limites approuvées pour le produit. La stabilité de l'émulsion sera démontrée.

2-3-4-2 *Essais chimiques.* Il est démontré par des essais appropriés que la concentration de certaines substances, telles que l'aluminium et les conservateurs antimicrobiens, est conforme aux limites définies pour le produit.

2-3-4-3 *pH.* Le pH des produits liquides et des diluants est mesuré ; il est démontré que les mesures sont conformes aux limites de pH définies pour le produit.

2-3-4-4 *Eau.* Dans les cas appropriés, le procédé de cryodessiccation est vérifié par mesure de la teneur en eau qui doit se situer dans les limites approuvées pour le produit.

## 3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

*Les monographies indiquent également les essais à effectuer pour chaque vaccin particulier.*

Dans les essais de contrôle de qualité, si des oeufs de poule, des poulets ou des cultures de cellules de poulets sont employés, ils proviennent d'un élevage EOPS (*5.2.2*).

3-1. **Identification**. Pour les vaccins inactivés, l'identification prescrite dans les monographies est généralement un essai d'induction de la production d'anticorps car il est applicable à tous les vaccins.

3-2. **Formaldéhyde** (*2.4.18* ; utilisez le Procédé B si du métabisulfite de sodium a été ajouté au vaccin pendant la préparation pour neutraliser un excès de formaldéhyde). Les préparations traitées par le formaldéhyde contiennent au maximum 0,5 g/L de formaldéhyde libre, sauf s'il a été démontré qu'une teneur plus élevée est bien tolérée.

3-3. **Phénol** (*2.5.15*). Si le vaccin contient du phénol, sa teneur en phénol n'est pas supérieure à 5 g/L.

3-4. **Stérilité** (*2.6.1*). Lorsque la monographie le prescrit, le vaccin satisfait à l'essai de stérilité. Si le volume de liquide contenu dans le récipient est supérieur à 100 mL, il est recommandé d'utiliser, si possible, la technique de filtration sur membrane. Si la technique de filtration sur membrane ne peut pas être employée, la méthode d'inoculation directe peut être utilisée. Lorsque le volume de liquide contenu dans chaque récipient est d'au moins 20 mL, la prise d'essai à utiliser pour chaque milieu est de 10 pour cent de ce volume au minimum, mais de 5 mL au maximum. Le nombre d'unités à examiner (*2.6.1*) est de 1 pour cent du lot, avec un minimum de 4 et un maximum de 10.

Dans le cas de vaccins viraux vivants aviaires uniquement pour administration non parentérale, l'essai de stérilité est généralement remplacé par une spécification d'absence de microorganismes pathogènes et une limite de 1 microorganisme non pathogène par dose de vaccin.

3-5. **Agents étrangers**. Les monographies prescrivent un ensemble de mesures qui, appliquées collectivement, apportent un degré acceptable d'assurance quant à l'absence d'agents infectieux étrangers dans le produit final. Ces mesures comprennent :

1) la production dans le cadre d'un système de lots de semence et d'un système de banques de cellules, chaque fois que possible ;

2) la réalisation sur les lots de semence et les banques de cellules d'essais poussés à la recherche des agents étrangers ;

3) l'application d'exigences relatives aux élevages EOPS dont proviennent les substrats utilisés pour la production de vaccins ;

4) la réalisation d'essais sur les substances d'origine animale, qui doivent, chaque fois que possible, faire l'objet d'une procédure d'inactivation ;

5) pour les vaccins vivants, la réalisation sur le produit final d'essais de recherche des agents étrangers infectieux ; ces essais sont moins poussés que ceux effectués aux étapes antérieures en raison des garanties apportées par les contrôles en cours de production.

En cas de doute, les essais destinés au lot de semence d'un vaccin vivant peuvent également être appliqués au produit final. Si un agent étranger est détecté lors d'un tel essai, le vaccin ne satisfait pas à la monographie.

Les vaccins viraux vivants aviaires satisfont aux essais des agents étrangers dans les lots de produits finis (*2.6.25*).

3-6. **Mycoplasmes** (*2.6.7*). Lorsque la monographie le prescrit, le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes (méthode par culture).

3-7. **Innocuité**. En général, 2 doses d'un vaccin inactivé ou 10 doses d'un vaccin vivant sont administrées par une des voies recommandées. Dans certaines conditions, il peut être nécessaire de réduire le nombre de doses prescrit ou d'adapter la méthode de reconstitution et d'injection, par exemple lorsque, pour des vaccins combinés, il est difficile de reconstituer 10 doses du composant vivant dans 2 doses du composant inactivé. Les animaux sont mis en observation pendant la période la plus longue prescrite dans les monographies. Il ne se produit aucune réaction locale ou générale anormale. Lorsqu'un même vrac final est utilisé pour produire plusieurs lots, l'essai d'innocuité est réalisé sur le premier lot et peut être omis sur les lots suivants produits à partir du même vrac final.

Pendant les études de développement, le type et le degré de réactions que l'on peut s'attendre à rencontrer suite à l'emploi du vaccin sont définis à la lumière des essais d'innocuité. Cette définition sert alors de base, dans l'essai d'innocuité effectué sur chaque lot, pour l'évaluation de l'acceptabilité des réactions notées.

Le statut immunitaire des animaux à utiliser dans l'essai d'innocuité est indiqué dans chaque monographie. Dans la plupart des cas, une des 3 catégories suivantes est indiquée :

1) les animaux doivent être exempts d'anticorps contre tout virus/bactérie/toxine etc., présent dans le vaccin,

2) les animaux sont de préférence exempts d'anticorps mais des animaux présentant un faible taux d'anticorps peuvent être utilisés tant qu'ils n'ont pas été vaccinés et que l'administration du vaccin n'entraîne pas de réponse anamnestique,

3) les animaux ne doivent pas avoir été vaccinés contre la maladie que le vaccin est censé prévenir.

En règle générale, la catégorie 1 est indiquée pour les vaccins vivants. Dans les autres cas, la catégorie 2 est généralement indiquée mais si la plupart des animaux disponibles pour les essais sont de la catégorie 1, celle-ci peut être également

Monographies générales

indiquée pour un vaccin inactivé. La catégorie 3 est indiquée pour quelques vaccins inactivés, lorsque la détermination du taux d'anticorps, avant l'essai n'est pas nécessaire ou ne peut être pratiquée. Dans le cas des vaccins aviaires, l'emploi d'oiseaux EOPS est généralement spécifié.

Dans le cas de vaccins aviaires, l'essai d'innocuité est généralement effectué sur 10 poulets EOPS (*5.2.2*), mais dans le cas de vaccins non destinés au poulet, l'essai est effectué sur 10 oiseaux d'une des espèces auxquelles le vaccin est destiné ; dans ce dernier cas, les oiseaux ne doivent pas posséder d'anticorps dirigés contre l'agent de la maladie pour laquelle le vaccin doit fournir une protection.

3-8. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences du Pouvoir immunogène (section 2-3-1) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

4. CONSERVATION

A l'abri de la lumière et à une température de 5 ± 3 °C, sauf indication contraire. Sauf indication contraire, les préparations liquides ne doivent pas être congelées.

5. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- que le vaccin est à usage vétérinaire,
- le volume de préparation et le nombre de doses contenus dans le récipient,
- la voie d'administration,
- le ou les types de bactéries ou de virus utilisés et, pour les vaccins vivants, le nombre minimal et maximal de bactéries vivantes ou le titre minimal et maximal en virus,
- dans le cas des vaccins inactivés, l'activité minimale en Unités Internationales lorsqu'elles existent,
- dans les cas appropriés, le nom et la concentration du conservateur antimicrobien ou autre excipient,
- le nom de toute substance susceptible de provoquer des réactions indésirables,
- pour les vaccins cryodesséchés :
  - le nom (ou la composition) et le volume du liquide à ajouter pour reconstituer le vaccin,
  - la période pendant laquelle le vaccin peut être utilisé après reconstitution,
- pour les vaccins à adjuvant huileux, le fait qu'en cas d'injection accidentelle du vaccin à l'homme, une intervention médicale d'urgence est nécessaire,
- l'espèce animale à laquelle le vaccin est destiné,
- les indications du vaccin,
- le mode d'emploi,
- les contre-indications à l'utilisation du vaccin, y compris tout avertissement nécessaire concernant les dangers de l'administration d'une surdose,
- les doses recommandées pour les différentes espèces.

# FORMES PHARMACEUTIQUES

04/2010:1502

# GLOSSAIRE

## Glossa

*Le texte suivant contient des définitions et/ou des explications relatives à certains termes, qui apparaissent dans les monographies générales de formes pharmaceutiques et les chapitres correspondants décrivant les méthodes de pharmacotechnie (2.9), ou sont utilisés en relation avec ces textes, sans y être définis. Dans certains cas, il est fait référence dans ce glossaire à des termes, considérés comme « équivalents », qui sont utilisés dans d'autres publications ou contextes.*

*Ce glossaire est publié à titre d'information.*

**Base**

Dans les préparations solides et semi-solides, vecteur de la (ou des) substance(s) active(s), composé d'un ou plusieurs excipients.

**Dispersion colloïdale**

Système dans lequel des particules de taille colloïdale (dimension approximative 1 nm à 500 nm) de diverse nature (solide, liquide ou gaz) sont dispersées dans une phase continue de composition et/ou d'état différent.

**Emulsion**

Système dispersé constitué par le mélange d'au moins 2 liquides non-miscibles entre eux. Un des liquides est dispersé dans l'autre sous forme de gouttelettes.

**Forme à libération conventionnelle**

Préparation où la libération de la (ou des) substance(s) active(s) n'a pas fait l'objet d'une modification délibérée résultant de la mise en oeuvre d'une formulation particulière et/ou d'un procédé de fabrication spécial. Dans le cas des formes solides, le profil de dissolution de la substance active dépend essentiellement de ses propriétés intrinsèques. Terme équivalent : forme à libération immédiate.

**Forme à libération modifiée**

Préparation où la libération de la (ou des) substance(s) active(s) a fait l'objet, quant à sa vitesse et/ou son lieu, d'une modification délibérée résultant d'une formulation particulière et/ou d'un procédé de fabrication spécial, et est donc différente de celle qu'assurerait la forme à libération conventionnelle administrée par la même voie. Les formes à libération modifiée comprennent les formes à libération prolongée, à libération retardée et à libération séquentielle.

**Forme à libération prolongée**

Type particulier de forme à libération modifiée se caractérisant par une vitesse de libération de la (ou des) substance(s) active(s) inférieure à celle qu'assurerait la forme à libération conventionnelle administrée par la même voie. La libération prolongée est le résultat d'une formulation particulière et/ou d'un procédé de fabrication spécial.

**Forme à libération retardée**

Type particulier de forme à libération modifiée se caractérisant par une libération différée de la (ou des) substance(s) active(s). La libération retardée est le résultat d'une formulation particulière et/ou d'un procédé de fabrication spécial. Les formes à libération retardée comprennent les préparations gastro-résistantes comme définies dans les monographies générales traitant de formes pharmaceutiques solides administrées par voie orale.

**Forme à libération séquentielle**

Type particulier de forme à libération modifiée se caractérisant par une libération séquentielle de la (ou des) substance(s) active(s). La libération séquentielle est le résultat d'une formulation particulière et/ou d'un procédé de fabrication spécial.

**Préparation parentérale de grand volume**

Solution pour perfusion ou solution injectable conditionnée en récipients de contenance nominale supérieure à 100 mL.

**Préparation parentérale de petit volume**

Solution pour perfusion ou solution injectable conditionnée en récipients de contenance nominale inférieure ou égale à 100 mL.

**Solution**

Mélange formant une seule phase, qui contient une ou plusieurs substances dissoutes, c'est-à-dire dispersées à l'état moléculaire, dans un solvant ou dans des solvants miscibles.

**Sphéroïdes**

Granules sphériques ou quasiment sphériques présentant une résistance mécanique généralement accrue par rapport aux *granules (0499)* conventionnels. Ils possèdent une surface lisse et régulière et leur taille varie généralement de 200 μm à 2,8 mm. Les sphéroïdes peuvent être préparés par différentes méthodes appropriées.

**Substance active**

Terme équivalent : principe actif.

**Suspension**

Système dispersé contenant des particules solides dispersées dans une phase continue, liquide ou semi-solide, dans laquelle les particules solides sont pratiquement insolubles.

**Terme normalisé**

Une liste de termes normalisés décrivant les différentes formes pharmaceutiques auxquelles se rattachent les médicaments, les voies d'administration et les récipients utilisés a été établie par la Commission européenne de Pharmacopée et fait l'objet d'une publication séparée.

**Véhicule**

Dans les préparations liquides, vecteur de la (ou des) substance(s) active(s), composé d'un ou plusieurs excipients.

01/2008:1154

# BÂTONS

## Styli

*Des exigences supplémentaires concernant les bâtons peuvent le cas échéant figurer dans d'autres monographies générales, par exemple la monographie Préparations nasales (0676).*

### DÉFINITION

Les bâtons sont des préparations solides pour usage local, de forme cylindrique ou conique, constituées d'une ou plusieurs substances actives, employées soit telles quelles soit dissoutes ou dispersées dans un excipient simple ou composé qui peut être soluble ou fondre à la température corporelle.

Les bâtons pour usage urétral et les bâtons intralésionnels sont stériles.

### PRODUCTION

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des bâtons, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques* (*5.1.4*).

Les bâtons pour usage urétral et autres bâtons stériles sont préparés à partir de produits et par des méthodes propres à assurer leur stérilité et à empêcher l'introduction de contaminants et la croissance de microorganismes ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Méthodes de préparation des produits stériles* (*5.1.1*).

Lors de la fabrication des bâtons, des mesures sont prises pour assurer que la préparation satisfait à un essai d'uniformité de masse ou, dans les cas appropriés, à un essai d'uniformité de teneur.

ESSAI

**Stérilité** (*2.6.1*). Les bâtons pour usage urétral et les bâtons intralésionnels satisfont à l'essai de stérilité.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– la quantité de substance(s) active(s) par bâton,
– dans le cas des bâtons pour usage urétral et des bâtons intralésionnels, que ces bâtons sont stériles.

**01/2008:0016**

# CAPSULES

## Capsulae

*Les exigences de la présente monographie ne s'appliquent pas nécessairement aux préparations présentées sous forme de capsules qui sont destinées à d'autres voies d'administration que la voie orale. Des exigences relatives à ces préparations peuvent le cas échéant figurer dans d'autres monographies générales, par exemple les monographies Préparations rectales (1145) et Préparations vaginales (1164).*

DÉFINITION

Les capsules sont des préparations solides constituées d'une enveloppe dure ou molle, de forme et de capacité variables, contenant généralement une dose unitaire de substance(s) active(s). Les capsules sont destinées à l'administration par voie orale.

L'enveloppe est à base de gélatine ou d'autres substances dont la consistance peut être adaptée par addition, par exemple, de glycérol ou de sorbitol. D'autres excipients tels que des agents tensioactifs, des opacifiants, des conservateurs antimicrobiens, des édulcorants, des colorants autorisés par l'Autorité compétente et des aromatisants peuvent également être ajoutés. Les capsules peuvent porter des indications imprimées.

Le contenu des capsules peut être solide, liquide ou de consistance pâteuse. Il est constitué d'une ou plusieurs substances actives additionnées ou non d'excipients tels que solvants, diluants, lubrifiants et désagrégeants. Le contenu ne doit pas provoquer de détérioration de l'enveloppe. En revanche, celle-ci est profondément altérée par les sucs digestifs ; il en résulte la libération du contenu.

Dans les cas appropriés, les récipients destinés aux capsules satisfont aux exigences relatives aux *Matériaux utilisés dans la fabrication des récipients* (*3.1* et sous-chapitres) et aux *Récipients* (*3.2* et sous-chapitres).

Plusieurs catégories de capsules peuvent être distinguées :

– les capsules à enveloppe dure ou gélules,
– les capsules à enveloppe molle,
– les capsules gastrorésistantes,
– les capsules à libération modifiée,
– les cachets.

PRODUCTION

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des capsules, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques* (*5.1.4*).

ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses**. Les capsules satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, aux essais d'uniformité de teneur et/ou d'uniformité de masse présentés ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les capsules dont la teneur en substance active est inférieure à 2 mg ou dans lesquelles la substance active représente moins de 2 pour cent de la masse remplie satisfont à l'essai B d'uniformité de teneur des préparations unidoses. Si la préparation contient plusieurs substances actives, l'essai ne s'applique qu'à celles qui répondent aux conditions indiquées ci-dessus.

**Uniformité de masse** (*2.9.5*). Les capsules satisfont à l'essai d'uniformité de masse des préparations unidoses. Lorsqu'un essai d'uniformité de teneur est prescrit pour toutes les substances actives, l'essai d'uniformité de masse n'est pas exigé.

**Dissolution**. Un essai approprié peut être réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante, par exemple l'un des essais décrits dans le texte *Essai de dissolution des formes solides* (*2.9.3*).

Lorsqu'un essai de dissolution est prescrit, un essai de désagrégation peut ne pas être exigé.

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 30 °C.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique le nom de tout conservateur antimicrobien ajouté.

## Capsules à enveloppe dure ou gélules

DÉFINITION

Les capsules à enveloppe dure ou gélules comportent une enveloppe préfabriquée constituée de 2 parties cylindriques ouvertes à une extrémité et dont le fond est hémisphérique.

PRODUCTION

La ou les substances actives, généralement sous forme solide (poudre ou granulés), sont introduites dans l'une des 2 parties, puis la seconde est emboîtée sur la première. La fermeture peut être renforcée par des moyens appropriés.

ESSAI

**Désagrégation**. Les capsules à enveloppe dure ou gélules satisfont à l'essai de désagrégation des comprimés et des capsules (*2.9.1*). Utilisez de l'*eau R* comme milieu liquide ou, dans certains cas justifiés et autorisés, de l'*acide chlorhydrique 0,1 M* ou du *suc gastrique artificiel R*. Si les capsules flottent à la surface de l'eau, un disque peut être ajouté. Faites fonctionner l'appareil pendant 30 min, sauf exception justifiée et autorisée.

## Capsules à enveloppe molle

DÉFINITION

Les capsules à enveloppe molle comportent une enveloppe plus épaisse que celles des capsules à enveloppe dure. L'enveloppe ne comporte qu'une partie et présente des formes variées.

PRODUCTION

Les capsules à enveloppe molle sont généralement formées, remplies et fermées au cours d'un même cycle de fabrication, mais les enveloppes peuvent dans certains cas être préfabriquées pour permettre les préparations extemporanées. L'enveloppe peut parfois contenir une substance active.

Les liquides peuvent être inclus directement ; les solides sont normalement dissous ou dispersés dans un excipient approprié pour obtenir une solution ou une dispersion de consistance pâteuse.

Du fait de la nature des matériaux et des surfaces en contact, il peut se produire une migration partielle d'un élément du contenant dans le contenu et vice versa.

Formes pharmaceutiques

ESSAI

**Désagrégation**. Les capsules à enveloppe molle satisfont à l'essai de désagrégation des comprimés et des capsules (*2.9.1*). Utilisez de l'*eau R* comme milieu liquide ou, dans certains cas justifiés et autorisés, de l'*acide chlorhydrique 0,1 M* ou du *suc gastrique artificiel R*. Placez un disque dans chacun des tubes. Certains médicaments liquides contenus dans des capsules à enveloppe molle peuvent attaquer le disque. Dans ce cas, et sous réserve d'autorisation, l'utilisation de l'appareil sans disque peut être admise. Faites fonctionner l'appareil pendant 30 min, sauf exception justifiée et autorisée. Si les capsules ne satisfont pas à l'essai en raison d'une adhérence au disque, les résultats ne sont pas valables. Répétez l'essai sur 6 autres capsules en omettant les disques.

## Capsules à libération modifiée

DÉFINITION

Les capsules à libération modifiée sont des capsules à enveloppe dure ou molle, dont le contenu ou l'enveloppe sont préparés avec des excipients spéciaux ou par des procédés particuliers visant à modifier la vitesse, le lieu ou le moment de la libération de la ou des substances actives.

Les capsules à libération modifiée comprennent les capsules à libération prolongée et à libération retardée.

PRODUCTION

Un essai approprié est réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante.

## Capsules gastrorésistantes

DÉFINITION

Les capsules gastrorésistantes sont des capsules à libération retardée destinées à résister au suc gastrique et à libérer la ou les substances actives dans le suc intestinal. Elles sont généralement préparées en remplissant des capsules avec des granulés ou des particules déjà recouverts d'un enrobage gastrorésistant, ou dans certains cas en recouvrant des capsules dures ou molles d'une enveloppe gastrorésistante (capsules entériques).

PRODUCTION

Dans le cas des capsules remplies de granulés ou de particules recouverts d'un enrobage gastrorésistant, un essai approprié est réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante.

ESSAI

**Désagrégation**. Pour les capsules à enveloppe gastrorésistante, effectuez l'essai de désagrégation (*2.9.1*) modifié de la façon suivante : utilisez l'*acide chlorhydrique 0,1 M* comme milieu liquide et faites fonctionner l'appareil pendant 2 h, ou pendant la durée autorisée, sans ajouter de disque. Examinez l'état des capsules. La durée de résistance en milieu acide varie selon la formulation de la capsule à examiner. Elle est typiquement de 2 h à 3 h et n'est jamais inférieure à 1 h, même compte tenu des dérogations autorisées. Aucune des capsules ne doit présenter de signes de désagrégation ou de fissures pouvant entraîner une perte de contenu. Remplacez la solution acide par de la *solution tampon phosphate pH 6,8 R*. Dans certains cas justifiés et autorisés, l'utilisation d'une solution tampon à pH 6,8 additionnée de poudre de pancréas (par exemple 0,35 g de *poudre de pancréas R* pour 100 mL de solution tampon) peut être admise. Introduisez un disque dans chacun des tubes. Faites fonctionner l'appareil pendant 60 min. Si les capsules ne satisfont pas à l'essai en raison d'une adhérence au disque, les résultats ne sont pas valables. Répétez l'essai sur 6 autres capsules en omettant les disques.

**Dissolution**. Dans le cas des capsules préparées à partir de granulés ou de particules déjà recouverts d'un enrobage gastrorésistant, un essai approprié est réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante, par exemple l'essai décrit dans le texte *Essai de dissolution des formes solides* (*2.9.3*).

## Cachets

DÉFINITION

Les cachets sont des préparations solides constituées d'une enveloppe dure contenant une unité de prise d'une ou plusieurs substances actives. L'enveloppe est composée de 2 demi-cylindres préfabriqués et de forme aplatie, constitués de pain azyme généralement obtenu à partir de farine de riz. Avant administration, les cachets sont trempés dans l'eau pendant quelques secondes, placés sur la langue, puis avalés avec une gorgée d'eau.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique le mode d'administration des cachets.

**01/2008:0478**

# COMPRIMÉS

## Compressi

*Les exigences de la présente monographie ne s'appliquent pas nécessairement aux préparations présentées sous forme de comprimés destinés à d'autres voies d'administration que la voie orale. Des exigences relatives à ces préparations peuvent le cas échéant figurer dans d'autres monographies générales, par exemple les monographies Préparations rectales (1145), Préparations vaginales (1164) et Préparations buccales (1807). Les exigences de la présente monographie ne s'appliquent pas aux pastilles, aux pâtes orales ni aux gommes orales. Dans certains cas justifiés et autorisés, les exigences de la présente monographie peuvent ne pas s'appliquer aux comprimés pour usage vétérinaire.*

DÉFINITION

Les comprimés sont des préparations solides contenant une unité de prise d'une ou plusieurs substances actives. Ils sont obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules ou par un autre procédé de fabrication approprié tel que l'extrusion, le moulage ou la cryodessiccation (lyophilisation). Les comprimés sont destinés à la voie orale. Certains sont avalés ou croqués, d'autres sont dissous ou désagrégés dans de l'eau avant administration, certains, enfin, doivent séjourner dans la bouche pour y libérer la substance active.

Les particules sont constituées d'une ou plusieurs substances actives, additionnées ou non d'excipients tels que : diluants, liants, désagrégeants, agents d'écoulement, lubrifiants, composés pouvant modifier le comportement de la préparation dans le tube digestif, colorants autorisés par l'Autorité compétente, aromatisants.

Les comprimés se présentent généralement sous la forme d'un cylindre droit dont les faces inférieures et supérieures peuvent être plates ou convexes et les bords biseautés. Ils peuvent porter des barres de cassures, un sigle ou une autre marque. Ils peuvent être enrobés.

Dans les cas appropriés, les récipients destinés aux comprimés satisfont aux exigences relatives aux matériaux utilisés dans la fabrication des récipients (*3.1* et sous-chapitres) et aux récipients (*3.2* et sous-chapitres).

Plusieurs catégories de comprimés pour administration par voie orale peuvent être distinguées :

– les comprimés non enrobés,
– les comprimés enrobés,
– les comprimés effervescents,
– les comprimés solubles,
– les comprimés dispersibles,

Formes pharmaceutiques

- les comprimés orodispersibles,
- les comprimés gastro-résistants,
- les comprimés à libération modifiée,
- les comprimés à utiliser dans la cavité buccale,
- les lyophilisats oraux.

PRODUCTION

Les comprimés sont généralement fabriqués par compression d'un volume constant de particules ou d'agrégats obtenus par des méthodes de granulation. Lors de la fabrication des comprimés, des mesures sont prises pour obtenir un produit présentant une résistance mécanique suffisante pour ne pas s'effriter ou se briser lors de manipulations ou d'étapes de production ultérieures. Cette résistance peut être démontrée au moyen des essais décrits dans les chapitres *2.9.7. Friabilité des comprimés non enrobés* et *2.9.8. Résistance à la rupture des comprimés* . Les comprimés à croquer sont préparés de façon à pouvoir se broyer facilement sous la dent.

*Sécabilité des comprimés.* Les comprimés peuvent porter une ou plusieurs barres de cassure et peuvent être cassés en fractions, soit pour faciliter la prise du médicament soit pour satisfaire à la posologie. Dans le second cas, la sécabilité des comprimés doit être évaluée et autorisée par l'autorité compétente. Afin de s'assurer que le patient recevra bien la dose prévue, l'efficacité de la barre de cassure doit être évaluée pendant le développement du produit, au travers de l'uniformité de masse des fractions de comprimés. Chaque dose autorisée doit subir l'essai suivant.

Prélevez 30 comprimés au hasard et cassez-les en fractions à la main. A partir des fractions obtenues avec un comprimé, prenez une fraction et rejetez la ou les autres fractions. Pesez individuellement chacune des 30 fractions et calculez la masse moyenne. Les comprimés satisfont à l'essai si la masse individuelle d'une fraction au plus se situe en dehors des limites de 85 pour cent à 115 pour cent de la masse moyenne. Les comprimés ne satisfont pas à l'essai si la masse individuelle de plus d'une fraction se situe en dehors de ces limites, ou si la masse individuelle d'une fraction se trouve en dehors des limites de 75 pour cent à 125 pour cent de la masse moyenne.

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des comprimés, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le chapitre *5.1.4. Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques.*

ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses** (*2.9.40*). Les comprimés satisfont à l'essai ou, dans les cas justifiés et autorisés, aux essais d'uniformité de teneur et/ou d'uniformité de masse présentés ci-après. Les drogues végétales et préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les comprimés dont la teneur en substance active est inférieure à 2 mg ou dans lesquels la substance active représente moins de 2 pour cent de la masse totale satisfont à l'essai A. Si la préparation contient plusieurs substances actives, l'essai ne s'applique qu'à celles qui répondent aux conditions indiquées ci-dessus.

Sauf exception justifiée et autorisée, les comprimés enrobés autres que les comprimés pelliculés satisfont à l'essai A quelle que soit leur teneur en substance(s) active(s).

**Uniformité de masse** (*2.9.5*). Les comprimés non enrobés et, sauf exception justifiée et autorisée, les comprimés pelliculés satisfont à l'essai. Lorsqu'un essai d'uniformité de teneur est prescrit, ou justifié et autorisé, pour toutes les substances actives, l'essai d'uniformité de masse n'est pas exigé.

**Dissolution**. Un essai approprié peut être réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante, par exemple l'un des essais décrits dans le chapitre *2.9.3. Essai de dissolution des formes solides.*

Lorsqu'un essai de dissolution est prescrit, un essai de désagrégation peut ne pas être exigé.

## Comprimés non enrobés

DÉFINITION

Les comprimés non enrobés comprennent des comprimés à couche unique et des comprimés à couches multiples disposées parallèlement ou concentriquement. Les premiers résultent d'une seule compression, les seconds de compressions successives exercées sur des ensembles différents de particules. Les excipients ne sont pas spécifiquement destinés à modifier la libération des substances actives dans les sucs digestifs.

Les comprimés non enrobés répondent à la définition générale des comprimés. Examinée à la loupe, leur section présente suivant les cas une texture relativement homogène (comprimés à couche unique) ou stratifiée (comprimés à couches multiples), sans apparence d'enrobage.

ESSAI

**Désagrégation** (*2.9.1*). Les comprimés non enrobés satisfont à l'essai. Utilisez l'*eau R* comme milieu liquide. Placez un disque dans chacun des tubes. Faites fonctionner l'appareil pendant 15 min, sauf exception justifiée et autorisée, puis examinez l'état des échantillons. Si les comprimés ne satisfont pas à l'essai en raison de l'adhérence au disque, les résultats sont non valides. Répétez l'essai sur 6 autres comprimés en omettant les disques.

*Les comprimés à croquer ne sont pas tenus de satisfaire à l'essai.*

## Comprimés enrobés

DÉFINITION

Les comprimés enrobés sont des comprimés recouverts d'une ou plusieurs couches de mélanges de substances diverses telles que : résines naturelles ou synthétiques, gommes, gélatine, charges insolubles inactives, sucres, substances plastifiantes, polyols, cires, colorants autorisés par l'Autorité compétente et, parfois, aromatisants et substances actives. Les substances employées pour l'enrobage sont généralement appliquées sous forme de solution ou de suspension dans des conditions qui favorisent l'évaporation du solvant. Quand l'enrobage est constitué d'un film polymère très mince, le comprimé est dit pelliculé.

Le revêtement des comprimés enrobés est lisse, souvent coloré et il peut être poli ; examinée à la loupe, leur section présente un noyau entouré d'une ou de plusieurs couches continues de texture différente.

PRODUCTION

Dans les cas justifiés, l'uniformité de masse ou l'uniformité de teneur des comprimés enrobés, autres que les comprimés pelliculés, peut être garantie par un contrôle effectué sur les noyaux.

ESSAI

**Désagrégation** (*2.9.1*). Les comprimés enrobés autres que les comprimés pelliculés satisfont à l'essai. Utilisez de l'*eau R* comme milieu liquide. Placez un disque dans chacun des tubes. Faites fonctionner l'appareil pendant 60 min, sauf exception justifiée et autorisée, puis examinez l'état des échantillons. Si tous les comprimés ne se sont pas désagrégés, répétez l'essai sur un autre échantillon de 6 comprimés, en remplaçant l'*eau R* par de l'*acide chlorhydrique 0,1 M.*

Les comprimés pelliculés satisfont à l'essai réalisé comme décrit ci-dessus, mais en faisant fonctionner l'appareil pendant 30 min, sauf exception justifiée et autorisée.

Si les comprimés enrobés ou les comprimés pelliculés ne satisfont pas à l'essai en raison de l'adhérence au disque, les résultats sont non valides. Répétez l'essai sur 6 autres comprimés en omettant les disques.

*Les comprimés à croquer ne sont pas tenus de satisfaire à l'essai.*

## Comprimés effervescents

DÉFINITION

Les comprimés effervescents sont des comprimés non enrobés contenant généralement des substances acides et des carbonates ou bicarbonates qui réagissent rapidement en présence d'eau en libérant du dioxyde de carbone. Ils sont destinés à être dissous ou dispersés dans l'eau avant administration.

ESSAI

**Désagrégation**. Placez 1 comprimé dans un vase à précipiter contenant 200 mL d'*eau R* à 15-25 °C ; de nombreuses bulles de gaz se dégagent. Lorsque l'émission de bulles autour du comprimé ou de ses fragments est terminée, le comprimé est désagrégé ; il est alors dissous ou dispersé dans l'eau et il ne subsiste plus aucun agglomérat de particules. Répétez l'opération sur 5 autres unités. Les comprimés satisfont à l'essai si chacune des 6 unités utilisées se désagrège en moins de 5 min dans les conditions indiquées ci-dessus, sauf exception justifiée et autorisée.

## Comprimés solubles

DÉFINITION

Les comprimés solubles sont des comprimés non enrobés ou des comprimés pelliculés. Ils sont destinés à être dissous dans de l'eau avant l'administration. La solution obtenue peut être légèrement opalescente en raison de la présence d'excipients ajoutés lors de la fabrication des comprimés.

ESSAI

**Désagrégation** (*2.9.1*). Les comprimés solubles se désagrègent en moins de 3 min, en utilisant comme milieu liquide de l'*eau R* à 15-25 °C.

## Comprimés dispersibles

DÉFINITION

Les comprimés dispersibles sont des comprimés non enrobés ou des comprimés pelliculés destinés à être dispersés dans de l'eau avant l'administration, en donnant une dispersion homogène.

ESSAI

**Désagrégation** (*2.9.1*). Les comprimés dispersibles se désagrègent en moins de 3 min, en utilisant comme milieu liquide de l'*eau R* à 15-25 °C.

**Finesse de la dispersion**. Placez 2 comprimés dans 100 mL d'*eau R* et agitez jusqu'à dispersion totale. La dispersion obtenue est homogène et traverse un tamis d'une ouverture de maille nominale de 710 µm.

## Comprimés orodispersibles

DÉFINITION

Les comprimés orodispersibles sont des comprimés non enrobés destinés à être placés dans la bouche où ils se dispersent rapidement avant d'être avalés.

ESSAI

**Désagrégation** (*2.9.1*). Les comprimés orodispersibles se désagrègent en moins de 3 min.

## Comprimés à libération modifiée

DÉFINITION

Les comprimés à libération modifiée sont des comprimés, enrobés ou non, qui sont préparés avec des excipients spéciaux, ou par des procédés particuliers, ou les deux, visant à modifier la vitesse, le lieu ou le moment de la libération de la ou des substances actives.

Les comprimés à libération modifiée comprennent les comprimés à libération prolongée, à libération retardée et à libération séquentielle.

PRODUCTION

Un essai approprié est réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante.

## Comprimés gastro-résistants

DÉFINITION

Les comprimés gastro-résistants sont des comprimés à libération modifiée destinés à résister au suc gastrique et à libérer la ou les substances actives dans le suc intestinal. Ils sont généralement préparés à partir de granulés ou de particules déjà recouverts d'un enrobage gastro-résistant, ou dans certains cas en recouvrant les comprimés d'une enveloppe gastro-résistante (comprimés entériques).

Les comprimés recouverts d'un enrobage gastro-résistant répondent à la définition des comprimés enrobés.

PRODUCTION

Dans le cas des comprimés préparés à partir de granulés ou de particules déjà recouverts d'un enrobage gastro-résistant, un essai approprié est réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante.

ESSAI

**Désagrégation** (*2.9.1*). Pour les comprimés à enrobage gastro-résistant, effectuez l'essai modifié de la façon suivante. Utilisez l'*acide chlorhydrique 0,1 M* comme milieu liquide. Faites fonctionner l'appareil pendant 2 h, sauf exception justifiée et autorisée, sans ajouter de disque. Examinez l'état des comprimés. La durée de résistance en milieu acide varie selon la formulation du comprimé à examiner. Elle est typiquement de 2 h à 3 h et n'est jamais inférieure à 1 h même compte tenu des dérogations autorisées. Aucun des comprimés ne présente de signes de désagrégation ou de craquelures pouvant amener une perte de matière, à l'exclusion du détachement éventuel de fragments de l'enrobage. Remplacez la solution acide par de la *solution tampon phosphate pH 6,8 R* et introduisez un disque dans chacun des tubes. Faites fonctionner l'appareil pendant 60 min, puis examinez l'état des échantillons. Si les comprimés ne satisfont pas à l'essai en raison de l'adhérence au disque, les résultats sont non valides. Répétez l'essai sur 6 autres comprimés en omettant les disques.

**Dissolution**. Dans le cas des comprimés préparés à partir de granulés ou de particules déjà recouverts d'un enrobage gastro-résistant, un essai approprié est réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante, par exemple l'essai décrit dans le chapitre *2.9.3. Essai de dissolution des formes solides*.

## Comprimés à utiliser dans la cavité buccale

DÉFINITION

Les comprimés à utiliser dans la cavité buccale sont le plus souvent des comprimés non enrobés. Leur formule est établie de façon à permettre une libération lente et une action locale de la ou des substances actives, ou la libération et l'absorption de la ou des substances actives dans une partie définie de la cavité buccale. Les comprimés à utiliser dans la cavité buccale satisfont aux exigences de la monographie *Préparations buccales (1807)*.

## Lyophilisats oraux

DÉFINITION

Les lyophilisats oraux sont des préparations solides destinées soit à être placées dans la bouche, soit à être dispersées (ou dissoutes) dans de l'eau avant administration.

PRODUCTION

Les lyophilisats oraux sont obtenus par cryodessiccation (lyophilisation). Ce procédé comprend des étapes de division en dosage unitaire, de congélation, de sublimation et de dessiccation de préparations généralement aqueuses, liquides ou semi-solides.

ESSAI

**Désagrégation**. Placez un lyophilisat oral dans un vase à précipiter contenant 200 mL d'*eau R* à 15-25 °C. Le lyophilisat oral se désagrège en moins de 3 min. Répétez l'essai sur 5 autres unités. Les lyophilisats oraux satisfont à l'essai si tous les 6 sont désagrégés.

**Eau** (*2.5.12*). Les lyophilisats oraux satisfont à l'essai ; les limites sont approuvées par l'Autorité compétente.

**01/2008:1228**

# DISPOSITIFS INTRARUMINAUX

## Praeparationes intraruminales

*Les spécifications de la présente monographie ne s'appliquent pas aux préparations (parfois appelées bols) telles que les capsules et comprimés conventionnels de grande taille, ou les formes pharmaceutiques moulées, qui assurent une libération immédiate ou prolongée de la ou des substances actives. Ces préparations sont couvertes par les sous-rubriques correspondantes des monographies Capsules (0016) ou Comprimés (0478).*

DÉFINITION

Les dispositifs intraruminaux sont des préparations solides contenant une ou plusieurs substances actives. Ils sont destinés à être administrés aux ruminants par voie orale et sont conçus pour être retenus dans le rumen, où la libération de la ou des substances actives s'effectue de façon continue ou séquentielle. La durée de libération de la ou des substances actives peut varier de quelques jours à plusieurs semaines selon la nature de la formulation et/ou du dispositif considéré.

Les dispositifs intraruminaux peuvent être administrés à l'aide de lance-bols. Certains sont conçus pour surnager à la surface du jus ruminal, d'autres pour rester sur le plancher du rumen ou du bonnet. Chaque dispositif possède une densité adaptée à l'usage auquel il est destiné.

PRODUCTION

Les dispositifs intraruminaux à libération continue sont conçus pour libérer la ou les substances actives à une vitesse définie et pendant une durée définie. Cette libération peut s'effectuer par érosion, corrosion, diffusion, pression osmotique ou tout autre processus chimique, physique ou physicochimique approprié.

Les dispositifs intraruminaux à libération séquentielle sont conçus pour libérer une quantité définie de la ou des substances actives à un ou plusieurs intervalles de temps définis. Cette libération peut s'effectuer par corrosion des éléments métalliques du dispositif sous l'action du jus ruminal ; il en résulte une libération séquentielle des unités constitutives, qui se présentent souvent sous forme de comprimés.

Lors de la fabrication des dispositifs intraruminaux, des mesures sont prises pour assurer une libération appropriée de la ou des substances actives.

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des dispositifs intraruminaux, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques* (*5.1.4*).

ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses**. Les comprimés unitaires constituant le dispositif intraruminal satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, aux essais d'uniformité de teneur et/ou d'uniformité de masse présentés ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf exception justifiée et autorisée, les comprimés unitaires constituant le dispositif intraruminal dont la teneur en substance active est inférieure à 2 mg ou représente moins de 2 pour cent de la masse totale satisfont à l'essai A d'uniformité de teneur des préparations unidoses. Si la préparation contient plusieurs substances actives, l'essai ne s'applique qu'à celles qui répondent aux conditions indiquées ci-dessus.

**Uniformité de masse** (*2.9.5*). Sauf exception justifiée et autorisée, les comprimés unitaires constituant le dispositif intraruminal satisfont à l'essai d'uniformité de masse. Lorsqu'un essai d'uniformité de teneur est prescrit pour toutes les substances actives, l'essai d'uniformité de masse n'est pas exigé.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- la dose libérée par unité de temps dans le cas des dispositifs à libération continue,
- la dose libérée aux intervalles de temps spécifiés dans le cas des dispositifs à libération séquentielle.

**01/2008:1011**

# DISPOSITIFS TRANSDERMIQUES

## Emplastra transcutanea

DÉFINITION

Les dispositifs transdermiques sont des préparations pharmaceutiques souples, de dimensions variables, qui servent de support à une ou plusieurs substances actives. Placés sur la peau non lésée, ils sont destinés à libérer et diffuser une ou plusieurs substances actives dans la circulation générale après passage de la barrière cutanée.

Les dispositifs transdermiques sont généralement constitués d'un support externe sur lequel est fixée une préparation contenant le(s) substance(s) active(s). La face de la préparation qui correspond à la surface de libération est recouverte d'un film protecteur, que l'on retire avant d'appliquer le dispositif sur la peau.

Le support externe est une membrane imperméable au(x) substance(s) active(s), et normalement imperméable à l'eau, qui reçoit et protège la préparation. Il peut être de mêmes dimensions que la préparation ou légèrement plus grand, auquel cas la partie périphérique qui dépasse est recouverte de substances auto-adhésives qui assurent la fixation du dispositif sur la peau.

La préparation contient le(s) substance(s) active(s) ainsi que divers adjuvants tels que stabilisants, solubilisants ou substances destinées à modifier la vitesse de libération ou à favoriser l'absorption transdermique. Elle peut être constituée d'une matrice solide ou semi-solide à une ou plusieurs couche(s), et dans ce cas c'est la composition et la structure de la matrice qui déterminent le mode de diffusion transdermique de la(des) substance(s) active(s). La matrice peut contenir des substances auto-adhésives qui assurent la fixation de la préparation sur la peau. La préparation peut également prendre la forme d'un réservoir semi-solide dont une des parois est une membrane qui

peut moduler la libération et la diffusion de la(des) substance(s) active(s). Les substances auto-adhésives peuvent dans ce cas être appliquées sur tout ou partie de la membrane, ou seulement sur la périphérie du support externe.

Appliqué sur une peau sèche, propre et non lésée, le dispositif transdermique adhère solidement sous l'effet d'une pression modérée des doigts ou de la main et peut être retiré sans lésion notable de la peau ni détachement de la préparation du support externe. Il ne doit avoir aucune action irritante ou sensibilisante sur la peau, même après des applications répétées.

Le film protecteur se compose en général d'une feuille de matière plastique ou d'un matériau métallique. Lorsqu'il est retiré, il n'entraîne avec lui ni la préparation (matrice ou réservoir) ni l'adhésif.

Les dispositifs transdermiques sont généralement conditionnés en sachets individuels scellés.

## PRODUCTION

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des dispositifs transdermiques, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques* (*5.1.4*).

## ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses**. Les dispositifs transdermiques satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, à l'essai d'uniformité de teneur présenté ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les dispositifs transdermiques satisfont à l'essai C d'uniformité de teneur des préparations unidoses.

**Dissolution**. Il peut être nécessaire d'effectuer un essai approprié pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante, par exemple l'un des essais décrits dans le texte *Essai de dissolution des dispositifs transdermiques* (*2.9.4*). Il est possible d'utiliser la méthode de l'appareil à disque, la méthode de la cellule ou la méthode du cylindre rotatif, selon la composition, les dimensions et la forme du dispositif à examiner.

Une membrane peut être employée. Elle peut être constituée de matériaux divers (par exemple cellulose poreuse inerte ou silicones). Elle ne doit pas influencer la cinétique de libération de la ou des substances actives par le dispositif. Elle doit en outre être exempte de toute substance susceptible de perturber sa fonction (graisse par exemple). Avant l'essai, elle peut être soumise à un conditionnement approprié (par exemple maintien pendant 24 h dans le milieu qui sera utilisé pour l'essai). Enfin, la membrane est appliquée sur la surface de libération du dispositif de façon à éviter la formation de bulles d'air.

Les conditions opératoires et les exigences correspondantes sont soumises à l'approbation de l'Autorité compétente.

## CONSERVATION

Sauf indication contraire, à température ambiante.

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique, dans les cas appropriés, la quantité totale de substance(s) active(s) par dispositif, la dose libérée par unité de temps et l'aire de la surface de libération.

**01/2008:1239**

# GOMMES À MÂCHER MÉDICAMENTEUSES

## Masticabilia gummis medicata

## DÉFINITION

Les gommes à mâcher médicamenteuses sont des préparations solides présentées en unité de prise dont l'excipient principal est une gomme, destinées à être mâchées, sans être avalées.

Elles contiennent une ou plusieurs substances actives dont la libération s'effectue lors de la mastication. Les gommes à mâcher sont destinées après dissolution ou dispersion de la ou des substance(s) active(s) dans la salive :

- soit au traitement local des affections buccales,
- soit à un traitement systémique après absorption à travers la muqueuse buccale ou gastro-intestinale.

## PRODUCTION

Les gommes à mâcher médicamenteuses sont constituées d'une gomme masticatoire insipide à base d'élastomères naturels ou synthétiques et peuvent contenir d'autres excipients non masticatoires tels que : charges, agents émollients, édulcorants, aromatisants, agents stabilisants et plastifiants, matières colorantes autorisées.

Les gommes à mâcher médicamenteuses sont fabriquées par compression ou par ramollissement ou fusion des excipients élastomères, puis addition successive des autres excipients. Dans ce dernier cas, les gommes à mâcher sont ensuite soumises à des traitements supplémentaires afin d'obtenir la présentation requise. Les gommes à mâcher médicamenteuses peuvent être enrobées, par exemple s'il est nécessaire de les mettre à l'abri de l'humidité et de la lumière.

Sauf exception justifiée et autorisée, un essai approprié est effectué pour démontrer que la libération de la (ou des) substance(s) active(s) est satisfaisante, par exemple selon la méthode *Essai de dissolution des gommes à mâcher médicamenteuses* (*2.9.25*).

Des mesures adéquates doivent être prises lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des gommes à mâcher médicamenteuses pour assurer leur qualité microbiologique ; des recommandations à cet effet sont données dans le chapitre général *Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques* (*5.1.4*).

## ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses**. Les gommes à mâcher médicamenteuses satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, aux essais d'uniformité de teneur et/ou d'uniformité de masse présentés ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les gommes à mâcher médicamenteuses dont la teneur en substance active est inférieure à 2 mg ou dans lesquelles la substance active représente moins de 2 pour cent de la masse totale satisfont à l'essai A d'uniformité de teneur des préparations unidoses. Si la préparation contient plusieurs substances actives, l'essai ne s'applique qu'à celles qui répondent aux conditions indiquées ci-dessus.

**Uniformité de masse** (*2.9.5*). Les gommes à mâcher médicamenteuses non enrobées et, sauf exception justifiée et autorisée, les gommes à mâcher médicamenteuses enrobées satisfont à l'essai d'uniformité de masse des préparations

Formes pharmaceutiques

unidoses. Lorsqu'un essai d'uniformité de teneur est prescrit pour toutes les substances actives, l'essai d'uniformité de masse n'est pas exigé.

CONSERVATION

A l'abri de l'humidité et de la lumière pour les gommes à mâcher non enrobées.

**01/2008:0499**

# GRANULÉS

## Granulata

*Les exigences relatives aux granulés destinés à la préparation des solutions ou suspensions orales figurent dans la monographie Préparations liquides pour usage oral (0672). Dans les cas justifiés et autorisés, les exigences de la présente monographie peuvent ne pas s'appliquer aux granulés pour usage vétérinaire.*

DÉFINITION

Les granulés sont des préparations constituées de grains solides secs, formant chacun un agrégat de particules de poudre d'une solidité suffisante pour permettre diverses manipulations.
Les granulés sont destinés à la voie orale. Certains granulés sont avalés tels quels, d'autres sont croqués ou dissous ou désagrégés dans de l'eau ou d'autres liquides appropriés avant administration.

Les granulés contiennent une ou plusieurs substances actives, additionnées ou non d'excipients et, si nécessaire, de colorants autorisés par l'Autorité compétente et d'aromatisants.

Les granulés se présentent soit sous forme de préparations unidoses, soit sous forme de préparations multidoses.
Chaque dose d'une préparation multidose est administrée au moyen d'un dispositif permettant de mesurer la quantité prescrite. Chaque dose de granulés conditionnés sous forme unitaire est présentée en récipient individuel, par exemple un sachet-dose ou un flacon.

Dans les cas appropriés, les récipients destinés aux granulés satisfont aux exigences relatives aux *Matériaux utilisés dans la fabrication des récipients* (*3.1* et sous-chapitres) et aux *Récipients* (*3.2* et sous-chapitres).

Plusieurs catégories de granulés peuvent être distinguées :

- les granulés effervescents,
- les granulés enrobés,
- les granulés gastrorésistants,
- les granulés à libération modifiée.

PRODUCTION

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des granulés, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques* (*5.1.4*).

ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses**. Les granulés conditionnés en récipients unidoses satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, aux essais d'uniformité de teneur et/ou d'uniformité de masse présentés ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les granulés conditionnés en récipients unidoses dont la teneur en substance active est inférieure à 2 mg ou dans lesquels la substance active représente moins de 2 pour cent de la masse totale satisfont à l'essai B d'uniformité de teneur des préparations unidoses. Si la préparation contient plusieurs substances actives, l'essai ne s'applique qu'à celles qui répondent aux conditions indiquées ci-dessus.

**Uniformité de masse** (*2.9.5*). Les granulés conditionnés en récipients unidoses autres que les granulés enrobés satisfont à l'essai d'uniformité de masse des préparations unidoses. Lorsqu'un essai d'uniformité de teneur est prescrit pour toutes les substances actives, l'essai d'uniformité de masse n'est pas exigé.

**Uniformité de masse de la dose délivrée par les récipients multidoses** (*2.9.27*). Les granulés conditionnés en récipients multidoses satisfont à l'essai.

CONSERVATION

En récipient étanche si la préparation contient des composants volatils ou si le contenu du récipient doit être protégé.

## Granulés effervescents

DÉFINITION

Les granulés effervescents sont des granulés non enrobés contenant généralement des substances acides et des carbonates ou bicarbonates qui réagissent rapidement en présence d'eau en libérant du dioxyde de carbone. Ils sont destinés à être dissous ou dispersés dans l'eau avant administration.

ESSAI

**Désagrégation**. Placez une dose de granulés effervescents dans un vase à précipiter contenant 200 mL d'*eau R* à 15-25 °C ; de nombreuses bulles de gaz se dégagent. Lorsque l'émission de bulles autour des grains individuels est terminée, les granulés sont désagrégés ; ils sont alors dissous ou dispersés dans l'eau. Répétez l'essai sur 5 autres doses. La préparation satisfait à l'essai si chacune des 6 doses se désagrège en moins de 5 min.

CONSERVATION

En récipient étanche.

## Granulés enrobés

DÉFINITION

Les granulés enrobés sont généralement des préparations multidoses constituées de grains enrobés d'une ou de plusieurs couches de mélanges d'excipients divers.

PRODUCTION

Les substances employées pour l'enrobage sont généralement appliquées sous forme de solution ou de suspension dans des conditions qui favorisent l'évaporation du solvant.

ESSAI

**Dissolution**. Un essai approprié peut être réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante, par exemple l'un des essais décrits dans le texte *Essai de dissolution des formes solides* (*2.9.3*).

## Granulés à libération modifiée

DÉFINITION

Les granulés à libération modifiée sont des granulés, enrobés ou non, qui sont préparés avec des excipients spéciaux, ou par des procédés particuliers, ou les 2, visant à modifier la vitesse, le lieu ou le moment de la libération de la ou des substances actives.

Les granulés à libération modifiée comprennent les granulés à libération prolongée et les granulés à libération retardée.

PRODUCTION

Un essai approprié est réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante.

ESSAI

**Dissolution**. Un essai approprié est réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante, par exemple l'essai décrit dans le texte *Essai de dissolution des formes solides* (*2.9.3*).

## Granulés gastrorésistants

DÉFINITION

Les granulés gastrorésistants sont des granulés à libération modifiée destinés à résister au suc gastrique et à libérer la ou les substances actives dans le suc intestinal. Ces propriétés sont obtenues en recouvrant les granulés d'un enrobage gastrorésistant (granulés entériques) ou par tout autre moyen approprié.

PRODUCTION

Un essai approprié est réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante.

ESSAI

**Dissolution**. Un essai approprié est réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante, par exemple l'essai décrit dans le texte *Essai de dissolution des formes solides* (*2.9.3*).

**01/2008:1105**

# MOUSSES MÉDICAMENTEUSES

## Musci medicati

*Des exigences supplémentaires concernant les mousses médicamenteuses peuvent le cas échéant figurer dans d'autres monographies générales, par exemple les monographies Préparations rectales (1145), Préparations vaginales (1164) et Préparations liquides pour application cutanée (0927).*

DÉFINITION

Les mousses médicamenteuses sont des préparations constituées par la dispersion d'un volume important de gaz dans une préparation liquide contenant généralement une ou plusieurs substances actives, un agent tensioactif assurant leur formation, et divers autres excipients. Les mousses médicamenteuses sont le plus souvent destinées à être appliquées sur la peau ou les muqueuses.

Les mousses médicamenteuses sont généralement formées au moment de l'administration, à partir d'une préparation liquide contenue dans un récipient pressurisé. Le récipient est muni d'un dispositif constitué d'une valve et d'un bouton-poussoir adaptés à la distribution de la mousse.

Les mousses médicamenteuses destinées à être appliquées sur des plaies ouvertes importantes ou sur une peau gravement atteinte sont stériles.

Les mousses médicamenteuses conditionnées en récipients pressurisés satisfont aux exigences de la monographie *Préparations pharmaceutiques pressurisées (0523)*.

PRODUCTION

Les mousses médicamenteuses stériles sont préparées à partir de produits et par des méthodes propres à assurer leur stérilité et à empêcher l'introduction de contaminants et la croissance de microorganismes ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Méthodes de préparation des produits stériles* (*5.1.1*).

ESSAI

**Densité de la mousse**. Maintenez le récipient à une température de 25 °C pendant au moins 24 h. En évitant de réchauffer le récipient, adaptez au bouton-poussoir un tube rigide d'une longueur de 70 mm à 100 mm et d'un diamètre intérieur de 1 mm environ, agitez le récipient pour homogénéiser la phase liquide et expulsez à perte 5 mL à 10 mL de mousse. Tarez un cristallisoir à fond plat d'un volume de 60 mL environ et d'une hauteur de 35 mm environ. Placez l'extrémité du tube rigide dans l'angle du fond du cristallisoir et, pour le remplir uniformément, appuyez sur le bouton-poussoir en effectuant un mouvement circulaire. Après expansion totale de la mousse, arasez en découpant l'excédent à l'aide d'une lame. Pesez. Déterminez la masse du même volume d'*eau R* en remplissant d'*eau R* le même cristallisoir.

La densité de la mousse est égale au rapport :

$$\frac{m}{e}$$

$m$ = masse de la prise d'essai de mousse, en grammes,

$e$ = masse du même volume d'*eau R*, en grammes.

Effectuez 3 mesures. Aucune des valeurs individuelles ne s'écarte de plus de 20 pour cent de la valeur moyenne.

**Durée d'expansion**. L'appareil (figure 1105.-1) est constitué par une burette de 50 mL, d'un diamètre intérieur de 15 mm, graduée de 0,1 mL en 0,1 mL et munie d'un robinet à une voie de 4 mm. La graduation correspondant à 30 mL se trouve à 210 mm au moins de l'axe du robinet. La partie inférieure de la burette est raccordée, par l'intermédiaire d'un tube en matière plastique d'une longueur maximale de 50 mm et d'un diamètre intérieur de 4 mm, au récipient générateur de mousse muni d'un bouton-poussoir adapté à ce raccordement. Maintenez le récipient à une température de 25 °C pendant au moins 24 h. En évitant de le réchauffer, agitez le récipient pour homogénéiser la phase liquide et expulsez à perte 5 mL à 10 mL de mousse. Raccordez le bouton-poussoir à la sortie de la burette. Appuyez sur le bouton-poussoir et introduisez, en une seule fois, une quantité de mousse voisine de 30 mL. Fermez le robinet, déclenchez simultanément le chronomètre et lisez le volume de mousse contenu dans la burette. Lisez ensuite toutes les 10 s le volume qui croît jusqu'au volume maximal.

Effectuez 3 mesures. Aucune des durées nécessaires pour obtenir le volume maximal n'est supérieure à 5 min.

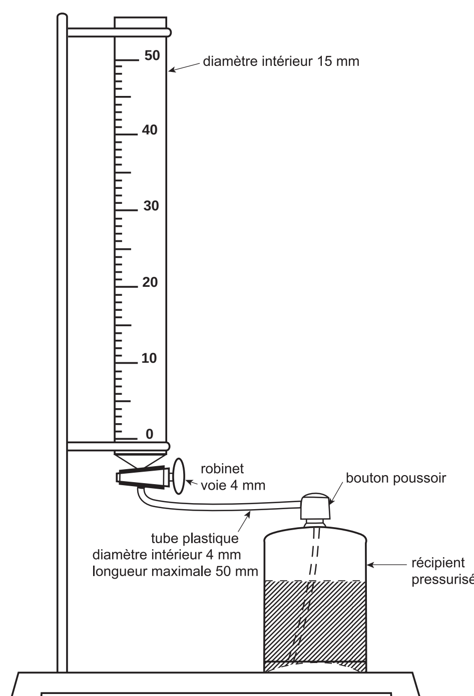



Figure 1105.-1. – *Appareil pour la détermination de la durée d'expansion*

**Stérilité** (*2.6.1*). Lorsque l'étiquette indique que la préparation est stérile, celle-ci satisfait à l'essai de stérilité.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique, dans les cas appropriés, que la préparation est stérile.

**01/2008:1165**

# POUDRES ORALES

## Pulveres perorales

*Les exigences relatives aux poudres destinées à la préparation de solutions ou suspensions orales figurent dans la monographie Préparations liquides pour usage oral (0672). Dans certains cas justifiés et autorisés, les exigences de la présente monographie peuvent ne pas s'appliquer aux poudres orales pour usage vétérinaire.*

DÉFINITION

Les poudres orales sont des préparations constituées de particules solides sèches, libres et plus ou moins fines. Elles contiennent une ou plusieurs substances actives additionnées ou non d'excipients et, si nécessaire, de colorants autorisés par l'Autorité compétente et d'aromatisants. Elles sont généralement administrées dans ou avec de l'eau ou un autre liquide approprié. Dans certains cas, elles peuvent être avalées telles quelles. Elles se présentent soit sous forme de préparations unidoses, soit sous forme de préparations multidoses.

Dans les cas appropriés, les récipients destinés aux poudres orales satisfont aux exigences relatives aux *Matériaux utilisés dans la fabrication des récipients* (*3.1* et sous-chapitres) et aux *Récipients* (*3.2* et sous-chapitres).

Les poudres orales multidoses nécessitent l'emploi d'une mesure permettant de délivrer la quantité prescrite. Chaque dose des poudres orales unidoses est présentée en récipient individuel, par exemple un sachet-dose ou un flacon.

PRODUCTION

Lors de la fabrication des poudres orales, des mesures sont prises pour assurer que la taille des particules est appropriée à l'usage prévu de la préparation.

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des poudres orales, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques* (*5.1.4*).

ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses**. Les poudres orales unidoses satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, aux essais d'uniformité de teneur et/ou d'uniformité de masse présentés ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les poudres orales unidoses dont la teneur en substance active est inférieure à 2 mg ou dans lesquelles la substance active représente moins de 2 pour cent de la masse totale satisfont à l'essai B d'uniformité de teneur des préparations unidoses. Si la préparation contient plusieurs substances actives, l'essai ne s'applique qu'à celles qui répondent aux conditions indiquées ci-dessus.

**Uniformité de masse** (*2.9.5*). Les poudres orales unidoses satisfont à l'essai d'uniformité de masse des préparations unidoses. Lorsqu'un essai d'uniformité de teneur est prescrit pour toutes les substances actives, l'essai d'uniformité de masse n'est pas exigé.

**Uniformité de masse de la dose délivrée par les récipients multidoses** (*2.9.27*). Les poudres orales conditionnées en récipients multidoses satisfont à l'essai.

CONSERVATION

En récipient étanche si la préparation contient des composants volatils ou si le contenu du récipient doit être protégé.

## Poudres effervescentes

Les poudres effervescentes se présentent soit sous forme de préparations unidoses soit sous forme de préparations multidoses et contiennent généralement des substances acides et des carbonates ou bicarbonates qui réagissent rapidement en présence d'eau en libérant du dioxyde de carbone. Elles sont destinées à être dissoutes ou dispersées dans l'eau avant administration.

CONSERVATION

En récipient étanche.

**01/2009:1166**

# POUDRES POUR APPLICATION CUTANÉE

## Pulveres ad usum dermicum

*Dans certains cas justifiés et autorisés, les exigences de la présente monographie peuvent ne pas s'appliquer aux poudres pour usage vétérinaire.*

DÉFINITION

Les poudres pour application cutanée sont des préparations constituées de particules solides sèches, libres et plus ou moins fines. Elles contiennent une ou plusieurs substances actives additionnées ou non d'excipients et, si nécessaire, de colorants autorisés par l'Autorité compétente.

Les poudres pour application cutanée se présentent sous forme de poudres unidoses ou de poudres multidoses. Elles sont exemptes d'agglomérats palpables. Les poudres spécifiquement destinées à être appliquées sur des plaies ouvertes importantes ou sur une peau gravement atteinte sont stériles.

Les poudres pour application cutanée présentées sous forme de poudres multidoses peuvent être conditionnées en récipients saupoudreurs, en récipients munis d'un dispositif mécanique de pulvérisation ou en récipients sous pression.

Les poudres conditionnées en récipients sous pression satisfont aux exigences de la monographie *Préparations pharmaceutiques pressurisées (0523)*.

Dans les cas appropriés, les récipients destinés aux poudres pour application cutanée satisfont aux exigences relatives aux *Matériaux utilisés dans la fabrication des récipients* (*3.1* et sous-chapitres) et aux *Récipients* (*3.2* et sous-chapitres).

PRODUCTION

Lors de la fabrication des poudres pour application cutanée, des mesures sont prises pour assurer que la taille des particules est appropriée à l'usage prévu de la préparation.

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des poudres pour application cutanée, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques* (*5.1.4*).

Les poudres pour application cutanée stériles sont préparées à partir de produits et par des méthodes propres à assurer leur stérilité et à empêcher l'introduction de contaminants et la croissance de microorganismes ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Méthodes de préparation des produits stériles* (*5.1.1*).

ESSAI

**Granulométrie**. Lorsque la finesse d'une poudre pour application cutanée est prescrite, elle est déterminée par tamisage (*2.9.35*) ou par une autre méthode appropriée.

**Uniformité des préparations unidoses**. Les poudres pour application cutanée unidoses satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, aux essais d'uniformité de teneur et/ou d'uniformité de masse présentés ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les poudres pour application cutanée unidoses dont la teneur en substance active est inférieure à 2 mg ou dans lesquelles la substance active représente moins de 2 pour cent de la masse totale satisfont à l'essai B d'uniformité de teneur des préparations unidoses. Si la préparation contient plusieurs substances actives, l'essai ne s'applique qu'à celles qui répondent aux conditions indiquées ci-dessus.

**Uniformité de masse** (*2.9.5*). Les poudres pour application cutanée unidoses satisfont à l'essai d'uniformité de masse des préparations unidoses. Lorsqu'un essai d'uniformité de teneur est prescrit pour toutes les substances actives, l'essai d'uniformité de masse n'est pas exigé.

**Stérilité** (*2.6.1*). Lorsque l'étiquette indique que la poudre est stérile, celle-ci satisfait à l'essai de stérilité.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– que la préparation est destinée à un usage externe,
– dans les cas appropriés, que la préparation est stérile.

**07/2010:1037**

## PRÉMÉLANGES POUR ALIMENTS MÉDICAMENTEUX POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

### Praeadmixta ad alimenta medicata ad usum veterinarium

DÉFINITION

Mélanges d'une ou de plusieurs substances actives, généralement dans des excipients appropriés, destinés à faciliter l'administration à des animaux par voie alimentaire. Ils sont exclusivement utilisés dans la préparation d'aliments médicamenteux.

Les prémélanges se présentent sous forme de granulés ou de poudres, sous une forme semi-solide ou liquide. Dans le cas de granulés ou de poudres, ils s'écoulent librement, sont homogènes et les agglomérats éventuels se désagrègent spontanément lors d'une manipulation normale. Dans le cas de liquides, il s'agit de suspensions homogènes ou de solutions pouvant être obtenues à partir de suspensions thixotropes ou de liquides structurés. La taille des particules et les autres propriétés déterminent la répartition homogène de la (ou des) substance(s) active(s) dans l'aliment final. Sauf exception justifiée et autorisée, les instructions d'utilisation indiquent que la concentration du prémélange, présenté sous forme de granulés ou de poudres, dans l'aliment médicamenteux, est au minimum de 0,5 pour cent.

PRODUCTION

**Substance active**. Sauf exception déjà justifiée et autorisée pour des prémélanges existants, toute substance active destinée à être incorporée dans un prémélange médicamenteux :

– satisfait aux exigences de la monographie correspondante de la Pharmacopée Européenne,
– dans le cas d'un produit de fermentation ne faisant pas l'objet d'une monographie de la Pharmacopée Européenne, satisfait à la monographie *Produits de fermentation (1468)*, et en particulier à la section Traitements post-fermentation.

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : sauf exception justifiée et autorisée, dans le cas de prémélanges présentés sous forme de granulés ou de poudres, au maximum 15,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 3,000 g de préparation à examiner.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– la catégorie d'animaux à laquelle le prémélange est destiné,
– le mode de préparation de l'aliment médicamenteux à partir du prémélange et de l'aliment de base,
– dans les cas appropriés, le délai à respecter entre l'arrêt de l'administration de l'aliment médicamenteux et la collecte des produits destinés à la consommation humaine.

**01/2008:0652**

## PRÉPARATIONS AURICULAIRES

### Auricularia

DÉFINITION

Les préparations auriculaires sont des préparations liquides, semi-solides ou solides destinées à l'instillation, la pulvérisation, l'insufflation ou l'application dans le conduit auditif ou au lavage auriculaire.

Les préparations auriculaires contiennent habituellement 1 ou plusieurs substances actives dans un excipient approprié. Elles peuvent contenir également d'autres excipients destinés par exemple à ajuster le pouvoir osmotique ou la viscosité, ajuster ou stabiliser le pH, accroître la solubilité des substances actives, stabiliser la préparation ou assurer des propriétés antimicrobiennes appropriées. Ces excipients ne nuisent pas à l'action médicamenteuse recherchée et, aux concentrations utilisées, ne provoquent pas d'effets toxiques ou d'irritation locale notable.

Les préparations auriculaires destinées à être appliquées à une oreille lésée, particulièrement en cas de perforation du tympan, ou avant une intervention chirurgicale, sont stériles, exemptes de conservateurs antimicrobiens, et conditionnées en récipients unidoses.

Les préparations auriculaires sont conditionnées en récipients multidoses ou unidoses, éventuellement munis d'un dispositif d'administration approprié qui peut être conçu pour empêcher la pénétration de tout agent de contamination.

Sauf exception justifiée et autorisée, les préparations auriculaires aqueuses conditionnées en récipients multidoses contiennent un conservateur antimicrobien approprié à concentration convenable, sauf si la préparation elle-même possède des propriétés antimicrobiennes adéquates.

Dans les cas appropriés, les récipients destinés aux préparations auriculaires satisfont aux exigences relatives aux *Matériaux utilisés dans la fabrication des récipients* (*3.1* et sous-chapitres) et aux *Récipients* (*3.2* et sous-chapitres).

Plusieurs catégories de préparations auriculaires peuvent être distinguées :

– les liquides pour instillation ou pulvérisation auriculaire,
– les préparations auriculaires semi-solides,
– les poudres auriculaires,
– les liquides pour lavage auriculaire,
– les tampons auriculaires.

PRODUCTION

Au cours du développement des préparations auriculaires dont la formulation comporte un conservateur antimicrobien, la nécessité et l'efficacité du conservateur choisi doit être démontrée de manière à satisfaire l'Autorité compétente. Le texte *Efficacité de la conservation antimicrobienne* (*5.1.3*) décrit une méthode d'essai appropriée et indique des critères d'évaluation des propriétés antimicrobiennes de la formulation.

Au cours du développement des préparations liquides pour lavage auriculaire, il doit être démontré qu'il est possible de prélever le contenu nominal du récipient des préparations présentées en récipients unidoses.

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des préparations auriculaires, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques* (*5.1.4*).

Les préparations auriculaires stériles sont préparées à partir de produits et par des méthodes propres à assurer leur stérilité et à empêcher l'introduction de contaminants et la croissance de microorganismes ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Méthodes de préparation des produits stériles* (*5.1.1*).

Lors de la fabrication des préparations auriculaires contenant des particules en dispersion, des mesures sont prises pour assurer que la taille des particules est convenablement contrôlée et qu'elle est appropriée à l'usage prévu de la préparation.

ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses**. Les préparations auriculaires unidoses satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, aux essais d'uniformité de teneur et/ou d'uniformité de masse présentés ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les préparations auriculaires unidoses dont la teneur en substance active est inférieure à 2 mg ou dans lesquelles la substance active représente moins de 2 pour cent de la masse totale satisfont à l'essai B d'uniformité de teneur des préparations unidoses. Si la préparation contient plusieurs substances actives, l'essai ne s'applique qu'à celles qui répondent aux conditions indiquées ci-dessus.

**Uniformité de masse** (*2.9.5*). Les préparations auriculaires unidoses satisfont à l'essai d'uniformité de masse des préparations unidoses. Lorsqu'un essai d'uniformité de teneur est prescrit pour toutes les substances actives, l'essai d'uniformité de masse n'est pas exigé.

**Stérilité** (*2.6.1*). Lorsque l'étiquette indique que la préparation est stérile, celle-ci satisfait à l'essai de stérilité.

CONSERVATION

Si la préparation est stérile, elle est conservée en récipient stérile, étanche, à fermeture inviolable.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nom de tout conservateur antimicrobien ajouté,

– dans les cas appropriés, que la préparation est stérile,

– dans le cas des récipients multidoses, la durée limite d'utilisation à partir de l'ouverture du récipient. Sauf exception justifiée et autorisée, cette durée ne dépasse pas 4 semaines.

## Préparations liquides pour instillation ou pulvérisation auriculaire

DÉFINITION

Les préparations liquides pour instillation ou pulvérisation auriculaire sont des solutions, des émulsions ou des suspensions d'une ou plusieurs substances actives dans des liquides appropriés pouvant être appliqués dans le conduit auditif sans exercer de pression nuisible pour le tympan (par exemple de l'eau, des glycols ou des huiles grasses). Ces préparations peuvent également être appliquées dans le conduit auditif au moyen d'un tampon imbibé du liquide.

Les émulsions peuvent présenter des signes de séparation des phases, mais sont facilement redispersées par agitation. Les suspensions peuvent présenter un sédiment, qu'il est facile de disperser par agitation de façon à obtenir une suspension suffisamment stable pour permettre l'administration de la dose voulue.

Les préparations liquides pour instillation auriculaire sont habituellement conditionnées en récipients multidoses en verre ou en matière plastique appropriée munis soit d'un compte-gouttes incorporé soit d'un capuchon vissé constitué de matériaux appropriés et comportant un compte-gouttes et un embout en caoutchouc ou en plastique. Ce capuchon vissé peut également être fourni séparément.
Les préparations liquides pour pulvérisation auriculaire sont habituellement conditionnées en récipients multidoses munis d'un système de distribution approprié ; lorsqu'elles sont conditionnées en récipients pressurisés, celles-ci satisfont aux exigences de la monographie *Préparations pharmaceutiques pressurisées (0523).*

## Préparations auriculaires semi-solides

DÉFINITION

Les préparations auriculaires semi-solides sont destinées à l'application dans le conduit auditif externe, si nécessaire au moyen d'un tampon imprégné de la préparation.

Les préparations auriculaires semi-solides satisfont aux exigences de la monographie *Préparations semi-solides pour application cutanée (0132).*

Elles sont conditionnées en récipients munis d'un dispositif de distribution approprié.

## Poudres auriculaires

DÉFINITION

Les poudres auriculaires satisfont aux exigences de la monographie *Poudres pour application cutanée (1166).*

Les poudres auriculaires sont conditionnées en récipients munis d'un dispositif approprié permettant l'application ou l'insufflation.

## Préparations liquides pour lavage auriculaire

DÉFINITION

Les préparations liquides pour lavage auriculaire sont destinées au nettoyage du conduit auditif externe. Ce sont en général des solutions aqueuses de pH compris dans les limites physiologiques.

Les préparations liquides pour lavage auriculaire destinées à être appliquées sur une partie lésée ou à être utilisées avant une intervention chirurgicale sont stériles.

## Tampons auriculaires

DÉFINITION

Les tampons auriculaires sont destinés à être introduits dans le conduit auditif externe. Ils satisfont aux exigences de la monographie *Tampons médicamenteux (1155).*

**01/2008:1807**

# PRÉPARATIONS BUCCALES

## Praeparationes buccales

*Cette monographie ne s'applique pas aux préparations dentaires, ni aux préparations telles que les comprimés à croquer (0478), les gommes à mâcher médicamenteuses (1239), les lyophilisats oraux ou autres préparations solides ou semi-solides destinées à être croquées ou dispersées dans la salive avant d'être avalées. Dans les cas justifiés et autorisés, cette monographie peut ne pas s'appliquer aux préparations pour usage vétérinaire.*

DÉFINITION

Les préparations buccales sont des préparations liquides, semi-solides ou solides contenant une ou plusieurs substances actives destinées à être administrées dans la cavité buccale et/ou la gorge en vue d'une action locale ou systémique. Les préparations destinées à une action locale peuvent être conçues pour être appliquées en un site spécifique de la cavité buccale tel que la gencive (préparations gingivales) ou dans la gorge (préparations oropharyngées). Les préparations destinées à une action systémique sont conçues pour être principalement absorbées en un ou plusieurs sites de la muqueuse buccale (par exemple : préparations sublinguales). Les préparations muco-adhésives sont destinées à être maintenues dans la cavité buccale par adhérence à l'épithélium de la muqueuse ; elles peuvent modifier l'absorption systémique du médicament. De nombreuses préparations buccales peuvent permettre le passage et l'absorption dans le tractus gastro-intestinal d'une certaine proportion de la (des) substance(s) active(s).

Les préparations buccales peuvent contenir des conservateurs antimicrobiens appropriés et d'autres excipients tels que des agents de dispersion ou de suspension, des substances épaississantes ou émulsionnantes, des tampons, des mouillants, des solubilisants, des stabilisants, des aromatisants, des édulcorants. Les préparations solides peuvent en outre contenir des agents glissants ou des lubrifiants et des excipients capables de modifier la libération de la (des) substance(s) active(s).

Dans les cas appropriés, les récipients destinés aux préparations buccales satisfont aux exigences relatives aux *Matériaux utilisés dans la fabrication des récipients* (*3.1* et *sous-chapitres*) et aux *Récipients* (*3.2* et *sous-chapitres*).

Plusieurs catégories de préparations buccales peuvent être distinguées :

– les solutions pour gargarisme,
– les solutions pour bains de bouche,
– les solutions gingivales,
– les solutions buccales et suspensions buccales,
– les préparations buccales semi-solides (notamment : gels gingivaux, pâtes gingivales, gels buccaux, pâtes buccales),
– les préparations liquides pour instillation buccale, pulvérisation buccale ou pulvérisation sublinguale (y compris les préparations liquides pour pulvérisation oropharyngienne),
– les pastilles et les pâtes à sucer,
– les comprimés à sucer,
– les comprimés sublinguaux et comprimés gingivaux,
– les capsules buccales,
– les préparations muco-adhésives.

PRODUCTION

Au cours du développement des préparations buccales contenant un conservateur antimicrobien, l'efficacité du conservateur choisi doit être démontrée de manière à satisfaire l'Autorité compétente. Le chapitre *5.1.3. Efficacité de la conservation antimicrobienne* décrit une méthode d'essai appropriée et indique des critères d'évaluation des propriétés antimicrobiennes de la formulation.

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des préparations buccales, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques* (*5.1.4*).

Lors de la fabrication des préparations buccales liquides et semi-solides contenant des particules en dispersion, des mesures sont prises pour assurer que la taille des particules est convenablement contrôlée et qu'elle est appropriée à l'usage prévu de la préparation.

ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses**. Les préparations buccales unidoses satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, à l'essai d'uniformité de teneur et/ou l'essai d'uniformité de masse présentés ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les préparations buccales unidoses dont la teneur en substance active est inférieure à 2 mg ou représente moins de 2 pour cent de la masse totale satisfont aux essais A (formes comprimées et moulées) ou B (capsules) d'uniformité de teneur des préparations unidoses. Si la préparation contient plusieurs substances actives, l'essai ne s'applique qu'à celles qui répondent aux conditions indiquées ci-dessus.

**Uniformité de masse** (*2.9.5*). Les préparations unidoses solides satisfont à l'essai d'uniformité de masse. Lorsqu'un essai d'uniformité de teneur est prescrit, ou justifié et autorisé, pour toutes les substances actives, l'essai d'uniformité de masse n'est pas exigé.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique le nom de tout conservateur antimicrobien ajouté.

## Solutions pour gargarisme

DÉFINITION

Les solutions pour gargarisme sont des solutions aqueuses à utiliser en gargarisme en vue d'une action locale. Elles ne doivent pas être avalées. Elles se présentent sous forme de solutions prêtes à l'emploi ou de solutions à diluer. Elles peuvent également être obtenues à partir de poudres ou de comprimés à dissoudre dans l'eau avant emploi.

Les solutions pour gargarisme peuvent contenir des excipients destinés à ajuster le pH qui est, autant que possible, neutre.

## Solutions pour bains de bouche

DÉFINITION

Les solutions pour bains de bouche sont des solutions aqueuses destinées à être mises au contact de la muqueuse buccale. Elles ne doivent pas être avalées. Elles se présentent sous forme de solutions prêtes à l'emploi ou de solutions à diluer. Elles peuvent également être obtenues à partir de poudres ou de comprimés à dissoudre dans l'eau avant emploi.

Les solutions pour bains de bouche peuvent contenir des excipients destinés à ajuster le pH qui est, autant que possible, neutre.

## Solutions gingivales

DÉFINITION

Les solutions gingivales sont destinées à être appliquées sur la gencive au moyen d'un applicateur approprié.

## Solutions buccales et suspensions buccales

DÉFINITION

Les solutions buccales et les suspensions buccales sont des préparations liquides destinées à être appliquées dans la cavité buccale au moyen d'un applicateur approprié.

Les suspensions buccales peuvent présenter un sédiment, qu'il est facile de disperser par agitation de façon à obtenir une suspension suffisamment stable pour permettre l'administration de la dose voulue.

## Préparations buccales semi-solides

DÉFINITION

Les préparations buccales semi-solides sont des gels ou pâtes hydrophiles destinés à être administrés dans la cavité buccale ou en un site spécifique de la cavité buccale, par exemple la gencive (gels gingivaux, pâtes gingivales). Elles peuvent se présenter sous forme de préparations unidoses.

Les préparations buccales semi-solides satisfont aux exigences de la monographie *Préparations semi-solides pour application cutanée (0132)*.

## Préparations liquides pour instillation buccale, pulvérisation buccale ou pulvérisation sublinguale

Formes pharmaceutiques

DÉFINITION

Les préparations liquides pour instillation buccale, pulvérisation buccale ou pulvérisation sublinguale sont des solutions, émulsions ou suspensions destinées à exercer une action locale ou systémique. Elles sont administrées par instillation ou pulvérisation dans la cavité buccale ou en un site spécifique de la cavité buccale, par exemple par pulvérisation sous la langue (pulvérisation sublinguale) ou dans la gorge (pulvérisation oropharyngienne).

Les émulsions peuvent présenter des signes de séparation des phases mais sont facilement redispersées par agitation. Les suspensions peuvent présenter un sédiment, qu'il est facile de disperser par agitation de façon à obtenir une suspension suffisamment stable pour permettre l'administration de la dose voulue.

Les préparations liquides pour pulvérisation buccale sont conditionnées en récipients avec nébuliseur ou en récipients pressurisés munis d'un système d'administration approprié, avec ou sans valve doseuse, satisfaisant aux exigences de la monographie *Préparations pharmaceutiques pressurisées (0523)*.

La taille des gouttelettes pulvérisées est telle que leur dépôt se localise dans la cavité buccale ou dans la gorge, selon le cas.

ESSAI

Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les préparations liquides pour instillation buccale présentées en récipients unidoses et les doses unitaires des préparations liquides pour pulvérisation buccale ou sublinguale présentées en récipients doseurs, destinées à une action systémique, satisfont aux essais suivants.

*PRÉPARATIONS LIQUIDES POUR INSTILLATION BUCCALE EN RÉCIPIENTS UNIDOSES*

**Uniformité des préparations unidoses**. Les préparations liquides pour instillation buccale en récipients unidoses satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, à l'essai d'uniformité de masse ou l'essai d'uniformité de teneur présentés ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de masse**. *Les solutions pour instillation buccale satisfont à l'essai suivant.* Pesez individuellement le contenu de 10 récipients, vidés aussi complètement que possible, et déterminez la masse moyenne. Au maximum 2 des masses individuelles peuvent s'écarter de la masse moyenne de plus de 10 pour cent, et aucune ne s'en écarte de plus de 20 pour cent.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). *Les suspensions et les émulsions pour instillation buccale satisfont à l'essai suivant.* Videz chaque récipient aussi complètement que possible et effectuez séparément l'essai sur le contenu de chacun d'eux. Celui-ci satisfait à l'essai B d'uniformité de teneur.

*PRÉPARATIONS LIQUIDES POUR PULVÉRISATION BUCCALE OU SUBLINGUALE EN RÉCIPIENTS DOSEURS*

**Uniformité des préparations unidoses**. Les préparations liquides pour pulvérisation buccale ou sublinguale en récipients doseurs satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, à l'essai d'uniformité de masse ou l'essai d'uniformité de la dose délivrée présentés ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

*Dans le cas de solutions pour pulvérisation buccale ou sublinguale en récipients doseurs, procédez de la façon suivante.* Actionnez 1 fois à perte. Attendez au minimum 5 s, puis agitez pendant 5 s et actionnez encore 1 fois à perte. Répétez l'opération encore 3 fois. Pesez le récipient, actionnez 1 fois à perte et pesez à nouveau le récipient. Calculez la différence entre les 2 masses obtenues. Opérez de même avec 9 autres récipients. Déterminez la variation de masse (*2.9.40*).

*Dans le cas de suspensions et d'émulsions pour pulvérisation buccale ou sublinguale en récipients doseurs, procédez de la façon suivante.* Utilisez un appareillage permettant de recueillir quantitativement la dose libérée par le diffuseur. Agitez un récipient pendant 5 s et actionnez 1 fois à perte. Attendez au minimum 5 s, puis agitez pendant 5 s et actionnez à nouveau 1 fois à perte. Répétez l'opération encore 3 fois. Au bout de 2 s, déchargez une dose de la préparation dans un récipient de collecte, en actionnant le diffuseur. Recueillez le contenu du récipient de collecte par plusieurs rinçages successifs. Déterminez la teneur en substance active du mélange des produits de rinçage. Opérez de même avec 9 autres récipients. Déterminez l'uniformité de teneur (*2.9.40*).

**Uniformité de masse**. *Les solutions pour pulvérisation buccale ou sublinguale en récipients doseurs satisfont à l'essai suivant.* Actionnez 1 fois à perte. Attendez au minimum 5 s, puis agitez pendant 5 s et actionnez à nouveau 1 fois à perte. Répétez l'opération encore 3 fois. Pesez le récipient, actionnez 1 fois à perte et pesez à nouveau le récipient. Calculez la différence entre les 2 masses obtenues. Opérez de même avec 9 autres récipients.

La préparation satisfait à l'essai si au maximum 2 des valeurs obtenues s'écartent de la moyenne de plus de 25 pour cent et si aucune ne s'en écarte de plus de 35 pour cent.

**Uniformité de la dose délivrée**. *Les suspensions et les émulsions pour pulvérisation buccale ou sublinguale en récipients doseurs satisfont à l'essai suivant. Utilisez un appareillage permettant de recueillir quantitativement la dose libérée par le diffuseur.*

Agitez un récipient pendant 5 s et actionnez 1 fois à perte. Attendez au minimum 5 s, puis agitez pendant 5 s et actionnez à nouveau 1 fois à perte. Répétez l'opération encore 3 fois. Au bout de 2 s, déchargez une dose de la préparation dans un récipient de collecte, en actionnant le diffuseur. Recueillez le contenu du récipient de collecte par plusieurs rinçages successifs. Déterminez la teneur en substance active du

mélange des produits de rinçage. Opérez de même avec 9 autres récipients.

Sauf exception justifiée et autorisée, la préparation satisfait à l'essai si la teneur individuelle d'au maximum 1 unité se situe en dehors des limites de 75 pour cent à 125 pour cent de la teneur moyenne et si aucune des teneurs ne se situe en dehors des limites de 65 pour cent à 135 pour cent de la teneur moyenne.

Si les teneurs individuelles de 2 ou d'au maximum 3 unités se situent en dehors des limites de 75 pour cent à 125 pour cent de la teneur moyenne et si aucune teneur individuelle ne se situe en dehors des limites de 65 pour cent à 135 pour cent de la teneur moyenne, répétez l'essai sur 20 autres récipients. La préparation satisfait à l'essai si les teneurs individuelles d'au maximum 3 unités dans les 30 unités se situent en dehors des limites de 75 pour cent à 125 pour cent de la teneur moyenne et si aucune d'entre elles ne se situe en dehors des limites de 65 pour cent à 135 pour cent de la teneur moyenne.

## Pastilles et pâtes à sucer

DÉFINITION

Les pastilles et les pâtes à sucer sont des préparations unidoses solides destinées à être sucées et à se dissoudre ou se désagréger lentement dans la bouche afin d'exercer généralement une action locale dans la cavité buccale et la gorge. Elles contiennent une ou plusieurs substances actives, habituellement dans un excipient aromatisé et sucré.

Les pastilles sont des préparations dures obtenues par moulage. Les pâtes à sucer sont des préparations molles et malléables obtenues par moulage de mélanges contenant des gommes ou polymères naturels ou synthétiques et des édulcorants.

## Comprimés à sucer

DÉFINITION

Les comprimés à sucer sont des préparations unidoses solides destinées à être sucées afin d'exercer une action locale ou systémique. Ils sont obtenus par compression et sont souvent de forme rhomboïdale.

Les comprimés à sucer satisfont à la définition générale des comprimés.

PRODUCTION

Lors de la fabrication des comprimés à sucer, des mesures sont prises pour obtenir un produit présentant une résistance mécanique suffisante pour pouvoir être manipulé sans s'effriter ni se briser. Cette résistance peut être démontrée au moyen des essais décrits dans les textes *Friabilité des comprimés non enrobés* (*2.9.7*) et *Résistance à la rupture des comprimés* (*2.9.8*).

ESSAI

**Dissolution**. Dans le cas des comprimés à sucer destinés à une action systémique, un essai approprié est réalisé pour démontrer que la libération de la (des) substance(s) active(s) est satisfaisante.

## Comprimés sublinguaux et comprimés gingivaux

DÉFINITION

Les comprimés sublinguaux et les comprimés gingivaux sont des préparations unidoses solides respectivement destinées à être appliquées sous la langue et dans l'espace gingivo-jugal, en vue d'une action systémique. Ils sont fabriqués par compression de mélanges de poudres ou de granulés de façon à obtenir des comprimés de forme adaptée à l'usage qui en est prévu.

Les comprimés sublinguaux et les comprimés gingivaux satisfont à la définition générale des comprimés.

PRODUCTION

Lors de la fabrication des comprimés sublinguaux et des comprimés gingivaux, des mesures sont prises pour obtenir un produit présentant une résistance mécanique suffisante pour pouvoir être manipulé sans s'effriter ni se briser. Cette résistance peut être démontrée au moyen des essais décrits dans les textes *Friabilité des comprimés non enrobés* (*2.9.7*) et *Résistance à la rupture des comprimés* (*2.9.8*).

ESSAI

**Dissolution**. Sauf exception justifiée et autorisée, un essai approprié est effectué pour démontrer que la libération de la ou des substance(s) active(s) est satisfaisante.

## Capsules buccales

DÉFINITION

Les capsules buccales sont des capsules à enveloppe molle destinées à être mâchées ou sucées.

## Préparations muco-adhésives

DÉFINITION

Les préparations muco-adhésives sont des préparations contenant une ou plusieurs substances actives destinées à être absorbées à travers la muqueuse gingivo-jugale pendant une durée prolongée, en vue d'une action systémique. Elles peuvent se présenter sous la forme de comprimés gingivaux muco-adhésifs ou d'autres préparations solides ou semi-solides muco-adhésives.

Les comprimés gingivaux muco-adhésifs sont obtenus par compression et peuvent être monocouches ou multicouches. Ils contiennent généralement des polymères hydrophiles qui, humectés par la salive, produisent un hydrogel souple adhérant à la muqueuse gingivo-jugale.

PRODUCTION

Lors de la fabrication des comprimés gingivaux muco-adhésifs, des mesures sont prises pour obtenir un produit présentant une résistance mécanique suffisante pour pouvoir être manipulé sans s'effriter ni se briser. Cette résistance peut être démontrée au moyen des essais décrits dans les textes *Friabilité des comprimés non enrobés* (*2.9.7*) et *Résistance à la rupture des comprimés* (*2.9.8*).

ESSAI

**Dissolution**. Sauf exception justifiée et autorisée, un essai approprié est effectué pour démontrer que la libération de la ou des substance(s) active(s) est satisfaisante.

**01/2008:0945**

# PRÉPARATIONS INTRAMAMMAIRES POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Praeparationes intramammariae ad usum veterinarium

DÉFINITION

Les préparations intramammaires pour usage vétérinaire sont des préparations stériles destinées à être introduites dans la glande mammaire par le canal du trayon. Il en existe 2 catégories principales : celles destinées à l'administration à des animaux en lactation, et celles destinées à l'administration à des animaux en fin de lactation ou à des animaux hors lactation pour la prévention ou le traitement d'une infection.

Les préparations intramammaires pour usage vétérinaire sont des solutions, des émulsions, des suspensions ou des préparations semi-solides contenant une ou plusieurs substances actives dans un excipient approprié. Elles peuvent contenir également d'autres excipients tels que des stabilisants,

Formes pharmaceutiques

émulsionnants, suspensifs et épaississants. Les suspensions peuvent présenter un sédiment, qu'il est facile de disperser par agitation. Les émulsions peuvent présenter des signes de séparation des phases, mais elles sont facilement redispersées par agitation.

Sauf exception justifiée et autorisée, les préparations intramammaires pour usage vétérinaire sont présentées en récipients unidoses pour introduction dans un seul canal du trayon d'un animal.

Si elles sont présentées en récipients multidoses, les préparations aqueuses contiennent un conservateur antimicrobien approprié à concentration convenable, sauf si la préparation elle-même possède des propriétés antimicrobiennes adéquates. Des précautions pour l'administration et la conservation entre les prélèvements doivent être prises.

Dans les cas appropriés, les récipients destinés aux préparations intramammaires pour usage vétérinaire satisfont aux exigences relatives aux *Matériaux utilisés dans la fabrication des récipients* (*3.1* et sous-chapitres) et aux *Récipients* (*3.2* et sous-chapitres).

PRODUCTION

Au cours du développement des préparations intramammaires pour usage vétérinaire dont la formulation comporte un conservateur antimicrobien, l'efficacité du conservateur choisi doit être démontrée de manière à satisfaire l'Autorité compétente. Le texte *Efficacité de la conservation antimicrobienne* (*5.1.3*) décrit une méthode d'essai appropriée et indique des critères d'évaluation des propriétés antimicrobiennes de la formulation.

Les préparations intramammaires pour usage vétérinaire sont préparées à partir de produits et par des méthodes propres à assurer leur stérilité et à empêcher l'introduction de contaminants et la croissance de microorganismes ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Méthodes de préparation des produits stériles* (*5.1.1*).

Lors de la fabrication des préparations intramammaires pour usage vétérinaire contenant des particules en dispersion, des mesures sont prises pour assurer que la taille des particules est convenablement contrôlée et qu'elle est appropriée à l'usage prévu de la préparation.

ESSAI

**Masse ou volume délivrable**. Extrayez le maximum du contenu de 10 récipients, selon les indications mentionnées sur l'étiquette. La masse moyenne ou le volume moyen obtenu ne diffère pas de plus de 10 pour cent de la masse nominale ou du volume nominal.

**Stérilité** (*2.6.1*). Les préparations intramammaires pour usage vétérinaire satisfont à l'essai de stérilité, réalisé par la technique de filtration sur membrane ou, dans des cas justifiés, par ensemencement direct du milieu nutritif. Videz le contenu de 10 récipients et mélangez soigneusement. Pour chaque milieu, utilisez 0,5 g à 1 g (ou 0,5 mL à 1 mL selon les cas) du mélange.

CONSERVATION

En récipient stérile, étanche, à fermeture inviolable.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- le nom de la ou des substance(s) active(s) et la quantité de substance(s) active(s), en masse ou nombre d'Unités Internationales, qui peut être extraite du récipient par une technique normale,
- si la préparation est destinée à des animaux en lactation ou à des animaux hors lactation,
- dans le cas des préparations multidoses, le nom de tout conservateur antimicrobien ajouté.

**01/2008:1806**
**corrigé 6.3**

# PRÉPARATIONS INTRA-UTÉRINES POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Praeparationes intra-uterinae ad usum veterinarium

DÉFINITION

Les préparations intra-utérines pour usage vétérinaire sont des préparations liquides, semi-solides ou solides destinées à être administrées directement dans l'utérus (col, cavité ou fond), généralement en vue d'une action locale. Elles contiennent 1 ou plusieurs substances actives dans un excipient approprié.

Dans les cas appropriés, les récipients destinés aux préparations intra-utérines pour usage vétérinaire satisfont aux exigences relatives aux *Matériaux utilisés dans la fabrication des récipients* (*3.1* et sous-chapitres) et aux *Récipients* (*3.2* et sous-chapitres).

Plusieurs catégories de préparations intra-utérines pour usage vétérinaire peuvent être distinguées :

- les comprimés intra-utérins,
- les capsules intra-utérines,
- les solutions, émulsions et suspensions intra-utérines, et les solutions intra-utérines à diluer,
- les comprimés pour solutions et pour suspensions intra-utérines,
- les préparations intra-utérines semi-solides,
- les mousses intra-utérines,
- les bâtons intra-utérins.

PRODUCTION

Au cours du développement des préparations intra-utérines pour usage vétérinaire dont la formulation comporte un conservateur antimicrobien, l'efficacité du conservateur choisi doit être démontrée de manière à satisfaire l'Autorité compétente. Le texte *Efficacité de la conservation antimicrobienne* (*5.1.3*) décrit une méthode d'essai appropriée et indique des critères d'évaluation des propriétés antimicrobiennes de la formulation.

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des préparations intra-utérines pour usage vétérinaire, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques (5.1.4)*, voir tableau 5.1.4.-1. – *Voie cutanée*.

Les préparations intra-utérines pour usage vétérinaire stériles sont préparées à partir de matières premières et par des méthodes propres à assurer leur stérilité et à empêcher l'introduction de contaminants et la croissance de microorganismes ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Méthodes de préparation des produits stériles* (*5.1.1*).

Au cours du développement, il doit être démontré qu'il est possible de prélever le contenu nominal du récipient des préparations intra-utérines pour usage vétérinaire présentées sous la forme de récipients unidoses.

ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses**. Les préparations intra-utérines pour usage vétérinaire unidoses satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, aux essais d'uniformité de teneur et/ou d'uniformité de masse présentés ci-après. Les drogues végétales et préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les préparations intra-utérines pour usage vétérinaire unidoses solides dont la teneur en substance active est inférieure à 2 mg ou dans lesquelles la substance active représente moins de 2 pour cent de la masse totale satisfont aux essais A (comprimés intra-utérins) ou B (capsules intra-utérines) d'uniformité de teneur des préparations unidoses. Si la préparation contient plusieurs substances actives, l'essai ne s'applique qu'à celles qui répondent aux conditions indiquées ci-dessus.

**Uniformité de masse** (*2.9.5*). Les préparations intra-utérines pour usage vétérinaire unidoses solides satisfont à l'essai d'uniformité de masse des préparations unidoses. Lorsqu'un essai d'uniformité de teneur est prescrit ou justifié et autorisé pour toutes les substances actives, l'essai d'uniformité de masse n'est pas exigé.

**Dissolution**. Dans le cas des préparations intra-utérines pour usage vétérinaire unidoses solides, un essai approprié peut être réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante, par exemple l'un des essais décrits dans le texte *Essai de dissolution des formes solides* (*2.9.3*).

Lorsqu'un essai de dissolution est prescrit, un essai de désagrégation peut ne pas être exigé.

**Stérilité** (*2.6.1*). Les préparations intra-utérines pour usage vétérinaire stériles satisfont à l'essai de stérilité. Les applicateurs fournis avec la préparation satisfont également à l'essai de stérilité. Sortez l'applicateur de son emballage dans des conditions aseptiques et transférez-le dans un tube à essai contenant du milieu de culture, en veillant à l'immerger totalement. Procédez à l'incubation et à l'interprétation des résultats comme indiqué dans l'essai de stérilité.

### ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nom de tout conservateur antimicrobien ajouté,
– dans les cas appropriés, que la préparation est stérile.

## Comprimés intra-utérins

### DÉFINITION

Les comprimés intra-utérins sont des préparations solides contenant une unité de prise d'une ou plusieurs substances actives. Ils répondent sur le plan général à la définition donnée dans la monographie *Comprimés (0478)*.

Un applicateur approprié peut être utilisé pour l'administration de la préparation dans l'utérus.

### ESSAI

**Désagrégation**. A moins qu'ils ne soient destinés à une action locale prolongée, les comprimés intra-utérins satisfont à l'essai de désagrégation des suppositoires et des ovules (*2.9.2*). Examinez l'état des comprimés après 30 min, sauf exception justifiée et autorisée.

## Capsules intra-utérines

### DÉFINITION

Les capsules intra-utérines sont des préparations unidoses solides. Elles sont de façon générale semblables aux capsules à enveloppe molle, dont elles diffèrent simplement par la forme et la taille. Les capsules intra-utérines sont de forme variable, mais le plus souvent ovoïde ; elles sont lisses et leur aspect extérieur est uniforme.

Un applicateur approprié peut être utilisé pour l'administration de la préparation dans l'utérus.

### ESSAI

**Désagrégation**. A moins qu'elles ne soient destinées à une action locale prolongée, les capsules intra-utérines satisfont à l'essai de désagrégation des suppositoires et des ovules (*2.9.2*). Examinez l'état des capsules après 30 min, sauf exception justifiée et autorisée.

## Solutions, émulsions et suspensions intra-utérines Solutions intra-utérines à diluer

### DÉFINITION

Les solutions, émulsions et suspensions intra-utérines sont des préparations liquides. Les solutions intra-utérines à diluer sont destinées à être administrées après dilution.

Elles peuvent contenir des excipients destinés, par exemple, à ajuster la viscosité de la préparation, à adapter ou stabiliser le pH, à augmenter la solubilité de la ou des substances actives ou à stabiliser la préparation. Ces excipients ne nuisent pas à l'action médicamenteuse recherchée et, aux concentrations choisies, ne provoquent pas d'irritation locale notable.

Les émulsions peuvent présenter des signes de séparation des phases, mais sont facilement redispersées par agitation. Les suspensions peuvent présenter un sédiment, qu'il est facile de disperser par agitation de façon à obtenir une suspension suffisamment stable pour permettre l'administration d'une préparation homogène.

Les solutions, émulsions et suspensions intra-utérines peuvent être conditionnées en récipients unidoses. Le récipient est de forme adaptée à l'administration de la préparation dans l'utérus ou peut être accompagné d'un applicateur approprié.

### PRODUCTION

Lors de la fabrication des suspensions intra-utérines, des mesures sont prises pour assurer que la taille des particules est convenablement maîtrisée et qu'elle est appropriée à l'usage prévu de la préparation.

## Comprimés pour solutions et suspensions intra-utérines

### DÉFINITION

Les comprimés destinés à la préparation de solutions ou suspensions intra-utérines sont des préparations unidoses à dissoudre ou disperser dans de l'eau au moment de l'administration. Ils peuvent contenir des excipients destinés à faciliter la dissolution ou la dispersion ou à empêcher l'agrégation des particules.

Les comprimés pour solutions ou suspensions intra-utérines répondent à la définition donnée dans la monographie *Comprimés (0478)*.

Après dissolution ou mise en suspension, la préparation satisfait, selon le cas, aux exigences concernant les solutions ou les suspensions intra-utérines.

### ESSAI

**Désagrégation**. Opérez comme décrit dans l'essai de désagrégation des comprimés et des capsules (*2.9.1*), mais en utilisant de l'*eau R* à 15-25 °C. Les comprimés se désagrègent en moins de 3 min.

### ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le mode de préparation de la solution ou suspension intra-utérine,
– les conditions et la durée de conservation de la solution ou suspension après reconstitution.

## Préparations intra-utérines semi-solides

DÉFINITION

Les préparations intra-utérines semi-solides sont des pommades, crèmes ou gels.

Les préparations intra-utérines semi-solides satisfont aux exigences de la monographie *Préparations semi-solides pour application cutanée (0132)*.

Elles sont souvent conditionnées en récipients unidoses. Le récipient est de forme adaptée à l'administration de la préparation dans l'utérus ou peut être accompagné d'un applicateur approprié.

## Mousses intra-utérines

DÉFINITION

Les mousses intra-utérines satisfont aux exigences de la monographie *Mousses médicamenteuses (1105)*.

Elles sont conditionnées en récipients multidoses. Le récipient est de forme adaptée à l'administration de la préparation dans l'utérus ou peut être accompagné d'un applicateur approprié.

## Bâtons intra-utérins

DÉFINITION

Les bâtons intra-utérins satisfont aux exigences de la monographie *Bâtons (1154)*. Ils produisent souvent une mousse au contact des fluides physiologiques.



**01/2008:0927**

# PRÉPARATIONS LIQUIDES POUR APPLICATION CUTANÉE

## Praeparationes liquidae ad usum dermicum

*Dans certains cas justifiés et autorisés, les exigences de la présente monographie peuvent ne pas s'appliquer aux préparations pour usage systémique ou vétérinaire.*

DÉFINITION

Les préparations liquides pour application cutanée sont des préparations de viscosité variable utilisées en vue d'une libération locale ou transdermique de substances actives. Ce sont des solutions, émulsions ou suspensions qui peuvent contenir 1 ou plusieurs substances actives dans un excipient approprié. Ces préparations peuvent également contenir des conservateurs antimicrobiens appropriés, des antioxydants et d'autres excipients tels que des stabilisants, des substances émulsionnantes et épaississantes.

Les émulsions peuvent présenter des signes de séparation des phases, mais sont facilement redispersées par agitation. Les suspensions peuvent présenter un sédiment, qu'il est facile de disperser par agitation de façon à obtenir une suspension suffisamment stable pour permettre l'administration d'une préparation homogène.

Dans les cas appropriés, les récipients destinés aux préparations liquides pour application cutanée satisfont aux exigences relatives aux *Matériaux utilisés dans la fabrication des récipients* (*3.1* et sous-chapitres) et aux *Récipients* (*3.2* et sous-chapitres).

Lorsque les préparations liquides pour application cutanée sont conditionnées en récipients pressurisés, ces récipients satisfont aux exigences de la monographie *Préparations pharmaceutiques pressurisées (0523)*.

Les préparations spécifiquement destinées à être appliquées sur une peau gravement atteinte sont stériles.

Plusieurs catégories de préparations liquides pour application cutanée peuvent être distinguées, par exemple :

– les shampooings,
– les mousses pour application cutanée.

PRODUCTION

Au cours du développement des préparations liquides pour application cutanée dont la formulation comporte un conservateur antimicrobien, la nécessité et l'efficacité du conservateur choisi doit être démontrée de manière à satisfaire l'Autorité compétente. Le texte *Efficacité de la conservation antimicrobienne* (*5.1.3*) décrit une méthode d'essai appropriée et indique des critères d'évaluation des propriétés antimicrobiennes de la formulation.

Au cours du développement, il doit être démontré qu'il est possible de prélever le contenu nominal du récipient des préparations liquides pour application cutanée présentées en récipients unidoses.

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des préparations liquides pour application cutanée, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques* (*5.1.4*).

Les préparations liquides pour application cutanée stériles sont préparées à partir de produits et par des méthodes propres à assurer leur stérilité et à empêcher l'introduction de contaminants et la croissance de microorganismes ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Méthodes de préparation des produits stériles* (*5.1.1*).

Lors de la fabrication des préparations liquides pour application cutanée contenant des particules en dispersion, des mesures sont prises pour assurer que la taille des particules est convenablement contrôlée et qu'elle est adaptée à l'usage prévu de la préparation.

ESSAI

**Stérilité** (*2.6.1*). Lorsque l'étiquette indique que la préparation est stérile, celle-ci satisfait à l'essai de stérilité.

CONSERVATION

Si la préparation est stérile, elle est conservée en récipient stérile, étanche, à fermeture inviolable.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nom de tout conservateur antimicrobien ajouté,
– dans les cas appropriés, que la préparation est stérile.

## Shampooings

DÉFINITION

Les shampooings sont des préparations liquides, ou parfois semi-solides, destinées à être appliquées sur le cuir chevelu, puis rincées et éliminées à l'eau. Par friction avec de l'eau, ils forment généralement de la mousse.

Les shampooings sont des émulsions, des suspensions ou des solutions. Ils contiennent habituellement des agents tensioactifs.

## Mousses pour application cutanée

DÉFINITION

Les mousses pour application cutanée satisfont aux exigences de la monographie *Mousses médicamenteuses (1105)*.

**01/2008:0672**

# PRÉPARATIONS LIQUIDES POUR USAGE ORAL

## Praeparationes liquidae peroraliae

*Dans les cas justifiés et autorisés, les exigences de la présente monographie peuvent ne pas s'appliquer aux préparations pour usage vétérinaire.*

### DÉFINITION

Les préparations liquides pour usage oral sont habituellement des solutions, émulsions ou suspensions contenant une ou plusieurs substances actives dans un excipient approprié ; certaines préparations liquides pour usage oral (liquides buvables) sont constituées de substances actives liquides utilisées telles quelles.

Certaines préparations liquides pour usage oral sont préparées par dilution de préparations liquides concentrées, ou à partir de poudres ou granulés destinés à la préparation de solutions ou suspensions buvables, de gouttes buvables ou de sirops, au moyen d'un excipient approprié.

Les excipients utilisés pour préparer les préparations liquides pour usage oral sont choisis en fonction de la nature de la ou des substances actives, et de façon à conférer à la préparation des propriétés organoleptiques appropriées à l'usage prévu.

Les préparations liquides pour usage oral peuvent contenir des conservateurs antimicrobiens appropriés, des antioxydants et d'autres excipients tels que des agents de dispersion, de suspension, des substances épaississantes, émulsionnantes, des tampons, des mouillants, des solubilisants, des stabilisants, des aromatisants, des édulcorants et des colorants autorisés par l'Autorité compétente.

Les émulsions peuvent présenter des signes de séparation des phases, mais sont facilement redispersées par agitation. Les suspensions peuvent présenter un sédiment, qu'il est facile de disperser par agitation de façon à obtenir une suspension suffisamment stable pour permettre l'administration de la dose voulue.

Dans les cas appropriés, les récipients destinés aux préparations liquides pour usage oral satisfont aux exigences relatives aux *Matériaux utilisés dans la fabrication des récipients* (*3.1* et sous-chapitres) et aux *Récipients* (*3.2* et sous-chapitres).

Plusieurs catégories de préparations liquides pour usage oral peuvent être distinguées :

- les solutions, émulsions et suspensions buvables,
- les poudres et granulés pour solutions ou suspensions buvables,
- les gouttes buvables,
- les poudres pour gouttes buvables,
- les sirops,
- les poudres et granulés pour sirops.

### PRODUCTION

Au cours du développement des préparations liquides pour usage oral dont la formulation comporte un conservateur antimicrobien, la nécessité et l'efficacité du conservateur choisi doit être démontrée de manière à satisfaire l'Autorité compétente. Le texte *Efficacité de la conservation antimicrobienne* (*5.1.3*) décrit une méthode d'essai appropriée et indique des critères d'évaluation des propriétés antimicrobiennes de la formulation.

Au cours du développement, il doit être démontré qu'il est possible de prélever le contenu nominal du récipient des préparations liquides pour usage oral présentées en récipients unidoses.

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des préparations liquides pour usage oral, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques* (*5.1.4*).

Lors de la fabrication des préparations liquides pour usage oral contenant des particules en dispersion, des mesures sont prises pour assurer que la taille des particules est convenablement contrôlée et qu'elle est appropriée à l'usage prévu de la préparation.

### ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses**. Les solutions, suspensions et émulsions conditionnées en récipients unidoses satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, à l'essai d'uniformité de teneur ou à l'essai d'uniformité de masse présentés ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les suspensions conditionnées en récipients unidoses satisfont à l'essai suivant : après l'avoir agité, videz au maximum chaque récipient et effectuez l'essai sur le contenu individuel. Ces préparations satisfont à l'essai B d'uniformité de teneur des préparations unidoses.

**Uniformité de masse**. Les solutions et émulsions conditionnées en récipients unidoses satisfont à l'essai suivant : pesez individuellement le contenu de 20 récipients vidés au maximum et déterminez la masse moyenne. Au maximum 2 des masses individuelles peuvent s'écarter de plus de 10 pour cent de la masse moyenne et aucune ne s'en écarte de plus de 20 pour cent.

**Dose et uniformité de dose des gouttes buvables**. Dans une éprouvette graduée appropriée, introduisez à l'aide du dispositif le nombre de gouttes ou la quantité de préparation habituellement prescrits pour une dose. La vitesse ne doit pas dépasser 2 gouttes par seconde. Pesez le liquide, ajoutez une nouvelle dose, pesez à nouveau et continuez à ajouter et à peser jusqu'à obtention de 10 masses au total. Aucune des masses individuelles ne s'écarte de plus de 10 pour cent de la masse moyenne. Le total des 10 masses ne s'écarte pas de plus de 15 pour cent de la masse nominale de 10 doses. Si nécessaire, mesurez le volume total de 10 doses. Le volume ne s'écarte pas de plus de 15 pour cent du volume nominal de 10 doses.

**Uniformité de masse de la dose délivrée par les récipients multidoses** (*2.9.27*). Les préparations liquides pour usage oral conditionnées en récipients multidoses satisfont à l'essai. Les gouttes buvables ne sont pas soumises aux dispositions de cet essai.

### ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique le nom de tout conservateur antimicrobien ajouté.

## Solutions, émulsions et suspensions buvables

### DÉFINITION

Les solutions, émulsions et suspensions buvables sont conditionnées en récipients unidoses ou multidoses. Chaque dose d'une préparation multidose est administrée à l'aide d'un dispositif permettant de mesurer la quantité prescrite. Ce dispositif est généralement une cuillère ou un godet, pour les volumes de 5 mL ou multiples de 5 mL, ou une seringue pour administration orale pour les autres volumes.

## Poudres et granulés pour solutions ou suspensions buvables

DÉFINITION

Les poudres et les granulés destinés à la préparation des solutions ou suspensions buvables répondent sur le plan général à la définition donnée, selon le cas, dans la monographie *Poudres orales (1165)* ou la monographie *Granulés (0499)*. Ils peuvent contenir des excipients, notamment pour faciliter la dispersion ou la formation d'une solution et empêcher l'agrégation des particules.

Après dissolution ou mise en suspension, la préparation satisfait, selon le cas, aux exigences concernant les solutions ou les suspensions buvables.

ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses**. Les poudres et granulés conditionnés en récipients unidoses satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, aux essais d'uniformité de teneur et/ou d'uniformité de masse présentés ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les poudres et granulés conditionnés en récipients unidoses dont la teneur en substance active est inférieure à 2 mg ou dans lesquels la substance active représente moins de 2 pour cent de la masse totale satisfont à l'essai B d'uniformité de teneur des préparations unidoses. Si la préparation contient plusieurs substances actives, l'essai ne s'applique qu'à celles qui répondent aux conditions indiquées ci-dessus.

**Uniformité de masse** (*2.9.5*). Les poudres et granulés conditionnés en récipients unidoses satisfont à l'essai d'uniformité de masse des préparations unidoses. Lorsqu'un essai d'uniformité de teneur est prescrit pour toutes les substances actives, l'essai d'uniformité de masse n'est pas exigé.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le mode de préparation de la solution ou de la suspension,
– les conditions et la durée de conservation après reconstitution.

## Gouttes buvables

DÉFINITION

Les gouttes buvables sont des solutions, des émulsions ou des suspensions administrées en petits volumes au moyen d'un dispositif approprié.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique lorsque la dose est mesurée en gouttes, le nombre de gouttes par millilitre ou par gramme de préparation.

## Poudres pour gouttes buvables

DÉFINITION

Les poudres pour gouttes buvables répondent sur le plan général à la définition des *Poudres orales (1165)*. Elles peuvent contenir des excipients destinés à faciliter la dissolution ou la dispersion ou empêcher l'agrégation des particules.

Après dissolution ou mise en suspension, la préparation satisfait aux exigences concernant les gouttes buvables.

ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses**. Les poudres pour gouttes buvables conditionnées en récipients unidoses satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, aux essais d'uniformité de teneur et/ou d'uniformité de masse présentés ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les poudres pour gouttes buvables conditionnées en récipients unidoses dont la teneur en substance active est inférieure à 2 mg ou dans lesquels la substance active représente moins de 2 pour cent de la masse totale satisfont à l'essai B d'uniformité de teneur des préparations unidoses. Si la préparation contient plusieurs substances actives, l'essai ne s'applique qu'à celles qui répondent aux conditions indiquées ci-dessus.

**Uniformité de masse** (*2.9.5*). Les poudres pour gouttes buvables conditionnées en récipients unidoses satisfont à l'essai d'uniformité de masse des préparations unidoses. Lorsqu'un essai d'uniformité de teneur est prescrit pour toutes les substances actives, l'essai d'uniformité de masse n'est pas exigé.

## Sirops

DÉFINITION

Les sirops sont des préparations aqueuses caractérisées par leur saveur sucrée et leur consistance visqueuse. Ils peuvent contenir du saccharose, à concentration au moins égale à 45 pour cent *m/m*. La saveur sucrée peut également leur être conférée par d'autres polyols ou édulcorants. Ils contiennent généralement des aromatisants ou autres agents de sapidité. Chaque dose d'une préparation multidose est administrée à l'aide d'un dispositif permettant de mesurer la quantité prescrite. Ce dispositif est généralement une cuillère ou un godet, pour les volumes de 5 mL ou multiples de 5 mL.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique le nom et la concentration du polyol ou de l'édulcorant utilisé.

## Poudres et granulés pour sirops

DÉFINITION

Les poudres et granulés pour sirops répondent sur le plan général à la définition donnée, selon le cas, dans la monographie *Poudres orales (1165)* ou la monographie *Granulés (0499)*. Ils peuvent contenir des excipients destinés à faciliter la dissolution.

Après dissolution, la préparation satisfait aux exigences concernant les sirops.

ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses**. Les poudres et granulés pour sirops conditionnés en récipients unidoses satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, aux essais d'uniformité de teneur et/ou d'uniformité de masse présentés ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les poudres et granulés pour sirops conditionnés en récipients unidoses dont la teneur en substance active est inférieure à 2 mg ou dans lesquels la substance active représente moins de 2 pour cent de la masse totale satisfont à l'essai B d'uniformité de teneur des préparations unidoses. Si la préparation contient plusieurs substances actives, cette exigence ne s'applique qu'à celles qui répondent aux conditions ci-dessus.

**Uniformité de masse** (*2.9.5*). Les poudres et granulés pour sirops conditionnés en récipients unidoses satisfont à l'essai d'uniformité de masse des préparations unidoses. Lorsqu'un essai d'uniformité de teneur est prescrit pour toutes substances actives, l'essai d'uniformité de masse n'est pas exigé.

**01/2008:0676**

# PRÉPARATIONS NASALES

## Nasalia

DÉFINITION

Les préparations nasales sont des préparations liquides, semi-solides ou solides destinées à l'administration dans les cavités nasales en vue d'une action locale ou systémique. Elles contiennent une ou plusieurs substances actives. Les préparations nasales sont, dans la mesure du possible, non irritantes et n'exercent aucun effet notable sur les fonctions de la muqueuse nasale et de ses cils. Les préparations nasales aqueuses sont habituellement isotoniques et peuvent contenir des excipients destinés, par exemple, à ajuster la viscosité de la préparation, à adapter ou stabiliser le pH, à augmenter la solubilité de la ou des substances actives ou à stabiliser la préparation.

Les préparations nasales sont conditionnées en récipients multidoses ou unidoses, éventuellement munis d'un dispositif d'administration approprié qui peut être conçu pour empêcher la pénétration de tout agent de contamination.

Sauf exception justifiée et autorisée, les préparations nasales aqueuses conditionnées en récipients multidoses contiennent un conservateur antimicrobien approprié à concentration convenable, sauf si la préparation elle-même possède des propriétés antimicrobiennes adéquates.

Dans les cas appropriés, les récipients destinés aux préparations nasales satisfont aux exigences relatives aux *Matériaux utilisés dans la fabrication des récipients* (*3.1* et sous-chapitres) et aux *Récipients* (*3.2* et sous-chapitres).

Plusieurs catégories de préparations nasales peuvent être distinguées :

– les préparations liquides pour instillation ou pulvérisation nasale,
– les poudres nasales,
– les préparations nasales semi-solides,
– les solutions pour lavage nasal,
– les bâtons pour usage nasal.

PRODUCTION

Au cours du développement des préparations nasales dont la formulation comporte un conservateur antimicrobien, l'efficacité du conservateur choisi doit être démontrée de manière à satisfaire l'Autorité compétente. Le texte *Efficacité de la conservation antimicrobienne (5.1.3)* décrit une méthode d'essai appropriée et indique des critères d'évaluation des propriétés antimicrobiennes de la formulation.

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des préparations nasales, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques* (*5.1.4*).

Les préparations nasales stériles sont préparées à partir de produits et par des méthodes propres à assurer leur stérilité et à empêcher l'introduction de contaminants et la croissance de microorganismes ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Méthodes de préparation des produits stériles* (*5.1.1*).

Lors de la fabrication des préparations nasales contenant des particules en dispersion, des mesures sont prises pour assurer que la taille des particules est convenablement contrôlée et qu'elle est appropriée à l'usage prévu de la préparation.

ESSAI

**Stérilité** (*2.6.1*). Lorsque l'étiquette indique que la préparation est stérile, celle-ci satisfait à l'essai de stérilité.

CONSERVATION

Si la préparation est stérile, elle est conservée en récipient stérile, étanche, à fermeture inviolable.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nom de tout conservateur antimicrobien ajouté,
– dans les cas appropriés, que la préparation est stérile.

## Préparations liquides pour instillation ou pulvérisation nasale

DÉFINITION

Les préparations liquides pour instillation ou pulvérisation nasale sont des solutions, des émulsions ou des suspensions destinées à être instillées ou pulvérisées dans les cavités nasales.

Les émulsions peuvent présenter des signes de séparation des phases, mais sont facilement redispersées par agitation. Les suspensions peuvent présenter un sédiment, qu'il est facile de disperser par agitation de façon à obtenir une suspension suffisamment stable pour permettre l'administration de la dose voulue.

Les préparations liquides pour instillation nasale sont habituellement conditionnées en récipients multidoses comportant un dispositif d'administration approprié.

Les préparations liquides pour pulvérisation nasale sont conditionnées en récipients avec nébuliseur, ou en récipients pressurisés munis d'un système d'administration approprié, avec ou sans valve doseuse, satisfaisant aux exigences de la monographie *Préparations pharmaceutiques pressurisées (0523)*.

La taille des gouttelettes pulvérisées est telle que leur dépôt se localise dans la cavité nasale.

ESSAI

Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les préparations liquides pour instillation nasale présentées en récipients unidoses et les doses unitaires des préparations liquides pour pulvérisation nasale présentées en récipients doseurs, destinées à une action systémique, satisfont aux essais suivants.

*PRÉPARATIONS LIQUIDES POUR INSTILLATION NASALE EN RÉCIPIENTS UNIDOSES*

**Uniformité des préparations unidoses**. Les préparations liquides pour instillation nasale en récipients unidoses satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, à l'essai d'uniformité de masse ou l'essai d'uniformité de teneur présentés ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de masse**. *Les solutions pour instillation nasale satisfont à l'essai suivant.* Pesez individuellement le contenu de 10 récipients, vidés aussi complètement que possible, et déterminez la masse moyenne. Au maximum 2 des masses individuelles peuvent s'écarter de la masse moyenne de plus de 10 pour cent, et aucune ne s'en écarte de plus de 20 pour cent.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). *Les suspensions et les émulsions pour instillation nasale satisfont à l'essai suivant.* Videz chaque récipient aussi complètement que possible et effectuez séparément l'essai sur le contenu de chacun d'eux. Celui-ci satisfait à l'essai B d'uniformité de teneur.

*PRÉPARATIONS LIQUIDES POUR PULVÉRISATION NASALE EN RÉCIPIENTS DOSEURS*

**Uniformité des préparations unidoses**. Les préparations liquides pour pulvérisation nasale en récipients doseurs satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, à l'essai d'uniformité de masse ou l'essai d'uniformité de la dose délivrée présentés ci-après.

Formes pharmaceutiques

Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

*Dans le cas de solutions pour pulvérisation nasale en récipients doseurs, procédez de la façon suivante.* Actionnez 1 fois à perte. Attendez au minimum 5 s, puis agitez pendant 5 s et actionnez à nouveau 1 fois à perte. Répétez l'opération encore 3 fois. Pesez le récipient, actionnez 1 fois à perte et pesez à nouveau le récipient. Calculez la différence entre les 2 masses obtenues. Opérez de même avec 9 autres récipients. Déterminez la variation de masse (*2.9.40*).

*Dans le cas de suspensions et d'émulsions pour pulvérisation nasale en récipients doseurs, procédez de la façon suivante.* Utilisez un appareillage permettant de recueillir quantitativement la dose libérée par le diffuseur. Agitez un récipient pendant 5 s et actionnez 1 fois à perte. Attendez au minimum 5 s, puis agitez pendant 5 s et actionnez à nouveau 1 fois à perte. Répétez l'opération encore 3 fois. Au bout de 2 s, déchargez 1 dose de la préparation dans un récipient de collecte, en actionnant le diffuseur. Recueillez le contenu du récipient de collecte par plusieurs rinçages successifs. Déterminez la teneur en substance active du mélange des produits de rinçage. Opérez de même avec 9 autres récipients. Déterminez l'uniformité de teneur (*2.9.40*).

**Uniformité de masse**. *Les solutions pour pulvérisation nasale en récipients doseurs satisfont à l'essai suivant.* Actionnez 1 fois à perte. Attendez au minimum 5 s, puis agitez pendant 5 s et actionnez à nouveau 1 fois à perte. Répétez l'opération encore 3 fois. Pesez le récipient, actionnez 1 fois à perte et pesez à nouveau le récipient. Calculez la différence entre les 2 masses obtenues. Opérez de même avec 9 autres récipients.

La préparation satisfait à l'essai si au maximum 2 des valeurs obtenues s'écartent de la moyenne de plus de 25 pour cent et si aucune ne s'en écarte de plus de 35 pour cent.

**Uniformité de la dose délivrée**. *Les suspensions et les émulsions pour pulvérisation nasale en récipients doseurs satisfont à l'essai suivant.* Utilisez un appareillage permettant de recueillir quantitativement la dose libérée par le diffuseur. Agitez un récipient pendant 5 s et actionnez 1 fois à perte. Attendez au minimum 5 s, puis agitez pendant 5 s et actionnez à nouveau 1 fois à perte. Répétez l'opération encore 3 fois. Au bout de 2 s, déchargez une dose de la préparation dans un récipient de collecte, en actionnant le diffuseur. Recueillez le contenu du récipient de collecte par plusieurs rinçages successifs. Déterminez la teneur en substance active du mélange des produits de rinçage. Opérez de même avec 9 autres récipients.

Sauf exception justifiée et autorisée, la préparation satisfait à l'essai si la teneur individuelle d'au maximum 1 unité se situe en dehors des limites de 75 pour cent à 125 pour cent de la teneur moyenne et si aucune des teneurs ne se situe en dehors des limites de 65 pour cent à 135 pour cent de la teneur moyenne.

Si les teneurs individuelles de 2 ou d'au maximum 3 unités se situent en dehors des limites de 75 pour cent à 125 pour cent de la teneur moyenne et si aucune teneur individuelle ne se situe en dehors des limites de 65 pour cent à 135 pour cent de la teneur moyenne, répétez l'essai sur 20 autres récipients. La préparation satisfait à l'essai si les teneurs individuelles d'au maximum 3 unités dans les 30 unités se situent en dehors des limites de 75 pour cent à 125 pour cent de la teneur moyenne et si aucune d'entre elles ne se situe en dehors des limites de 65 pour cent à 135 pour cent de la teneur moyenne.

## Poudres nasales

DÉFINITION

Les poudres nasales sont des poudres destinées à être insufflées dans la cavité nasale à l'aide d'un dispositif approprié.

Elles satisfont aux exigences de la monographie *Poudres pour application cutanée (1166)*.

La taille des particules des poudres nasales est telle que leur dépôt soit localisé dans la cavité nasale ; elle est vérifiée par des méthodes adéquates de détermination de la taille des particules.

## Préparations nasales semi-solides

DÉFINITION

Les préparations nasales semi-solides satisfont aux exigences de la monographie *Préparations semi-solides pour application cutanée (0132)*.

Les récipients sont adaptés à la délivrance du produit au site d'application.

## Solutions pour lavage nasal

DÉFINITION

Les solutions pour lavage nasal sont en général des solutions aqueuses isotoniques destinées au nettoyage des fosses nasales.

Les solutions pour lavage nasal destinées à être appliquées sur une partie lésée ou à être utilisées avant une intervention chirurgicale sont stériles.

PRODUCTION

Durant le développement, il doit être démontré qu'il est possible de prélever le contenu nominal du récipient des solutions pour lavage nasal présentées en récipient unidose.

## Bâtons pour usage nasal

DÉFINITION

Les bâtons pour usage nasal satisfont aux exigences de la monographie *Bâtons (1154)*.

**01/2008:1163**

# PRÉPARATIONS OPHTALMIQUES

## Ophthalmica

DÉFINITION

Les préparations ophtalmiques sont des préparations liquides, semi-solides ou solides stériles destinées à être appliquées sur le globe oculaire et/ou les conjonctives ou à être introduites dans le sac conjonctival.

Dans les cas appropriés, les récipients destinés aux préparations ophtalmiques satisfont aux exigences relatives aux matériaux utilisés dans la fabrication des récipients (*3.1* et sous-chapitres) et aux récipients (*3.2* et sous-chapitres).

Plusieurs catégories de préparations ophtalmiques peuvent être distinguées :

- les collyres,
- les solutions pour lavage ophtalmique,
- les poudres pour collyres et les poudres pour solutions pour lavage ophtalmique,
- les préparations ophtalmiques semi-solides,
- les inserts ophtalmiques.

PRODUCTION

Au cours du développement des préparations ophtalmiques dont la formulation comporte un conservateur antimicrobien, la nécessité et l'efficacité du conservateur choisi doit être démontrée de manière à satisfaire l'Autorité compétente. Le chapitre *5.1.3. Efficacité de la conservation antimicrobienne* décrit une méthode d'essai appropriée et indique des critères d'évaluation des propriétés antimicrobiennes de la formulation.

Les préparations ophtalmiques sont préparées à partir de produits et par des méthodes propres à assurer leur stérilité et à empêcher l'introduction de contaminants et la croissance

de microorganismes ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le chapitre *5.1.1. Méthodes de préparation des produits stériles*.

Lors de la fabrication des préparations ophtalmiques contenant des particules en dispersion, des mesures sont prises pour assurer que la taille des particules est convenablement contrôlée et qu'elle est appropriée à l'usage prévu de la préparation.

Durant le développement, il doit être démontré qu'il est possible de prélever le contenu nominal du récipient des préparations ophtalmiques liquides ou semi-solides conditionnées en récipients unidoses.

ESSAI

**Stérilité** (*2.6.1*). Les préparations ophtalmiques satisfont à l'essai. Les applicateurs fournis séparément satisfont également à l'essai. Sortez l'applicateur de son emballage dans des conditions aseptiques et transférez-le dans un tube à essai contenant un milieu de culture, en veillant à l'immerger totalement. Placez en incubation et interprétez les résultats comme indiqué dans l'essai.

CONSERVATION

Sauf exception justifiée et autorisée, en récipient stérile, à fermeture inviolable.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique le nom de tout conservateur antimicrobien éventuellement ajouté.

## Collyres

DÉFINITION

Les collyres sont des solutions, des émulsions ou des suspensions stériles, aqueuses ou huileuses, contenant une ou plusieurs substances actives et destinées à l'instillation oculaire.

Les collyres peuvent contenir des excipients destinés, par exemple, à ajuster le pouvoir osmotique ou la viscosité de la préparation, à adapter ou stabiliser le pH, à augmenter la solubilité de la substance active ou à stabiliser la préparation. Ces excipients ne nuisent pas à l'action médicamenteuse recherchée et, aux concentrations choisies, ne provoquent pas d'irritation locale notable.

Les préparations aqueuses conditionnées en récipients multidoses contiennent un conservateur antimicrobien approprié à concentration convenable, sauf si la préparation présente elle-même des propriétés antimicrobiennes adéquates. Le conservateur antimicrobien choisi doit être compatible avec les composants de la préparation et garder son efficacité jusqu'à la fin de la durée d'utilisation du collyre.

Si les collyres ne contiennent pas de conservateur antimicrobien, ils sont conditionnés en récipients unidoses ou en récipients multidoses empêchant la contamination microbienne du contenu après ouverture.

Les collyres utilisés au cours d'opérations chirurgicales ne contiennent pas de conservateur antimicrobien.

Les collyres qui se présentent sous forme de solutions, examinés dans des conditions appropriées de visibilité, sont pratiquement limpides et pratiquement exempts de particules.

Les collyres qui se présentent sous forme de suspensions peuvent présenter un sédiment qu'il est facile de disperser par agitation de façon à obtenir une suspension suffisamment stable pour permettre l'administration de la dose voulue.

Les préparations multidoses sont conditionnées en récipients permettant l'administration à plusieurs reprises d'une goutte de la préparation. Les récipients contiennent au maximum 10 mL de préparation, sauf exception justifiée et autorisée.

ESSAI

**Taille des particules**. Sauf exception justifiée et autorisée, les collyres présentés sous forme de suspensions satisfont à l'essai suivant : dans une chambre d'hémocytomètre, introduisez une quantité appropriée de la suspension ou, suivant le cas, déposez-la sur une lame à l'aide d'une micropipette. Examinez au microscope une aire correspondant à 10 µg de la phase solide. Pour des raisons pratiques, il est recommandé d'examiner l'échantillon sous un faible grossissement (par exemple, 50×) pour déceler les particules supérieures à 25 µm, puis de mesurer ces dernières sous un plus fort grossissement (par exemple, 200× ou 500×). Dans chaque aire correspondant à 10 µg de substance active à l'état solide, au plus 20 particules présentent une dimension maximale supérieure à 25 µm et au plus 2 d'entre elles dépassent 50 µm. Aucune particule n'a une dimension maximale supérieure à 90 µm.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique, dans le cas des récipients multidoses, la durée limite d'utilisation à partir de l'ouverture du récipient. Cette durée ne dépasse pas 4 semaines, sauf exception justifiée et autorisée.

## Solutions pour lavage ophtalmique

DÉFINITION

Les solutions pour lavage ophtalmique sont des solutions aqueuses stériles destinées à rincer ou à laver les yeux ou à imbiber des compresses oculaires.

Les solutions pour lavage ophtalmique peuvent contenir des excipients destinés, par exemple, à ajuster le pouvoir osmotique ou la viscosité de la préparation ou à adapter ou stabiliser le pH. Ces excipients ne nuisent pas à l'action recherchée et, aux concentrations choisies, ne provoquent pas d'irritation locale notable.

Les solutions pour lavage ophtalmique conditionnées en récipients multidoses contiennent un conservateur antimicrobien approprié à concentration convenable, sauf si la préparation elle-même possède des propriétés antimicrobiennes adéquates. Le conservateur antimicrobien choisi est compatible avec les autres composants de la préparation et garde son efficacité jusqu'à la fin de la durée d'utilisation de la solution.

Lorsque les solutions pour lavage ophtalmique ne contiennent pas de conservateur antimicrobien, elles sont conditionnées en récipients unidoses. Les solutions pour lavage ophtalmique utilisées au cours d'interventions chirurgicales ou en traitement de premier secours ne contiennent pas de conservateur antimicrobien et sont conditionnées en récipients unidoses.

Les solutions pour lavage ophtalmique, examinées dans des conditions appropriées de visibilité, sont pratiquement limpides et pratiquement exemptes de particules.

Les récipients multidoses ne contiennent pas plus de 200 mL de solution pour lavage ophtalmique, sauf exception justifiée et autorisée.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– dans les cas appropriés, que le contenu du récipient est à utiliser en une seule fois,
– dans le cas des récipients multidoses, la durée limite d'utilisation à compter de l'ouverture du récipient. Cette durée ne dépasse pas 4 semaines, sauf exception justifiée et autorisée.

## Poudres pour collyres et poudres pour solutions pour lavage ophtalmique

DÉFINITION

Les poudres pour collyres et poudres pour solutions pour lavage ophtalmique sont des préparations sèches stériles à dissoudre ou disperser dans un liquide approprié au moment de l'administration. Elles peuvent contenir des excipients destinés à faciliter la dissolution ou la dispersion, à empêcher l'agrégation des particules, à ajuster le pouvoir osmotique, à adapter ou stabiliser le pH ou à stabiliser la préparation.

Après dissolution ou mise en suspension, la préparation satisfait, selon le cas, aux exigences concernant les collyres ou les solutions pour lavage ophtalmique.

ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses** (*2.9.40*). Les poudres conditionnées en récipients unidoses satisfont à l'essai ou, dans les cas justifiés et autorisés, aux essais d'uniformité de teneur et/ou d'uniformité de masse présentés ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les poudres conditionnées en récipients unidoses dont la teneur en substance active est inférieure à 2 mg ou dans lesquelles la substance active représente moins de 2 pour cent de la masse totale satisfont à l'essai B. Si la préparation contient plusieurs substances actives, cette exigence ne s'applique qu'à celles qui répondent aux conditions ci-dessus.

**Uniformité de masse** (*2.9.5*). Les poudres conditionnées en récipients unidoses satisfont à l'essai. Lorsqu'un essai d'uniformité de teneur est prescrit pour toutes les substances actives, l'essai d'uniformité de masse n'est pas exigé.

## Préparations ophtalmiques semi-solides

DÉFINITION

Les préparations ophtalmiques semi-solides sont des pommades, crèmes ou gels stériles destinés à être appliqués sur les conjonctives ou les paupières. Elles contiennent une ou plusieurs substances actives dissoutes ou dispersées dans un excipient approprié. Elles présentent un aspect homogène.

Les préparations ophtalmiques semi-solides satisfont aux exigences de la monographie *Préparations semi-solides pour application cutanée (0132).* L'excipient utilisé est exempt de propriétés irritantes pour les conjonctives.

Les préparations ophtalmiques semi-solides sont conditionnées en petits tubes collabables, stérilisés, munis ou accompagnés d'une canule stérilisée. Les récipients contiennent au maximum 10 g de préparation, sauf exception justifiée et autorisée. Les tubes doivent être bien fermés pour exclure toute contamination microbienne. Les préparations ophtalmiques semi-solides peuvent également être conditionnées en récipients unidoses appropriés. Les récipients, ou les embouts des tubes, sont conçus de façon à faciliter l'administration sans risque de contamination.

ESSAI

**Taille des particules**. Les préparations ophtalmiques semi-solides contenant en dispersion des particules solides satisfont à l'essai suivant : étalez soigneusement en couche mince une quantité de la préparation correspondant au moins à 10 µg de la substance active à l'état solide. Examinez au microscope la totalité de l'échantillon. Pour des raisons pratiques, il est recommandé d'examiner la totalité de l'échantillon sous un faible grossissement (par exemple 50×) pour déceler les particules supérieures à 25 µm, puis de mesurer ces dernières sous un plus fort grossissement (par exemple, 200× ou 500×). Dans chaque aire correspondant à 10 µg de la substance active à l'état solide, au plus 20 particules présentent une dimension maximale supérieure à 25 µm et au plus 2 d'entre elles dépassent 50 µm. Aucune particule n'a une dimension maximale supérieure à 90 µm.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique, dans le cas de récipients multidoses, la durée limite d'utilisation à compter de l'ouverture du récipient. Cette durée ne dépasse pas 4 semaines, sauf exception justifiée et autorisée.

## Inserts ophtalmiques

DÉFINITION

Les inserts ophtalmiques sont des préparations solides ou semi-solides stériles, d'une taille et d'une forme appropriées, destinées à être insérées dans le sac conjonctival en vue d'une action sur l'oeil. Ils sont en général constitués d'un réservoir de substance active incorporé dans une matrice ou entouré de membranes de contrôle du débit. La substance active, plus ou moins soluble dans le liquide lacrymal, est libérée pendant une durée déterminée.

Les inserts ophtalmiques sont conditionnés individuellement en récipients stériles.

PRODUCTION

Lors de la fabrication des inserts ophtalmiques, des mesures sont prises pour assurer un comportement en dissolution approprié.

ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses** (*2.9.40*). Les inserts ophtalmiques satisfont à l'essai ou, dans les cas justifiés et autorisés, à l'essai d'uniformité de teneur présenté ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Les inserts ophtalmiques satisfont, dans les cas appropriés, à l'essai A.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– dans les cas appropriés, la quantité totale de substance active par insert,
– dans les cas appropriés, la dose libérée par unité de temps.

**01/2008:0520**

# PRÉPARATIONS PARENTÉRALES

## Parenteralia

*Les exigences de la présente monographie ne s'appliquent pas nécessairement aux produits dérivés du sang humain, aux préparations immunologiques ou aux préparations radiopharmaceutiques. Les préparations pour usage vétérinaire peuvent faire l'objet d'exigences particulières selon les espèces animales auxquelles elles sont destinées.*

DÉFINITION

Les préparations parentérales sont des préparations stériles destinées à être injectées, perfusées ou implantées dans le corps humain ou animal.

Les préparations parentérales peuvent nécessiter l'emploi d'excipients, par exemple pour assurer l'isotonie au sang, ajuster le pH, augmenter la solubilité, permettre la conservation de la (ou des) substance(s) active(s), assurer une action antimicrobienne. Ces excipients n'affectent pas l'action médicamenteuse recherchée et, aux concentrations choisies, ne provoquent pas de phénomènes de toxicité ou d'irritation locale notable.

Les récipients destinés aux préparations parentérales sont constitués, dans la mesure du possible, de matériaux suffisamment transparents pour permettre la vérification visuelle de l'aspect du contenu, sauf dans le cas des implants et dans d'autres cas justifiés et autorisés.

Dans les cas appropriés, les récipients destinés aux préparations parentérales satisfont aux exigences relatives aux *Matériaux utilisés dans la fabrication des récipients* (*3.1* et sous-chapitres) et aux *Récipients* (*3.2* et sous-chapitres).

Les préparations parentérales sont conditionnées en récipients de verre (*3.2.1*) ou dans d'autres récipients tels que des récipients en matière plastique (*3.2.2*, *3.2.2.1* et *3.2.9*) et des seringues préremplies. L'étanchéité de ces récipients est assurée par des moyens appropriés. Les fermetures assurent l'étanchéité, empêchent la pénétration de microorganismes et de tout autre agent de contamination et permettent habituellement, sans être déplacées, le prélèvement de tout ou partie du contenu. La matière plastique ou l'élastomère (*3.2.9*) utilisés pour la fabrication de cette fermeture présente une résistance et une élasticité adaptées à la pénétration d'une aiguille, en entraînant aussi peu que possible de fragments. Les fermetures des récipients multidoses sont suffisamment élastiques pour garantir l'obturation du passage de l'aiguille dès le retrait de celle-ci.

Plusieurs catégories de préparations parentérales peuvent être distinguées :

– les préparations injectables,
– les préparations pour perfusion,
– les préparations à diluer pour injection ou pour perfusion,
– les poudres pour injection ou pour perfusion,
– les gels injectables,
– les implants.

PRODUCTION

Au cours du développement des préparations parentérales dont la formulation comporte un conservateur antimicrobien, l'efficacité du conservateur choisi est démontrée de manière à satisfaire l'Autorité compétente. Le texte *Efficacité de la conservation antimicrobienne* (*5.1.3*) décrit une méthode d'essai appropriée et indique des critères d'évaluation des propriétés antimicrobiennes de la formulation.

Les préparations parentérales sont préparées à partir de produits et par des méthodes propres à assurer leur stérilité et à empêcher l'introduction de contaminants et la croissance de microorganismes ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Méthodes de préparation des produits stériles* (*5.1.1*).

L'eau utilisée pour la fabrication des préparations parentérales satisfait aux exigences spécifiées pour l'eau pour préparations injectables en vrac dans la monographie *Eau pour préparations injectables (0169)*.

ESSAI

**Contamination particulaire : particules non visibles** (*2.9.19*). Dans le cas de préparations pour usage humain, les solutions injectables et les solutions pour perfusion satisfont à l'essai.

Dans le cas de préparations pour administration sous-cutanée ou intramusculaire, des limites plus élevées peuvent être appropriées. Les préparations radiopharmaceutiques sont exemptées de ces exigences. Les préparations dont l'étiquette indique qu'elles sont à utiliser avec un filtre terminal sont exemptées de ces exigences, à condition qu'il ait été démontré que le filtre permet d'obtenir une solution satisfaisant à l'essai.

Dans le cas de préparations pour usage vétérinaire, les solutions injectables et les solutions pour perfusion, conditionnées en récipients de contenance nominale supérieure à 100 mL et équivalant à une dose supérieure à 1,4 mL par kilogramme de masse corporelle, satisfont à l'essai des particules non visibles.

**Stérilité** (*2.6.1*). Les préparations parentérales satisfont à l'essai de stérilité.

CONSERVATION

En récipient stérile, étanche, à fermeture inviolable.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nom et la concentration de tout conservateur antimicrobien ajouté,
– dans les cas appropriés, que la solution est à utiliser avec un filtre terminal,
– dans les cas appropriés, que la préparation est exempte d'endotoxines bactériennes ou qu'elle est apyrogène.

## Préparations injectables

DÉFINITION

Les préparations injectables sont des solutions, émulsions ou suspensions stériles. Elles sont préparées par mise en solution, émulsion ou dispersion des substances actives et éventuellement des excipients dans de l'eau, dans un liquide non aqueux approprié, pouvant ne pas être stérile dans les cas justifiés, ou dans un mélange de ces 2 liquides.

Les solutions injectables, examinées dans des conditions appropriées de visibilité, sont limpides et pratiquement exemptes de particules.

Les émulsions injectables ne présentent pas de signe de séparation des phases. Les suspensions injectables peuvent présenter un sédiment, qu'il est facile de disperser par agitation de façon à obtenir une suspension suffisamment stable pour permettre l'administration de la dose voulue.

*Préparations multidoses*. Les préparations aqueuses multidoses contiennent un conservateur antimicrobien approprié à concentration convenable, sauf si la préparation elle-même possède des propriétés antimicrobiennes adéquates. Lorsque les préparations parentérales sont présentées en récipients multidoses, les précautions à prendre pour l'administration et tout particulièrement pour la conservation entre les prélèvements successifs sont indiquées.

*Conservateurs antimicrobiens*. Les préparations aqueuses qui sont préparées dans des conditions aseptiques et ne peuvent pas être soumises à une stérilisation terminale peuvent contenir un conservateur antimicrobien approprié à concentration convenable.

Il n'est pas ajouté de conservateur antimicrobien lorsque :

– le volume de la dose à injecter en une seule fois dépasse 15 mL, sauf exception justifiée,
– les préparations sont destinées à être injectées par des voies qui ne permettent pas, pour des raisons médicales, l'addition d'un conservateur antimicrobien, telles les voies intracisternale, péridurale, intrathécale ou toute autre voie donnant accès au liquide céphalorachidien, ou la voie intra- ou rétro-oculaire.

De telles préparations sont conditionnées en récipients unidoses.

PRODUCTION

Lors de la fabrication des préparations injectables contenant des particules en dispersion, des mesures sont prises pour assurer que la taille des particules est convenablement contrôlée et qu'elle est appropriée à l'usage prévu de la préparation.

*Préparations unidoses*. Le volume de préparation injectable contenu dans un récipient unidose correspond à une quantité de préparation suffisante pour permettre le prélèvement et l'administration de la dose nominale par une technique normale (*2.9.17*).

ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses**. Les suspensions injectables unidoses satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, à l'essai d'uniformité de teneur présenté ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les suspensions injectables unidoses dont la teneur en substance active est inférieure à 2 mg ou dans lesquelles la substance active représente moins de

Formes pharmaceutiques

2 pour cent de la masse totale satisfont à l'essai A d'uniformité de teneur des préparations unidoses. Si la préparation contient plusieurs substances actives, l'essai ne s'applique qu'à celles qui répondent aux conditions indiquées ci-dessus.

**Endotoxines bactériennes - pyrogènes**. Un essai des endotoxines bactériennes (*2.6.14*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, l'essai des pyrogènes (*2.6.8*) est effectué. Des recommandations sur la limite en endotoxines bactériennes sont indiquées dans le chapitre *2.6.14*.

*Préparations pour usage humain*. La préparation satisfait à un essai des endotoxines bactériennes (*2.6.14*) ou à l'essai des pyrogènes (*2.6.8*).

*Préparations pour usage vétérinaire*. Lorsque le volume à injecter en une seule fois est égal ou supérieur à 15 mL et équivaut à une dose égale ou supérieure à 0,2 mL par kilogramme de masse corporelle, la préparation satisfait à un essai des endotoxines bactériennes (*2.6.14*) ou à l'essai des pyrogènes (*2.6.8*).

*Toutes préparations*. Lorsque l'étiquette porte la mention « exempt d'endotoxines bactériennes » ou « apyrogène », respectivement, la préparation satisfait à un essai des endotoxines bactériennes (*2.6.14*) ou à l'essai des pyrogènes (*2.6.8*).

## Préparations pour perfusion

DÉFINITION

Les préparations pour perfusion sont des solutions aqueuses ou des émulsions en phase externe aqueuse, stériles et normalement rendues isotoniques au sang. Elles sont principalement destinées à être administrées en grand volume. Les préparations pour perfusion ne sont pas additionnées de conservateur antimicrobien.

Les solutions pour perfusion, examinées dans des conditions appropriées de visibilité, sont limpides et pratiquement exemptes de particules.

Les émulsions pour perfusion ne présentent pas de signe de séparation des phases.

PRODUCTION

Lors de la fabrication des préparations pour perfusion contenant des particules en dispersion, des mesures sont prises pour assurer que la taille des particules est convenablement contrôlée et qu'elle est appropriée à l'usage prévu de la préparation.

Le volume de préparation pour perfusion contenu dans le récipient est suffisant pour permettre le prélèvement et l'administration de la dose nominale par une technique normale (*2.9.17*).

ESSAI

**Endotoxines bactériennes - pyrogènes**. Les préparations pour perfusion satisfont à un essai des endotoxines bactériennes (*2.6.14*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, à l'essai des pyrogènes (*2.6.8*). Dans ce dernier cas, injectez à chaque lapin 10 mL de préparation par kilogramme de masse corporelle, sauf exception justifiée et autorisée.

## Préparations à diluer pour injection ou pour perfusion

DÉFINITION

Les préparations à diluer pour injection ou pour perfusion sont des solutions stériles destinées à être injectées ou administrées par perfusion après dilution. Elles sont diluées au volume prescrit avec un liquide spécifié, avant l'administration. Après dilution, elles satisfont aux exigences spécifiées pour les préparations injectables ou pour les préparations pour perfusion.

ESSAI

**Endotoxines bactériennes - pyrogènes**. Les préparations à diluer pour injection ou pour perfusion satisfont aux exigences indiquées pour les préparations injectables ou les préparations pour perfusion, après dilution au volume approprié.

## Poudres pour injection ou pour perfusion

DÉFINITION

Les poudres pour injection ou pour perfusion sont des substances solides stériles, réparties dans leurs récipients définitifs ; elles donnent rapidement, après agitation avec le volume prescrit d'un liquide stérile spécifié, soit une solution limpide et pratiquement exempte de particules, soit une suspension uniforme. Après dissolution ou dispersion, la préparation satisfait aux exigences spécifiées pour les préparations injectables ou pour les préparations pour perfusion.

Les substances cryodesséchées pour administration parentérale sont classées dans cette catégorie.

PRODUCTION

L'uniformité de teneur et l'uniformité de masse des produits cryodesséchés pour administration parentérale sont garanties par les contrôles en cours de production portant sur la quantité de solution introduite dans les ampoules avant cryodessiccation.

ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses**. Les poudres pour injection ou pour perfusion satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ou, dans les cas justifiés et autorisés, aux essais d'uniformité de teneur et/ou d'uniformité de masse présentés ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les poudres pour injection ou pour perfusion dont la teneur en substance active est inférieure à 2 mg ou dans lesquelles la substance active représente moins de 2 pour cent de la masse totale ou dont la masse unitaire est inférieure ou égale à 40 mg satisfont à l'essai A d'uniformité de teneur des préparations unidoses. Si la poudre contient plusieurs substances actives, l'essai ne s'applique qu'à celles qui répondent aux conditions indiquées ci-dessus.

**Uniformité de masse** (*2.9.5*). Les poudres pour injection ou pour perfusion satisfont à l'essai d'uniformité de masse des préparations unidoses. Lorsqu'un essai d'uniformité de teneur est prescrit pour toutes les substances actives, l'essai d'uniformité de masse n'est pas exigé.

**Endotoxines bactériennes - pyrogènes**. Les poudres pour injection ou pour perfusion satisfont aux exigences indiquées pour les préparations injectables ou les préparations pour perfusion, après mise en solution ou en suspension dans un volume approprié de liquide.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique le mode de préparation des préparations injectables et des préparations pour perfusion.

## Gels injectables

DÉFINITION

Les gels injectables sont des gels stériles dont la viscosité permet de garantir une libération modifiée de la (ou des) substance(s) active(s) au site d'injection.

## Implants

DÉFINITION

Les implants sont des préparations solides stériles, de taille et de forme appropriées à l'implantation parentérale. Ils assurent la libération de la (ou des) substance(s) active(s) sur une longue durée. Chaque dose est conditionnée en récipient stérile.

**01/2008:0523**

# PRÉPARATIONS PHARMACEUTIQUES PRESSURISÉES

## Praeparationes pharmaceuticae in vasis cum pressu

*Des exigences supplémentaires concernant les préparations conditionnées en récipients sous pression peuvent le cas échéant figurer dans d'autres monographies générales, par exemple les monographies Préparations pour inhalation (0671), Préparations liquides pour application cutanée (0927), Poudres pour application cutanée (1166), Préparations nasales (0676) et Préparations auriculaires (0652).*

DÉFINITION

Les préparations pharmaceutiques pressurisées sont des préparations conditionnées dans des récipients spéciaux, sous la pression d'un gaz. Elles contiennent une ou plusieurs substances actives. Elles sont libérées du récipient à l'aide d'une valve appropriée, sous forme d'un aérosol (dispersion de particules solides ou liquides dans un gaz, la taille des particules étant adaptée à l'usage prévu) ou d'un jet liquide ou semi-solide, par exemple une mousse. La pression nécessaire pour assurer la projection de la préparation est produite par des gaz propulseurs appropriés.

Les préparations pharmaceutiques pressurisées se présentent sous forme de solution, d'émulsion ou de suspension. Elles sont destinées soit à l'application locale sur la peau ou les muqueuses des divers orifices corporels soit à l'inhalation. Des excipients appropriés peuvent également être utilisés, par exemple des solvants, des solubilisants, des émulsifiants, des agents de suspension ou encore des lubrifiants destinés à éviter le blocage de la valve.

*Gaz propulseurs.* Ce sont des gaz liquéfiés sous pression, des gaz comprimés ou des liquides à point d'ébullition bas. Les gaz liquéfiés sont, par exemple, des hydrocarbures fluorés et des hydrocarbures de faible masse moléculaire (tels que le propane et le butane). Les gaz comprimés sont, par exemple, le dioxyde de carbone, l'azote et le protoxyde d'azote.

Des mélanges de gaz propulseurs peuvent être utilisés pour obtenir les propriétés optimales de solubilité et les caractéristiques souhaitables de pression, d'expulsion et de pulvérisation.

*Récipients.* Ils sont étanches et résistent à la pression interne ; ils peuvent être constitués de métal, de verre, de matière plastique ou d'une combinaison de ces matériaux. Ils doivent être compatibles avec leur contenu. Les récipients en verre sont protégés par une gaine en matière plastique.

*Dispositifs de pulvérisation.* La valve assure l'obturation étanche du récipient en période de repos et règle la distribution du contenu hors du récipient pendant l'utilisation. Les caractéristiques de pulvérisation dépendent du type de dispositif de pulvérisation utilisé, en particulier des dimensions, du nombre et de l'emplacement du ou des orifices. Certaines valves peuvent assurer une distribution continue ; d'autres, dites « valves doseuses », libèrent à chaque pression une quantité définie de produit.

Les matériaux constituant les valves qui sont en contact avec le contenu du récipient doivent être compatibles avec lui.

**Exigences applicables aux préparations pharmaceutiques pressurisées**. Les préparations pressurisées sont munies d'un dispositif d'administration adapté à l'usage prévu de la préparation.

Des exigences particulières peuvent être requises par exemple pour le choix des gaz propulseurs, la taille des particules et l'unité de prise délivrée par les valves doseuses.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- le mode d'emploi de la préparation,
- les précautions éventuelles à prendre,
- dans le cas de récipients à valve doseuse, la quantité de substance active par unité de pulvérisation.

**01/2008:0671**

# PRÉPARATIONS POUR INHALATION

## Inhalanda

DÉFINITION

Les préparations pour inhalation sont des préparations liquides ou solides destinées à être administrées dans les poumons sous forme de vapeurs ou d'aérosols, en vue d'une action locale ou systémique. Elles contiennent une ou plusieurs substances actives qui peuvent être dissoutes ou dispersées dans un excipient approprié.

Les préparations pour inhalation peuvent, suivant leur type, contenir des gaz propulseurs, des cosolvants, des diluants, des conservateurs antimicrobiens, des solubilisants, des stabilisants, etc. Ces excipients n'exercent aucun effet notable sur les fonctions de la muqueuse du tractus respiratoire et de ses cils.

Les préparations pour inhalation sont conditionnées en récipients multidoses ou unidoses. Lorsqu'elles sont conditionnées en récipients pressurisés, elles satisfont aux exigences de la monographie *Préparations pharmaceutiques pressurisées (0523)*.

Les préparations qui doivent être converties en aérosols (dispersion de particules solides ou liquides dans un gaz) sont administrées à l'aide de l'un des dispositifs suivants :

- nébuliseur,
- inhalateur pressurisé à valve doseuse,
- inhalateur à poudre.

PRODUCTION

Au cours du développement des préparations pour inhalation contenant un conservateur antimicrobien, l'efficacité du conservateur choisi est démontrée de manière à satisfaire l'Autorité compétente. Le texte *Efficacité de la conservation antimicrobienne* (*5.1.3*) décrit une méthode d'essai appropriée et indique des critères d'évaluation des propriétés antimicrobiennes de la formulation.

La taille des particules des aérosols est contrôlée de façon qu'une fraction significative des particules se dépose dans les poumons. Les caractéristiques particulaires des préparations pour inhalation sont déterminées par la méthode *Evaluation aérodynamique des particules fines* (*2.9.18*).

Pour évaluer l'uniformité de la dose délivrée d'un inhalateur multidose, il n'est pas suffisant d'effectuer l'essai sur un seul inhalateur. Le fabricant doit utiliser d'autres méthodes prenant en compte à la fois l'uniformité de dose inter- et intra-inhalateur. Une méthode appropriée fondée sur l'essai d'uniformité intra-inhalateur consiste à recueillir chacune des doses spécifiées en début, milieu et fin de collecte du nombre de doses indiqué sur l'étiquette, à partir d'inhalateurs distincts.

Les inhalateurs pressurisés à valve doseuse font l'objet de contrôles portant sur l'absence de fuites. Tous les inhalateurs font l'objet de contrôles portant sur la contamination particulaire externe.

ÉTIQUETAGE

Dans le cas des préparations à dose prémesurée, l'étiquette indique :

- la dose délivrée, sauf dans les cas où la dose a été établie en termes de dose prémesurée ou de dose préconditionnée,
- dans les cas appropriés, le nombre de décharges qui correspond à la dose minimale recommandée,
- le nombre de décharges par inhalateur.

L'étiquette indique, dans les cas appropriés, le nom de tout conservateur antimicrobien ajouté.

## Préparations liquides pour inhalation

3 catégories de préparations liquides pour inhalation peuvent être distinguées :

A. les préparations destinées à être converties en vapeurs,

B. les préparations liquides dispensées au moyen de nébuliseurs,

C. les préparations liquides dispensées au moyen d'inhalateurs pressurisés à valve doseuse.

Les préparations liquides pour inhalation sont des solutions ou des dispersions.

Les dispersions sont facilement dispersibles par agitation et demeurent suffisamment stables pour que la dose correcte soit délivrée. Des excipients appropriés peuvent être employés.

### A. PRÉPARATIONS DESTINÉES À ÊTRE CONVERTIES EN VAPEUR

*DÉFINITION*

Les préparations destinées à être converties en vapeur sont des solutions, des dispersions ou des préparations solides. Elles sont généralement ajoutées à de l'eau chaude et la vapeur générée est inhalée.



### B. PRÉPARATIONS LIQUIDES DISPENSÉES AU MOYEN DE NÉBULISEURS

*DÉFINITION*

Les préparations liquides pour inhalation destinées à être converties en aérosols au moyen de nébuliseurs opérant en continu ou de nébuliseurs à valve doseuse sont des solutions, des suspensions ou des émulsions. Des cosolvants ou solubilisants appropriés peuvent être employés afin d'augmenter la solubilité des substances actives.

Les préparations liquides présentées sous forme concentrée pour administration au moyen de nébuliseurs opérant en continu sont diluées au volume prescrit avec le liquide indiqué, avant emploi. Les préparations liquides dispensées au moyen de nébuliseurs peuvent également être préparées à partir de poudres.

Le pH des préparations liquides dispensées au moyen de nébuliseurs opérant en continu n'est ni inférieur à 3 ni supérieur à 8,5.

Les suspensions et émulsions sont facilement dispersibles par agitation et demeurent suffisamment stables pour que la dose correcte soit délivrée.

Les préparations aqueuses dispensées au moyen de nébuliseurs qui sont présentées en récipients multidoses peuvent contenir un conservateur antimicrobien approprié à concentration convenable, à moins que la préparation elle-même ne possède des propriétés antimicrobiennes adéquates.

Les nébuliseurs opérant en continu sont des dispositifs qui convertissent les liquides en aérosols sous l'effet de gaz sous pression ou de vibrations ultrasoniques, ou par d'autres méthodes. Ils permettent l'inhalation de la dose à un débit approprié et avec une taille de particules assurant le dépôt de la préparation dans les poumons.

Les nébuliseurs à valve doseuse sont des dispositifs qui convertissent les liquides en aérosols sous l'effet de gaz sous pression ou de vibrations ultrasoniques, ou par d'autres méthodes. Le volume de liquide à nébuliser est dosé de telle sorte que la dose d'aérosol puisse être inhalée en une seule inspiration.

### C. PRÉPARATIONS LIQUIDES DISPENSÉES AU MOYEN D'INHALATEURS PRESSURISÉS À VALVE DOSEUSE

*DÉFINITION*

Les préparations liquides dispensées au moyen d'inhalateurs pressurisés à valve doseuse sont des solutions, suspensions ou émulsions conditionnées en récipients comportant une valve doseuse et maintenues sous pression avec des gaz ou des mélanges de gaz propulseurs liquéfiés appropriés, qui peuvent également servir de solvants. Des cosolvants, des solubilisants et des stabilisants appropriés peuvent être ajoutés.

La dose délivrée est la dose que le patient reçoit de l'inhalateur. Pour certaines préparations, la dose est établie en termes de dose prémesurée. Celle-ci est déterminée par addition de la dose délivrée et de la quantité de préparation qui s'est déposée dans l'inhalateur. Elle peut également être déterminée directement.

*ESSAI*

*Dans le cas d'inhalateurs pressurisés à valve doseuse actionnés par inspiration, les conditions d'essai décrites ci-après peuvent nécessiter des modifications pour garantir que la valve est bien actionnée pendant l'essai.*

**Uniformité de la dose délivrée**. Les récipients s'utilisent généralement valve en bas. Pour ceux qui s'utilisent valve en haut, un essai équivalent est réalisé par des méthodes permettant de recueillir la totalité de la dose délivrée. Dans tous les cas, préparez l'inhalateur comme indiqué dans la notice d'utilisation.

L'appareil utilisé pour recueillir les doses doit être capable de retenir quantitativement la dose délivrée.

L'essai peut être réalisé avec l'appareillage et selon le mode opératoire suivants.

L'appareil (figure 0671.-1) se compose d'un support avec porte-filtre à mailles ouvertes (par exemple tamis d'acier inoxydable), d'un tube collecteur pouvant se visser ou se clipper sur le support et d'un adaptateur assurant une jonction étanche entre l'embout de l'inhalateur et le tube collecteur. L'adaptateur utilisé doit permettre d'aligner dans un même plan la face avant de l'embout et la face avant ou, selon le cas, l'épaulement en retrait de 2,5 mm du tube collecteur. Un connecteur assure la jonction avec un système comportant une pompe à vide et un régulateur de débit. La pompe est réglée de façon à aspirer l'air à travers l'ensemble du montage, y compris le filtre et l'inhalateur soumis à l'essai, à un débit de 28,3 L/min (± 5 pour cent). Il est important que l'aspiration de l'air à travers l'appareil s'effectue en continu, pour éviter des déperditions de préparation dans l'atmosphère. Le porte-filtre est conçu pour recevoir des filtres circulaires d'un diamètre de 25 mm. Le filtre et les autres éléments de l'appareillage doivent être constitués de matériaux compatibles avec la préparation et avec les solvants utilisés pour extraire les substances actives retenues sur le filtre. L'une des extrémités du tube collecteur sert à maintenir le filtre contre le porte-filtre. Après assemblage, la jonction entre les différents éléments de l'appareillage doit être étanche afin que, lorsque le vide est appliqué, tout l'air aspiré à travers le tube collecteur traverse l'inhalateur.

Sauf indication contraire dans la notice d'utilisation, agitez l'inhalateur pendant 5 s et actionnez une fois à perte. Déchargez l'inhalateur tête en bas dans l'appareil, en appuyant sur la valve le temps voulu pour obtenir une décharge complète. Effectuez ainsi le nombre de décharges nécessaire pour obtenir un échantillon correspondant à la dose minimale recommandée. Recueillez quantitativement le contenu de l'appareil et déterminez la quantité de substance active recueillie.

Opérez de même pour 2 autres doses.

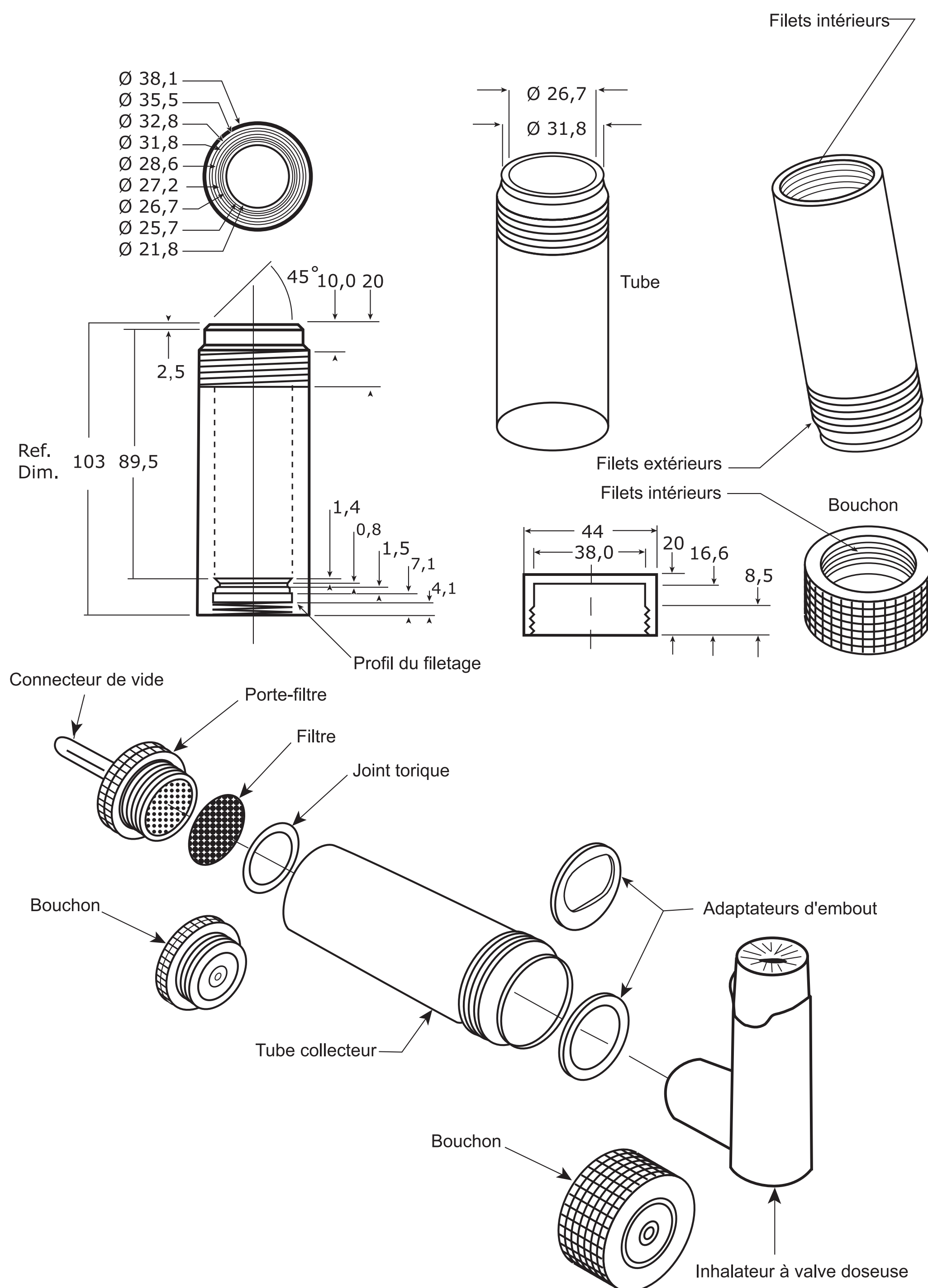



Figure 0671.-1. – *Appareillage utilisé pour collecter les doses dans le cas des inhalateurs pressurisés à valve doseuse*
*Dimensions en millimètres*

Actionnez l'appareil à perte, en attendant au moins 5 s entre les décharges, jusqu'à ce qu'il ne contienne plus que ($n$/2)+1 décharges, $n$ étant le nombre nominal de décharges indiqué sur l'étiquette, puis recueillez 4 doses en opérant comme décrit ci-dessus.

Actionnez l'appareil à perte, en attendant au moins 5 s entre les décharges, jusqu'à ce qu'il ne contienne plus que 3 doses, puis recueillez ces 3 doses en opérant comme décrit ci-dessus.

Dans le cas des préparations contenant plusieurs substances actives, l'essai d'uniformité de la dose délivrée est à effectuer pour chaque substance active.

Sauf exception justifiée et autorisée, la préparation satisfait à l'essai si, sur les 10 résultats obtenus, 9 sont compris entre 75 pour cent et 125 pour cent et tous entre 65 pour cent et 135 pour cent de la valeur moyenne. Si 2 ou 3 valeurs se situent en dehors des limites de 75 à 125 pour cent, répétez l'essai sur 2 autres inhalateurs. Au maximum 3 des 30 valeurs obtenues se situent en dehors des limites de 75 à 125 pour cent et aucune ne se situe en dehors des limites de 65 à 135 pour cent.

**Dose des particules fines**. Déterminez la dose des particules fines au moyen de l'appareillage et suivant le mode opératoire décrits dans la méthode *Evaluation aérodynamique des particules fines* (*2.9.18 - Appareil C, D ou E*).

**Nombre de décharges par inhalateur**. Prenez un inhalateur et déchargez son contenu à perte en actionnant la valve à intervalles d'au minimum 5 s. Le nombre total de décharges délivrées par l'inhalateur n'est pas inférieur à la valeur indiquée sur l'étiquette (cet essai peut être combiné à l'essai d'uniformité de la dose délivrée).

Formes pharmaceutiques

Formes pharmaceutiques

# Poudres pour inhalation

## DÉFINITION

Les poudres pour inhalation sont présentées sous forme de poudres unidoses ou de poudres multidoses. Leurs substances actives peuvent être combinées à un excipient approprié destiné à en faciliter l'utilisation. Elles sont généralement administrées au moyen d'inhalateurs à poudre. Dans le cas des inhalateurs à doses prémesurées, l'inhalateur est chargé avec des unités de prise telles que des capsules ou autres formes pharmaceutiques appropriées. Dans le cas des inhalateurs comportant un réservoir de poudre, la délivrance des doses unitaires s'effectue grâce à un mécanisme doseur intégré à l'inhalateur.

La dose délivrée est la dose que le patient reçoit de l'inhalateur. Pour certaines préparations, la dose est établie en termes de dose prémesurée ou de dose préconditionnée. La dose prémesurée est déterminée par addition de la dose délivrée et de la quantité de préparation qui s'est déposée dans l'inhalateur. Elle peut également être déterminée directement.

## ESSAI

**Uniformité de la dose délivrée**. Dans tous les cas, préparez l'inhalateur comme indiqué dans la notice d'utilisation. L'appareil utilisé pour collecter les doses doit être capable de recueillir quantitativement la dose délivrée. Un tube collecteur similaire à celui décrit pour l'évaluation des inhalateurs pressurisés à valve doseuse peut être utilisé, à condition que les dimensions du tube et du filtre soient adaptées au débit mesuré. Les spécifications d'un tube approprié sont données dans le tableau 0671.-1. Connectez le tube à un circuit hydraulique selon le schéma de montage représenté figure 0671.-2 et comme décrit dans le tableau 0671.-1.

Tableau 0671.-1. – *Spécifications des éléments de l'appareillage utilisé pour les inhalateurs à poudre et représenté figure 0671.-2*

| Code | Elément | Description |
|---|---|---|
| A | Tube collecteur | Tube capable de recueillir quantitativement la dose délivrée, par exemple tube collecteur comme décrit figure 0671.-1 mais avec les dimensions suivantes : d.i. 34,85 mm × *l* 12 cm (par exemple élément XX40 047 00 de Millipore Corporation, Bedford, MA 01732 avec tube de sortie modifié, d.i. ≥ 8 mm, associé à l'élément Gelman 61631) ou équivalent. |
| B | Filtre | Filtre de 47 mm, par exemple filtre de fibre de verre A/E (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI 48106) ou équivalent. |
| C | Connecteur | d.i. ≥ 8 mm, par exemple manchon métallique court avec tubulure latérale de faible diamètre vers P3. |
| D | Tube à vide | Un morceau de tube approprié de d.i. ≥ 8 mm et de volume interne égal à 25 ± 5 mL. |
| E | Electrovanne | Electrovanne 2/2 (2 voies, 2 orifices) avec orifice minimum de d.i. ≥ 8 mm et durée d'ouverture ≤ 100 ms (par exemple type 256-A08, Bürkert GmbH, D-74653 Ingelfingen) ou équivalent. |
| F | Pompe à vide | Pompe capable d'instaurer le débit requis à travers l'appareil assemblé, avec l'inhalateur à poudre placé dans l'adaptateur d'embout (par exemple produit type 1023, 1423 ou 2565, Gast Manufacturing Inc., Benton Harbor, MI 49022) ou équivalent. La pompe est connectée à l'électrovanne au moyen d'un tube à vide court et/ou de grande section (d.i. ≥ 10 mm) et de connecteurs permettant de réduire la capacité de pompage requise. |
| G | Minuteur | Minuteur capable de piloter l'électrovanne pendant le temps requis (par exemple type G814, RS Components International, Corby, NN17 9RS, UK) ou équivalent. |
| P1 | Prise de pression | d.i. 2,2 mm, d.e. 3,1 mm, installée à 59 mm de l'entrée, de niveau avec la surface interne du tube collecteur, avec centrage et sans bavure.<br>Le manomètre P1 ne doit jamais rester ouvert à l'atmosphère. |
| P1<br>P2<br>P3 | Manomètres | Manomètre mesurant la pression différentielle par rapport à l'atmosphère (P1) ou la pression absolue (P2 et P3). |
| H | Régulateur de débit | Robinet réglable avec maximum *Cv* ≥ 1 (par exemple type 8FV12LNSS, Parker Hannifin plc, Barnstaple, EX31 1NP, UK) ou équivalent. |

Sauf indication contraire, déterminez les conditions d'essai (débit et durée) à l'aide du tube collecteur de doses, du circuit hydraulique associé, d'un manomètre différentiel approprié et d'un débitmètre volumétrique approprié, étalonné pour le courant gazeux en sortie de débitmètre, selon la procédure suivante.

Préparez l'inhalateur pour l'emploi et connectez-le à l'entrée de l'appareillage d'essai au moyen d'un adaptateur assurant une jonction étanche entre l'embout de l'inhalateur et le tube collecteur. L'adaptateur utilisé doit permettre d'aligner dans un même plan la face avant de l'embout et celle du tube collecteur. Branchez l'une des bornes d'un manomètre différentiel au point de lecture P1 (figure 0671.-2) et laissez l'autre en libre communication avec l'atmosphère. Mettez la pompe en marche, ouvrez l'électrovanne et réglez le débit au moyen du régulateur de débit de façon à appliquer à travers l'inhalateur une pression différentielle (lue sur le manomètre différentiel) de 4,0 kPa (40,8 cm $H_2O$). Enlevez l'inhalateur de l'adaptateur et, sans toucher au régulateur de débit, branchez un débitmètre à l'entrée de l'appareillage d'essai. Utilisez un débitmètre étalonné pour le courant gazeux sortant, ou calculez le débit gazeux en sortie du débitmètre ($Q_{out}$) d'après la loi des gaz parfaits. Dans le cas d'un débitmètre étalonné pour le courant gazeux entrant ($Q_{in}$), utilisez l'expression suivante :

$$Q_{out} = \frac{Q_{in} \times P_0}{P_0 - \Delta P}$$

$P_0$ = pression atmosphérique,

$\Delta P$ = perte de charge dans le débitmètre.

Si le débit est supérieur à 100 L/min, ajustez-le au moyen du régulateur de débit de façon à le ramener à 100 L/min (± 5 pour cent). Notez la valeur du débit-volume de sortie ; cette valeur est définie comme le débit d'essai $Q_{out}$, en litres par minute. La durée d'essai $T$ est définie comme le temps, en secondes, correspondant au passage de 4 L d'air à travers l'embout de l'inhalateur au débit d'essai $Q_{out}$.

Vérifiez que le régime critique est instauré dans le régulateur de débit, avec l'inhalateur en place et au débit d'essai $Q_{out}$ établi, en mesurant la pression absolue à l'entrée et à la sortie du régulateur (points de mesure P2 et P3 de la figure 0671.-2). Un rapport P3/P2 inférieur ou égal à 0,5 indique que le débit est critique. Si le débit critique n'est pas atteint, remplacez la pompe par une pompe plus puissante et déterminez à nouveau le débit d'essai.

*Systèmes à doses préconditionnées.* Préparez l'inhalateur pour l'emploi comme indiqué dans la notice d'utilisation et connectez-le à l'appareillage d'essai au moyen d'un adaptateur assurant une bonne étanchéité. Créez un flux d'air à travers l'inhalateur en appliquant les conditions prédéterminées. Répétez l'opération le nombre de fois nécessaire pour obtenir un échantillon correspondant à la dose minimale recommandée. Recueillez quantitativement le contenu de l'appareil et déterminez la quantité de substance active collectée.

Opérez de même pour 9 autres doses.

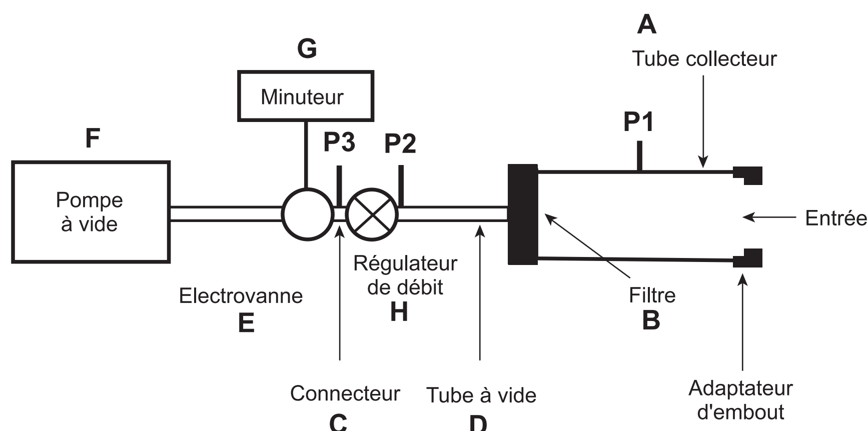



Figure 0671.-2. – *Appareillage permettant de mesurer l'uniformité de la dose délivrée par les inhalateurs à poudre*

*Systèmes à réservoir*. Préparez l'inhalateur pour l'emploi comme indiqué dans la notice d'utilisation et connectez-le à l'appareillage d'essai au moyen d'un adaptateur assurant une bonne étanchéité. Créez un flux d'air à travers l'inhalateur en appliquant les conditions prédéterminées. Répétez l'opération le nombre de fois nécessaire pour obtenir un échantillon correspondant à la dose minimale recommandée. Recueillez quantitativement le contenu de l'appareil et déterminez la quantité de substance active collectée.

Opérez de même pour 2 autres doses.

Actionnez l'inhalateur à perte jusqu'à ce qu'il ne contienne plus que $(n/2)+1$ décharges, $n$ étant le nombre nominal de décharges indiqué sur l'étiquette. Si nécessaire, laissez reposer pour décharger l'électricité statique. Recueillez 4 doses en opérant comme décrit ci-dessus.

Actionnez l'inhalateur à perte jusqu'à ce qu'il ne contienne plus que 3 doses. Si nécessaire, laissez reposer pour décharger l'électricité statique. Recueillez ces 3 doses en opérant comme décrit ci-dessus.

Dans le cas des préparations contenant plusieurs substances actives, l'essai d'uniformité de la dose délivrée est à effectuer pour chaque substance active.

*Résultats*. La préparation satisfait à l'essai si, sur les 10 résultats obtenus, 9 sont compris entre 75 pour cent et 125 pour cent et tous entre 65 pour cent et 135 pour cent de la valeur moyenne. Si 2 ou 3 valeurs se situent en dehors des limites de 75 à 125 pour cent, répétez l'essai sur 2 autres inhalateurs. Au maximum 3 des 30 valeurs obtenues se situent en dehors des limites de 75 à 125 pour cent et aucune ne se situe en dehors des limites de 65 à 135 pour cent.

Dans certains cas justifiés et autorisés, ces intervalles peuvent être étendus, mais aucune valeur ne doit être supérieure à 150 pour cent ou inférieure à 50 pour cent de la valeur moyenne.

**Dose des particules fines**. Déterminez la dose des particules fines au moyen de l'appareillage et suivant le mode opératoire décrits dans la méthode *Evaluation aérodynamique des particules fines* (*2.9.18 - Appareil C, D ou E*).

**Nombre de décharges par inhalateur pour les inhalateurs multidoses**. Videz entièrement un inhalateur, dose par dose, au débit prédéterminé. Notez le nombre de décharges obtenu. Le nombre total de doses délivrées n'est pas inférieur à la valeur indiquée sur l'étiquette (cet essai peut être combiné à l'essai d'uniformité de la dose délivrée).

**01/2008:1116**

# PRÉPARATIONS POUR IRRIGATION

## Praeparationes ad irrigationem

DÉFINITION

Les préparations pour irrigation sont des préparations aqueuses stériles de grand volume destinées à l'irrigation des cavités, des lésions et des surfaces corporelles, par exemple au cours d'interventions chirurgicales.

Les préparations pour irrigation peuvent être des solutions préparées en dissolvant une ou plusieurs substances actives, des électrolytes ou des substances osmotiquement actives dans de l'*Eau pour préparations injectables (0169)*, ou peuvent être constituées de cette eau seule. Dans ce dernier cas, la préparation peut être étiquetée « Eau pour irrigation ». Les solutions pour irrigation sont généralement ajustées pour assurer l'isotonie au sang.

Examinées dans des conditions appropriées de visibilité, les préparations pour irrigation sont limpides et pratiquement exemptes de particules.

Les préparations pour irrigation sont conditionnées en récipients unidoses. Les récipients et systèmes de fermeture satisfont aux exigences définies pour les récipients destinés aux préparations pour administration parentérale (*3.2.1* et *3.2.2*), mais l'orifice de sortie des récipients n'est pas adaptable aux équipements d'administration intraveineuse, ce qui interdit l'administration de la préparation pour irrigation avec de tels équipements.

PRODUCTION

Les préparations pour irrigation sont préparées à partir de produits et par des méthodes propres à assurer leur stérilité et à empêcher l'introduction de contaminants et la croissance de microorganismes ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Méthodes de préparation des produits stériles* (*5.1.1*).

Durant le développement, il doit être démontré qu'il est possible de prélever le contenu nominal du récipient.

ESSAI

**Stérilité** (*2.6.1*). Les préparations pour irrigation satisfont à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 0,5 UI/mL.

**Pyrogènes** (*2.6.8*). Les préparations auxquelles aucune méthode validée de détection des endotoxines bactériennes ne peut être appliquée satisfont à l'essai des pyrogènes. Sauf exception justifiée et autorisée, injectez à chaque lapin 10 mL de préparation par kilogramme de masse corporelle.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– que la préparation ne doit pas être utilisée en injection,
– que la préparation doit être utilisée en une seule fois et que les quantités non utilisées sont à jeter.

**01/2008:1145**

# PRÉPARATIONS RECTALES

## Rectalia

DÉFINITION

Les préparations rectales sont des préparations destinées à être administrées par voie rectale en vue d'une action locale ou systémique, ou à des fins de diagnostic.

Dans les cas appropriés, les récipients destinés aux préparations rectales satisfont aux exigences relatives aux matériaux utilisés dans la fabrication des récipients (*3.1* et sous-chapitres) et aux récipients (*3.2* et sous-chapitres).

Plusieurs catégories de préparations rectales peuvent être distinguées :

– les suppositoires,
– les capsules rectales,
– les solutions, émulsions et suspensions rectales,
– les poudres et comprimés pour solutions ou suspensions rectales,
– les préparations rectales semi-solides,
– les mousses rectales,
– les tampons rectaux.

PRODUCTION

Au cours du développement des préparations rectales dont la formulation comporte un conservateur antimicrobien, la nécessité et l'efficacité du conservateur choisi doit être démontrée de manière à satisfaire l'Autorité compétente. Le chapitre *5.1.3 Efficacité de la conservation antimicrobienne* décrit une méthode d'essai appropriée et indique des critères d'évaluation des propriétés antimicrobiennes de la formulation.

Au cours du développement, il doit être démontré qu'il est possible de prélever le contenu nominal du récipient des préparations rectales liquides et semi-solides présentées en récipients unidoses.

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des préparations rectales, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le chapitre *5.1.4 Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques*.

Lors de la fabrication des préparations rectales liquides et semi-solides contenant des particules en dispersion, des mesures sont prises pour assurer que la taille des particules est convenablement contrôlée et qu'elle est adaptée à l'usage prévu de la préparation.

ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses** (*2.9.40*). Les préparations rectales unidoses liquides et les préparations rectales unidoses semi-solides satisfont à l'essai. Les préparations rectales unidoses solides satisfont à l'essai ou, dans les cas justifiés et autorisés, aux essais d'uniformité de teneur et/ou d'uniformité de masse présentés ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les préparations rectales unidoses solides dont la teneur en substance active est inférieure à 2 mg ou dans lesquelles la substance active représente moins de 2 pour cent de la masse totale satisfont aux essais A (comprimés) ou B (suppositoires, capsules rectales). Si la préparation contient plusieurs substances actives, l'essai ne s'applique qu'à celles qui répondent aux conditions indiquées ci-dessus.

**Uniformité de masse** (*2.9.5*). Les préparations rectales unidoses solides satisfont à l'essai. Lorsqu'un essai d'uniformité de teneur est prescrit pour toutes les substances actives, l'essai d'uniformité de masse n'est pas exigé.

**Dissolution**. Dans le cas des préparations rectales unidoses solides, il peut être nécessaire d'effectuer un essai approprié pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante, par exemple *2.9.42 Essai de dissolution des formes solides lipophiles*.

Lorsqu'un essai de dissolution est prescrit, un essai de désagrégation peut ne pas être exigé.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique le nom de tout conservateur antimicrobien ajouté.

## Suppositoires

DÉFINITION

Les suppositoires sont des préparations unidoses solides. Leur forme, volume et consistance sont adaptés à l'administration par voie rectale.

Ils contiennent 1 ou plusieurs substances actives dispersées ou dissoutes dans une base appropriée qui est, suivant le cas, soluble ou dispersible dans l'eau ou fond à la température du corps. Ils peuvent également contenir, si nécessaire, d'autres excipients tels que des agents diluants, absorbants, tensioactifs, lubrifiants, des conservateurs antimicrobiens et des colorants autorisés par l'Autorité compétente.

PRODUCTION

Les suppositoires sont obtenus par compression ou par moulage. Si nécessaire, la ou les substances actives sont préalablement broyées et tamisées sur un tamis approprié. Dans le cas de suppositoires moulés, la masse médicamenteuse rendue suffisamment fluide par action de la chaleur est coulée dans des alvéoles appropriées, et le suppositoire se solidifie en refroidissant. Divers excipients adaptés à ce mode de fabrication sont utilisés, tels que beurre de cacao, glycérides hémi-synthétiques solides, macrogols et mélanges à consistance de gel composés par exemple de gélatine, de glycérol et d'eau. Une détermination du temps de ramollissement des suppositoires lipophiles (*2.9.22*) est effectuée.

Dans le cas des suppositoires adaptés à une libération modifiée ou à une action locale prolongée, un essai approprié est réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante.

Lors de la fabrication des suppositoires contenant des substances actives sous forme dispersée, des mesures sont prises pour s'assurer que la taille des particules est convenablement contrôlée et qu'elle est appropriée.

ESSAI

**Désagrégation** (*2.9.2*). A moins qu'ils ne soient adaptés à une libération modifiée de la substance active ou à une action locale prolongée, les suppositoires satisfont à l'essai. Examinez l'état des suppositoires à excipient gras après 30 min et celui des suppositoires à excipient hydrosoluble après 60 min, sauf exception justifiée et autorisée.

## Capsules rectales

DÉFINITION

Les capsules rectales sont des préparations unidoses solides se présentant sur le plan général comme les capsules à enveloppe molle comme définies dans la monographie *Capsules (0016)*,

mais pouvant être recouvertes d'un enrobage lubrifiant. Les capsules rectales sont allongées, elles sont lisses et leur aspect extérieur est uniforme.

PRODUCTION

Dans le cas des capsules rectales adaptées à une libération modifiée ou à une action locale prolongée, un essai approprié est réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante.

ESSAI

**Désagrégation** (*2.9.2*). A moins qu'elles ne soient adaptées à une libération modifiée de la substance active ou à une action locale prolongée, les capsules rectales satisfont à l'essai. Examinez l'état des capsules rectales après 30 min, sauf exception justifiée et autorisée.

## Solutions, émulsions et suspensions rectales

DÉFINITION

Les solutions, émulsions et suspensions rectales sont des préparations liquides destinées à l'administration rectale. Elles ont une action locale ou systémique, ou peuvent être utilisées aux fins de diagnostic.

Les solutions, émulsions et suspensions rectales sont conditionnées en récipients unidoses et contiennent 1 ou plusieurs substances actives dissoutes ou dispersées dans de l'eau, du glycérol, des macrogols ou d'autres solvants appropriés. Les émulsions peuvent présenter des signes de séparation des phases, mais sont facilement redispersées par agitation. Les suspensions peuvent présenter un sédiment, qu'il est facile de disperser par agitation de façon à obtenir une suspension suffisamment stable pour permettre l'administration de la dose voulue.

Les solutions, émulsions et suspensions rectales peuvent contenir des excipients destinés, par exemple, à ajuster la viscosité de la préparation, à adapter ou stabiliser le pH, à augmenter la solubilité de la ou des substances actives ou à stabiliser la préparation. Ces excipients ne nuisent pas à l'action médicamenteuse recherchée et, aux concentrations choisies, ne provoquent pas d'irritation locale notable.

Les solutions, émulsions et suspensions rectales sont présentées en récipients d'une contenance de 2,5 mL à 2000 mL. Le récipient est de forme adaptée à l'application de la préparation dans le rectum ou est muni d'un dispositif approprié.

## Poudres et comprimés pour solutions ou suspensions rectales

DÉFINITION

Les poudres et comprimés destinés à la préparation de solutions ou suspensions rectales sont des préparations unidoses qui sont dissoutes ou dispersées dans l'eau ou d'autres solvants appropriés au moment de l'administration. Ils peuvent contenir des excipients destinés à faciliter la dissolution ou la dispersion ou à empêcher l'agrégation des particules.

Après dissolution ou mise en suspension, la préparation satisfait, selon le cas, aux exigences concernant les solutions ou les suspensions rectales.

ESSAI

**Désagrégation** (*2.9.1*). Dans le cas de comprimés pour solutions ou suspensions rectales, opérez comme décrit dans l'essai, mais en utilisant de l'*eau R* à 15-25 °C et 6 comprimés. Examinez l'état des comprimés après 3 min. Les comprimés satisfont à l'essai si les 6 sont désagrégés.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le mode de préparation de la solution ou de la suspension rectale,
– les conditions et la durée de conservation de la solution ou de la suspension après reconstitution.

## Préparations rectales semi-solides

DÉFINITION

Les préparations rectales semi-solides sont des pommades, crèmes ou gels.

Elles se présentent souvent sous la forme de préparations unidoses dispensées au moyen de récipients munis d'un dispositif approprié.

Les préparations rectales semi-solides satisfont aux exigences de la monographie *Préparations semi-solides pour application cutanée (0132)*.

## Mousses rectales

DÉFINITION

Les mousses rectales satisfont aux exigences de la monographie *Mousses médicamenteuses (1105)*.

## Tampons rectaux

DÉFINITION

Les tampons rectaux sont des préparations unidoses solides destinées à être introduites dans la partie inférieure du rectum pour une durée limitée.

Ils satisfont aux exigences de la monographie *Tampons médicamenteux (1155)*.

**04/2010:0132**

# PRÉPARATIONS SEMI-SOLIDES POUR APPLICATION CUTANÉE

## Praeparationes molles ad usum dermicum

*Les exigences de la présente monographie s'appliquent à toutes les préparations semi-solides pour application cutanée. Dans le cas de préparations semi-solides destinées à être appliquées sur des surfaces particulières ou sur les muqueuses, elles peuvent le cas échéant être complétées par des exigences spécifiques figurant dans d'autres monographies générales, par exemple les monographies Préparations auriculaires (0652), Préparations nasales (0676), Préparations ophtalmiques (1163), Préparations rectales (1145) et Préparations vaginales (1164).*

DÉFINITION

Les préparations semi-solides pour application cutanée sont formulées en vue d'une libération locale ou transdermique de substances actives, ou pour leur action émolliente ou protectrice. Elles présentent un aspect homogène.

Les préparations semi-solides pour application cutanée sont constituées d'un excipient, simple ou composé, dans lequel sont habituellement dissous ou dispersés 1 ou plusieurs substances actives. Selon sa composition, cet excipient peut avoir une influence sur l'activité de la préparation.

Les excipients utilisés peuvent être des substances d'origine naturelle ou synthétique, et peuvent être monophases ou multiphases. Selon la nature de l'excipient, la préparation peut avoir des propriétés hydrophiles ou hydrophobes. La préparation peut également contenir d'autres excipients appropriés tels que des agents antimicrobiens, des antioxydants, des agents stabilisants, des émulsifiants, des épaississants et des agents de pénétration.

Les préparations semi-solides pour application cutanée destinées à être appliquées sur une peau gravement lésée sont stériles.

Formes pharmaceutiques

Dans les cas appropriés, les récipients destinés aux préparations semi-solides pour application cutanée satisfont aux exigences relatives aux *Matériaux utilisés dans la fabrication des récipients* (*3.1* et sous-chapitres) et aux *Récipients* (*3.2* et sous-chapitres).

Plusieurs catégories de préparations semi-solides pour application cutanée peuvent être distinguées :

- les pommades,
- les crèmes,
- les gels,
- les pâtes,
- les cataplasmes,
- les emplâtres médicamenteux,
- les dispositifs cutanés.

Selon leur structure, les pommades, crèmes et gels présentent généralement un comportement viscoélastique et les propriétés des fluides non-newtoniens (par exemple de type plastique, pseudoplastique ou thixotrope) sous des vitesses de cisaillement élevées. Les pâtes présentent souvent des propriétés de dilatance.

PRODUCTION

Au cours du développement des préparations semi-solides pour application cutanée dont la formulation comporte un conservateur antimicrobien, la nécessité et l'efficacité du conservateur choisi doivent être démontrées de manière à satisfaire l'Autorité compétente. Le texte *Efficacité de la conservation antimicrobienne* (*5.1.3*) décrit une méthode d'essai appropriée et indique des critères d'évaluation des propriétés antimicrobiennes de la formulation. Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des préparations semi-solides pour application cutanée, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques* (*5.1.4*). Les préparations semi-solides pour application cutanée stériles sont préparées à partir de produits et par des méthodes propres à assurer leur stérilité et à empêcher l'introduction de contaminants et la croissance de microorganismes ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Méthodes de préparation des produits stériles* (*5.1.1*).

Au cours du développement, il doit être démontré qu'il est possible de prélever le contenu nominal du récipient des préparations semi-solides pour application cutanée présentées en récipients unidoses.

Lors de la fabrication des préparations semi-solides pour application cutanée, des mesures adéquates sont prises pour assurer l'obtention des propriétés rhéologiques recherchées. Dans les cas appropriés, les essais suivants, d'application non obligatoire, peuvent être effectués : mesure de la consistance par pénétrométrie (*2.9.9*), viscosité (viscosité apparente) (*2.2.10*) et un essai approprié peut être réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante.

Lors de la fabrication de préparations semi-solides pour application cutanée contenant 1 ou plusieurs substances actives qui ne sont pas dissoutes dans l'excipient (par exemple émulsions ou suspensions), des mesures sont prises pour assurer une homogénéité adéquate de la préparation à administrer.

Lors de la fabrication des préparations semi-solides pour application cutanée contenant des particules en dispersion, des mesures sont prises pour assurer que la taille des particules est convenablement contrôlée et qu'elle est appropriée à l'usage prévu de la préparation.

ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses**. Les préparations semi-solides conditionnées soit en récipients unidoses représentant 1 dose de médicament soit en récipients doseurs, et destinées à la libération transdermique de substances actives en vue d'un effet systémique, satisfont à l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*). Les préparations semi-solides dans lesquelles la (les) substance(s) active(s) est (sont) dissoute(s) satisfont à l'essai de variation de masse ; les préparations semi-solides dans lesquelles la (les) substance(s) active(s) est (sont) en suspension satisfont à l'essai d'uniformité de teneur. Suivez la procédure indiquée pour les formes pharmaceutiques liquides. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans ces formes pharmaceutiques ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

Dans le cas de préparations semi-solides présentées en récipients doseurs et dans lesquelles la (les) substance(s) active(s) est (sont) dissoute(s), procédez de la façon suivante. Actionnez 1 fois à perte. Attendez au minimum 5 s, puis agitez, si nécessaire, pendant 5 s et actionnez à nouveau 1 fois à perte. Répétez l'opération encore 3 fois. Pesez le récipient, actionnez 1 fois à perte et pesez à nouveau le récipient. Calculez la différence entre les 2 masses obtenues. Opérez de même avec 9 autres récipients. Déterminez la variation de masse (*2.9.40*).

Dans le cas de préparations semi-solides présentées en récipients doseurs et dans lesquelles la(les) substance(s) active(s) est (sont) en suspension, procédez de la façon suivante. Utilisez un appareillage permettant de recueillir quantitativement la dose libérée par le récipient doseur. Agitez 1 récipient pendant 5 s et actionnez 1 fois à perte. Attendez au minimum 5 s, puis agitez pendant 5 s et actionnez à nouveau 1 fois à perte. Répétez l'opération encore 3 fois. Au bout de 2 s, déchargez 1 dose de la préparation dans un récipient de collecte. Recueillez le contenu du récipient de collecte par plusieurs rinçages successifs. Déterminez la teneur en substance active du mélange des produits de rinçage. Opérez de même avec 9 autres récipients. Déterminez l'uniformité de teneur (*2.9.40*).

**Stérilité** (*2.6.1*). Lorsque l'étiquette indique que la préparation est stérile, celle-ci satisfait à l'essai de stérilité.

CONSERVATION

En récipient étanche si la préparation contient de l'eau ou d'autres composants volatils. Si la préparation est stérile, elle est conservée en récipient stérile, étanche, à fermeture inviolable.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- le nom de tout excipient,
- dans les cas appropriés, que la préparation est stérile.

## Pommades

DÉFINITION

Les pommades se composent d'un excipient monophase dans lequel peuvent être dispersés des liquides ou des solides.

*Pommades hydrophobes*

Les pommades hydrophobes ne peuvent absorber que de petites quantités d'eau. Les excipients les plus communément employés pour la formulation de telles pommades sont la paraffine solide, la paraffine liquide, la paraffine liquide légère, les huiles végétales, les graisses animales, les glycérides synthétiques, les cires et les polyalkylsiloxanes liquides.

*Pommades absorbant l'eau*

Ces pommades peuvent absorber des quantités plus importantes d'eau et conduire par conséquent à l'obtention d'émulsions eau-dans-huile ou huile-dans-eau, après homogénéisation, selon la nature des agents émulsifiants. Des agents émulsifiants eau-dans-huile tels que des alcools de graisse de laine, des esters de sorbitan, des monoglycérides, des alcools gras, ou des agents émulsifiants huile-dans-eau tels que des alcools gras sulfatés, des polysorbates, l'éther cétostéarylique de macrogol ou des esters d'acides gras et de macrogols peuvent être utilisés dans ce but. Les excipients utilisés sont ceux d'une pommade hydrophobe.

Formes pharmaceutiques

*Pommades hydrophiles*

Les pommades hydrophiles sont des préparations dont l'excipient est miscible à l'eau. Cet excipient est habituellement constitué de mélanges de macrogols (polyéthylèneglycols) liquides et solides. Il peut contenir des quantités appropriées d'eau.

## Crèmes

DÉFINITION

Les crèmes sont des préparations multiphases composées d'une phase lipophile et d'une phase aqueuse.

*Crèmes lipophiles*

Dans les crèmes lipophiles, la phase externe est la phase lipophile. Ces préparations contiennent généralement des agents émulsifiants eau-dans-huile tels que des alcools de graisse de laine, des esters de sorbitan et des monoglycérides.

*Crèmes hydrophiles*

Dans les crèmes hydrophiles, la phase externe est la phase aqueuse. Ces préparations contiennent des agents émulsifiants huile-dans-eau tels que des savons de sodium ou de trolamine, des alcools gras sulfatés, des polysorbates et des esters d'acides et d'alcools gras polyoxyéthylénés, éventuellement en combinaison avec des agents émulsifiants eau-dans-huile.

## Gels

DÉFINITION

Les gels sont constitués de liquides gélifiés à l'aide d'agents gélifiants appropriés.

*Gels lipophiles*

Les gels lipophiles (oléogels) sont des préparations dont l'excipient est habituellement de la paraffine liquide additionnée de polyéthylène, ou des huiles grasses gélifiées par de la silice colloïdale ou des savons d'aluminium ou de zinc.

*Gels hydrophiles*

Les gels hydrophiles (hydrogels) sont des préparations dont l'excipient est habituellement de l'eau, du glycérol ou du propylèneglycol gélifiés à l'aide d'agents gélifiants appropriés tels que des poloxamères, de l'amidon, des dérivés de la cellulose, des carbomères ou des silicates de magnésium-aluminium.

## Pâtes

DÉFINITION

Les pâtes sont des préparations semi-solides pour application cutanée contenant de fortes proportions de poudres finement dispersées dans l'excipient.

## Cataplasmes

DÉFINITION

Les cataplasmes se composent d'un excipient hydrophile rétenteur de chaleur, dans lequel sont dispersées des substances actives solides ou liquides. Ils sont généralement étalés en couche épaisse sur un pansement approprié et chauffés avant application sur la peau.

## Emplâtres médicamenteux

DÉFINITION

Les emplâtres médicamenteux sont des préparations souples contenant 1 ou plusieurs substances actives. Ils sont destinés à être placés sur la peau en vue de maintenir un contact étroit entre la peau et la ou les substances actives, de telle sorte que ceux-ci puissent être absorbés lentement ou agir comme agents protecteurs ou kératolytiques.

Ils consistent en une base adhésive, colorée ou non, contenant 1 ou plusieurs substances actives, étalée en une couche uniforme sur un support approprié constitué d'un matériau naturel ou synthétique. Les emplâtres médicamenteux ne sont pas responsables d'irritations ou de sensibilisation de la peau. Les bases adhésives sont recouvertes d'une bande de protection appropriée qui est retirée avant application sur la peau. Lorsqu'elle est retirée, la bande protectrice n'entraîne pas la préparation avec elle.

Les emplâtres médicamenteux sont soit présentés sous des dimensions permettant un usage direct, soit sous forme de bandes destinées à être coupées avant utilisation. Ils adhèrent fermement à la peau par simple pression et peuvent être retirés facilement sans causer de blessure notable de la peau ni de séparation de la préparation et du support.

ESSAI

**Dissolution**. Un essai approprié peut être nécessaire afin de démontrer que la libération de la ou des substances actives est adéquate ; à cette fin l'un des essais décrits dans la méthode *Essai de dissolution des dispositifs transdermiques* (*2.9.4*) peut être effectué.

## Dispositifs cutanés

DÉFINITION

Les dispositifs cutanés sont des préparations souples contenant 1 ou plusieurs substances actives. Ils sont destinés à être placés sur la peau en vue de maintenir un contact étroit entre la peau et la (les) substance(s) active(s), de telle sorte qu'ils puissent agir localement.

Ils consistent en une base adhésive, colorée ou non, contenant 1 ou plusieurs substances actives, étalée en une couche uniforme sur un support approprié constitué d'un matériau naturel ou synthétique. La base adhésive n'est pas responsable d'irritations ou de sensibilisation de la peau. Les bases adhésives sont recouvertes d'une bande de protection appropriée qui est retirée avant application sur la peau. Lorsqu'elle est retirée, la bande protectrice n'entraîne pas la préparation avec elle.

Les dispositifs cutanés sont présentés sous des dimensions adaptées à leur usage. Ils adhèrent fermement à la peau par simple pression et peuvent être retirés facilement sans causer de blessure notable de la peau ni de séparation de la préparation et du support.

ESSAI

**Dissolution**. Un essai approprié peut être nécessaire afin de démontrer que la libération de la ou des substances actives est adéquate ; à cette fin l'un des essais décrits dans la méthode *Essai de dissolution des dispositifs transdermiques* (*2.9.4*) peut être effectué.

**01/2008:1164**

# PRÉPARATIONS VAGINALES

## Vaginalia

DÉFINITION

Les préparations vaginales sont des préparations liquides, semi-solides ou solides destinées à être administrées par voie vaginale, généralement en vue d'une action locale. Elles contiennent 1 ou plusieurs substances actives dans un excipient approprié.

Dans les cas appropriés, les récipients destinés aux préparations vaginales satisfont aux exigences relatives aux matériaux utilisés dans la fabrication des récipients (*3.1* et sous-chapitres) et aux récipients (*3.2* et sous-chapitres).

Plusieurs catégories de préparations vaginales peuvent être distinguées :

– les ovules,
– les comprimés vaginaux,
– les capsules vaginales,

Formes pharmaceutiques

- les solutions, émulsions et suspensions vaginales,
- les comprimés pour solutions ou suspensions vaginales,
- les préparations vaginales semi-solides,
- les mousses vaginales,
- les tampons vaginaux médicamenteux.

PRODUCTION

Au cours du développement, il doit être démontré qu'il est possible de prélever le contenu nominal du récipient des préparations vaginales liquides et semi-solides présentées en récipients unidoses.

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des préparations vaginales, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le chapitre *5.1.4. Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques*.

ESSAI

**Uniformité des préparations unidoses** (*2.9.40*). Les préparations vaginales unidoses liquides et les préparations vaginales unidoses semi-solides satisfont à l'essai. Les préparations vaginales unidoses solides satisfont à l'essai ou, dans les cas justifiés et autorisés, aux essais d'uniformité de teneur et/ou d'uniformité de masse présentés ci-après. Les drogues végétales et les préparations à base de drogues végétales présentes dans cette forme pharmaceutique ne sont pas soumises aux dispositions de ce paragraphe.

**Uniformité de teneur** (*2.9.6*). Sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée, les préparations vaginales unidoses solides dont la teneur en substance active est inférieure à 2 mg ou dans lesquelles la substance active représente moins de 2 pour cent de la masse totale satisfont aux essais A (comprimés vaginaux) ou B (ovules, capsules vaginales). Si la préparation contient plusieurs substances actives, l'essai ne s'applique qu'à celles qui répondent aux conditions indiquées ci-dessus.

**Uniformité de masse** (*2.9.5*). Les préparations vaginales unidoses solides satisfont à l'essai. Lorsqu'un essai d'uniformité de teneur est prescrit pour toutes les substances actives, l'essai d'uniformité de masse n'est pas exigé.

**Dissolution**. Dans le cas des préparations vaginales unidoses solides, un essai approprié peut être réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante, par exemple l'un des essais décrits dans le chapitre *2.9.3. Essai de dissolution des formes solides* ou dans le chapitre *2.9.42. Essai de dissolution des formes solides lipophiles*.

Lorsqu'un essai de dissolution est prescrit, un essai de désagrégation peut ne pas être exigé.

## Ovules

DÉFINITION

Les ovules sont des préparations unidoses solides. Ils sont de forme variable, mais généralement ovoïdes ; leur volume et leur consistance sont adaptés à l'administration par voie vaginale. Ils contiennent 1 ou plusieurs substances actives dispersées ou dissoutes dans une base appropriée qui est, suivant le cas, soluble ou dispersible dans l'eau ou fond à la température du corps. Ils peuvent également contenir, si nécessaire, d'autres excipients tels que des agents diluants, absorbants, tensioactifs, lubrifiants, des conservateurs antimicrobiens et des colorants autorisés par l'Autorité compétente.

PRODUCTION

Les ovules sont généralement obtenus par moulage. Dans les cas appropriés, des mesures sont prises lors de la fabrication des ovules pour s'assurer que la taille des particules de la ou des substances actives est convenablement contrôlée et qu'elle est appropriée. Si nécessaire, les substances actives sont préalablement broyées et tamisées sur un tamis approprié.

Dans le cas des ovules moulés, la masse médicamenteuse rendue suffisamment fluide par action de la chaleur est coulée dans des alvéoles appropriées, et l'ovule se solidifie en refroidissant. Divers excipients adaptés à ce mode de fabrication sont utilisés, tels que beurre de cacao, glycérides hémi-synthétiques solides, macrogols et mélanges à consistance de gel composés par exemple de gélatine, de glycérol et d'eau.

Dans le cas des ovules adaptés à une action locale prolongée, un essai approprié est réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante.

ESSAI

**Désagrégation** (*2.9.2*). A moins qu'ils ne soient adaptés à une action locale prolongée, les ovules satisfont à l'essai. Examinez l'état des ovules après 60 min, sauf exception justifiée et autorisée.

## Comprimés vaginaux

DÉFINITION

Les comprimés vaginaux sont des préparations unidoses solides. Ils répondent sur le plan général à la définition donnée pour les comprimés non enrobés ou les comprimés pelliculés dans la monographie *Comprimés (0478)*.

PRODUCTION

Dans le cas des comprimés vaginaux adaptés à une action locale prolongée, un essai approprié est réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante.

ESSAI

**Désagrégation** (*2.9.2*). A moins qu'ils ne soient adaptés à une action locale prolongée, les comprimés vaginaux satisfont à l'essai - cas particulier des comprimés vaginaux. Examinez l'état des comprimés vaginaux après 30 min, sauf exception justifiée et autorisée.

## Capsules vaginales

DÉFINITION

Les capsules vaginales sont des préparations unidoses solides. Elles se présentent en général comme des capsules à enveloppe molle comme définies dans la monographie *Capsules (0016)*, dont elles diffèrent simplement par la forme et la taille. Les capsules vaginales sont de forme variable, mais le plus souvent ovoïde ; elles sont lisses et leur aspect extérieur est uniforme.

PRODUCTION

Dans le cas des capsules vaginales adaptées à une action locale prolongée, un essai approprié est réalisé pour démontrer que la libération de la ou des substances actives est satisfaisante.

ESSAI

**Désagrégation** (*2.9.2*). A moins qu'elles ne soient adaptées à une action locale prolongée, les capsules vaginales satisfont à l'essai. Examinez l'état des capsules vaginales après 30 min, sauf exception justifiée et autorisée.

## Solutions, émulsions et suspensions vaginales

DÉFINITION

Les solutions, émulsions et suspensions vaginales sont des préparations liquides administrées en vue d'une action locale ou à des fins d'irrigation ou de diagnostic. Elles peuvent contenir des excipients destinés, par exemple, à ajuster la viscosité de la préparation, à adapter ou stabiliser le pH, à augmenter la solubilité de la ou des substances actives ou à stabiliser la préparation. Ces excipients ne nuisent pas à l'action médicamenteuse recherchée et, aux concentrations choisies, ne provoquent pas d'irritation locale notable.

Les émulsions peuvent présenter des signes de séparation des phases, mais sont facilement redispersées par agitation. Les suspensions peuvent présenter un sédiment, qu'il est facile de disperser par agitation de façon à obtenir une suspension suffisamment stable pour permettre l'administration d'une préparation homogène.

Les solutions, émulsions et suspensions vaginales sont présentées en récipients unidoses. Le récipient est de forme adaptée à l'application de la préparation dans le vagin ou est muni d'un applicateur approprié.

PRODUCTION

Lors de la fabrication des suspensions vaginales, des mesures sont prises pour assurer que la taille des particules est convenablement contrôlée et qu'elle est appropriée à l'usage prévu de la préparation.

## Comprimés pour solutions ou suspensions vaginales

DÉFINITION

Les comprimés destinés à la préparation de solutions ou suspensions vaginales sont des préparations unidoses à dissoudre ou disperser dans de l'eau au moment de l'administration. Ils peuvent contenir des excipients destinés à faciliter la dissolution ou la dispersion ou à empêcher l'agrégation des particules.

Mis à part l'essai de désagrégation, les comprimés pour solutions ou suspensions vaginales répondent à la définition des *Comprimés (0478)*.

Après dissolution ou mise en suspension, la préparation satisfait, selon le cas, aux exigences concernant les solutions ou les suspensions vaginales.

ESSAI

**Désagrégation** (*2.9.1*). Opérez comme décrit dans l'essai, mais en utilisant de l'*eau R* à 15-25 °C et 6 comprimés. Examinez l'état des comprimés après 3 min. Les comprimés satisfont à l'essai si les 6 sont désagrégés.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le mode de préparation de la solution ou de la suspension vaginale,
– les conditions et la durée de conservation de la solution ou de la suspension après reconstitution.

## Préparations vaginales semi-solides

DÉFINITION

Les préparations vaginales semi-solides sont des pommades, crèmes ou gels.

Elles sont souvent conditionnées en récipients unidoses. Le récipient est muni d'un applicateur approprié.

Les préparations vaginales semi-solides satisfont aux exigences de la monographie *Préparations semi-solides pour application cutanée (0132)*.

## Mousses vaginales

DÉFINITION

Les mousses vaginales satisfont aux exigences de la monographie *Mousses médicamenteuses (1105)*.

## Tampons vaginaux médicamenteux

DÉFINITION

Les tampons vaginaux médicamenteux sont des préparations unidoses solides destinées à être introduites dans le vagin pendant une durée limitée.

Ils satisfont aux exigences de la monographie *Tampons médicamenteux (1155)*.

**01/2008:1808**

# PRÉPARATIONS VÉTÉRINAIRES LIQUIDES POUR APPLICATION CUTANÉE

## Praeparationes liquidae veterinariae ad usum dermicum

*Sauf exception justifiée et autorisée, les préparations vétérinaires liquides pour application cutanée satisfont aux exigences de la monographie Préparations liquides pour application cutanée (0927). Les préparations vétérinaires liquides pour application cutanée font, en outre, l'objet des définitions et prescriptions suivantes.*

DÉFINITION

Les préparations vétérinaires liquides pour application cutanée sont des préparations liquides destinées à être appliquées sur la peau en vue d'une action locale et/ou systémique. Ce sont des solutions, émulsions ou suspensions qui peuvent contenir une ou plusieurs substances actives dans un excipient approprié. Elles peuvent se présenter sous la forme de préparations concentrées (poudres mouillables, pâtes, solutions, suspensions) à partir desquelles sont préparées des suspensions ou émulsions diluées de substances actives. Elles peuvent également contenir des conservateurs antimicrobiens appropriés, des antioxydants et d'autres excipients tels que des stabilisants, émulsionnants et épaississants.

Plusieurs catégories de préparations vétérinaires liquides pour application cutanée peuvent être distinguées :

– les mousses pour application cutanée (voir *Préparations liquides pour application cutanée (0927)*),
– les préparations concentrées pour balnéation,
– les préparations pour pour-on,
– les shampooings (voir *Préparations liquides pour application cutanée (0927)*),
– les préparations pour spot-on,
– les préparations pour pulvérisation,
– les préparations pour trempage mammaire,
– les préparations pour pulvérisation mammaire,
– les préparations pour lavage mammaire.

## Préparations concentrées pour balnéation

DÉFINITION

Les préparations concentrées pour balnéation sont des préparations contenant une ou plusieurs substances actives, généralement sous forme de poudre mouillable, pâte, solution ou suspension, à partir desquelles sont préparées des solutions, suspensions ou émulsions diluées de substances actives. Les préparations diluées sont appliquées par immersion complète de l'animal.

## Préparations pour pour-on

DÉFINITION

Les préparations pour pour-on sont des préparations contenant une ou plusieurs substances actives, destinées à la prévention et au traitement d'infestations ectoparasitaires et/ou endoparasitaires chez l'animal. Elles sont appliquées en volumes généralement supérieurs à 5 mL, par déversement le long de l'épine dorsale de l'animal.

Formes pharmaceutiques

## Préparations pour spot-on

DÉFINITION

Les préparations pour spot-on sont des préparations contenant une ou plusieurs substances actives, destinées à la prévention et au traitement d'infestations ectoparasitaires et/ou endoparasitaires chez l'animal. Elles sont appliquées en volumes généralement inférieurs à 10 mL, sur une surface limitée de la tête ou du dos, selon le cas, de l'animal.

## Préparations pour pulvérisation

DÉFINITION

Les préparations pour pulvérisation sont des préparations contenant une ou plusieurs substances actives, destinées à être appliquées par voie externe à des fins thérapeutiques ou prophylactiques. Elles sont délivrées sous la forme d'un aérosol produit soit par actionnement d'une valve appropriée soit au moyen d'un dispositif de nébulisation approprié qui peut faire partie intégrante du récipient ou être fourni séparément.

Les préparations pour pulvérisation peuvent être conditionnées en récipients pressurisés (voir *Préparations pharmaceutiques pressurisées (0523)*). Dans ce cas, elles se composent généralement d'une ou plusieurs substances actives, dans un excipient approprié, maintenues sous pression par des gaz ou mélanges de gaz propulseurs appropriés. Les préparations pour pulvérisation non pressurisées sont conditionnées en récipients bien fermés.

PRODUCTION

Au cours du développement et de la fabrication des préparations pour pulvérisation, des mesures appropriées sont prises pour assurer la conformité du produit assemblé à des critères définis de débit et de profil de pulvérisation.

Formes pharmaceutiques

## Préparations pour trempage mammaire

DÉFINITION

Les préparations pour trempage mammaire sont des préparations contenant une ou plusieurs substances actives désinfectantes, généralement sous la forme de solutions dans lesquelles sont trempées les trayons de l'animal avant et, si nécessaire, après la traite, afin de réduire la population de microorganismes pathogènes sur leur surface. Les préparations pour trempage mammaire peuvent être conditionnées/présentées sous forme de préparations prêtes à l'emploi, ou être préparées par dilution de préparations concentrées pour trempage mammaire. Les préparations pour trempage mammaire utilisées avant et après la traite diffèrent souvent dans leur formulation. Les préparations pour trempage mammaire contiennent généralement des émollients destinés à hydrater la peau, l'adoucir et aider à la cicatrisation des lésions qui pourraient sinon abriter des bactéries.

## Préparations pour pulvérisation mammaire

DÉFINITION

Les préparations pour pulvérisation mammaire sont des préparations contenant une ou plusieurs substances actives désinfectantes, généralement sous la forme de solutions qui sont pulvérisées sur les trayons de l'animal avant et, si nécessaire, après la traite, afin de réduire la population de microorganismes pathogènes sur leur surface. Les préparations pour pulvérisation mammaire peuvent être conditionnées/présentées sous forme de préparations prêtes à l'emploi, ou être préparées par dilution de préparations concentrées pour pulvérisation mammaire. Les préparations pour pulvérisation mammaire utilisées avant et après la traite diffèrent souvent dans leur formulation. Les préparations pour pulvérisation mammaire contiennent généralement des émollients destinés à hydrater la peau, l'adoucir et aider à la cicatrisation des lésions qui pourraient sinon abriter des bactéries.

## Préparations pour lavage mammaire

DÉFINITION

Les préparations pour lavage mammaire sont des préparations contenant une ou plusieurs substances actives désinfectantes, généralement sous la forme de solutions qui sont pulvérisées sur les mamelles et les trayons de l'animal afin d'éliminer la boue et la contamination fécale avant l'application de préparations pour trempage ou pour pulvérisation mammaire. Les préparations pour lavage mammaire sont généralement préparées par dilution de préparations concentrées ou de préparations pour trempage ou pour pulvérisation mammaire prêtes à l'emploi.

**01/2008:1155**

# TAMPONS MÉDICAMENTEUX

## Tamponae medicatae

*Des exigences supplémentaires concernant les tampons médicamenteux peuvent le cas échéant figurer dans d'autres monographies générales, par exemple les monographies Préparations rectales (1145), Préparations vaginales (1164) et Préparations auriculaires (0652).*

DÉFINITION

Les tampons médicamenteux sont des préparations solides unidoses destinées à être introduites dans les cavités corporelles pour une durée limitée. Ils sont constitués d'un matériau approprié, tel que cellulose, collagène ou silicone, imprégné d'une ou plusieurs substance(s) active(s).

PRODUCTION

Lors de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des tampons médicamenteux, des mesures appropriées sont prises pour assurer la qualité microbiologique du produit ; des recommandations sont fournies à cet égard dans le texte *Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques* (*5.1.4*).

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique la quantité de substance(s) active(s) par tampon.

# VACCINS POUR USAGE HUMAIN

Vaccins

**01/2009:1929**

# BCG POUR IMMUNOTHÉRAPIE

## BCG ad immunocurationem

DÉFINITION

Le BCG pour immunothérapie est une préparation cryodesséchée de bactéries vivantes, dérivées d'une culture du bacille de Calmette et Guérin (*Mycobacterium bovis* BCG), dont l'effet thérapeutique a été démontré.

Le BCG pour immunothérapie est conforme à la monographie *Vaccins pour usage humain (0153).*

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

La production de BCG pour immunothérapie doit être assurée par des personnes en bonne santé, ne travaillant pas avec d'autres agents infectieux, notamment des souches virulentes de *Mycobacterium tuberculosis*, et n'étant pas exposées à un risque connu d'infection par la tuberculose. Des examens réguliers du personnel doivent être effectués pour déceler la tuberculose. Le BCG pour immunothérapie étant sensible à la lumière du soleil, sa production doit être conduite de façon que tous les produits soient protégés de la lumière directe du soleil et de la lumière ultraviolette à tous les stades de la fabrication, des essais et de la conservation.

La production est basée sur un système de lot de semence. Il sera démontré que la méthode de production donne de façon constante du BCG d'innocuité satisfaisante pouvant être utilisé dans le traitement du cancer superficiel de la vessie. Le produit est préparé à partir de cultures ayant subi, à partir du lot de semence primaire, un nombre de subcultures aussi réduit que possible, et dans tous les cas non supérieur à 8. Au cours de ces subcultures, la préparation ne subit pas plus d'une cryodessiccation.

Si un essai de bioluminescence ou une autre méthode biochimique est utilisé à la place du dénombrement des germes viables, l'essai est validé par rapport au dénombrement des germes viables pour chaque étape de la production à laquelle il est utilisé.

*LOTS DE SEMENCE*

La souche utilisée pour établir le lot de semence primaire est choisie et maintenue en culture de façon à conserver ses caractéristiques, sa capacité à traiter et prévenir le cancer superficiel de la vessie, ainsi qu'à garder son caractère relativement non pathogène pour l'homme et les animaux de laboratoire. La souche utilisée devra être identifiée par des données historiques y compris des informations sur son origine et sa manipulation ultérieure.

Avant l'établissement d'un lot de semence de travail, un lot est préparé et réservé comme produit de comparaison. Lors de l'établissement d'un nouveau lot de semence de travail, un essai d'hypersensibilité retardée sur cobaye est effectué pour un lot de produit préparé à partir du nouveau lot de semence de travail ; il est démontré que l'activité du produit n'est pas significativement différente de celle du produit de comparaison. Un essai de sensibilité aux agents antimicrobiens est également effectué.

Seul un lot de semence qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la culture.

**Identification**. Les bactéries dans le lot de semence de travail sont identifiées comme étant *Mycobacterium bovis* BCG à l'aide de techniques de microbiologie pouvant être complétées par des techniques de biologie moléculaire (par exemple, amplification des acides nucléiques et polymorphisme de longueur des fragments de restriction).

**Contamination bactérienne et fongique**. Effectuez l'essai de stérilité (*2.6.1*) en utilisant 10 mL pour chaque milieu. Excepté la présence de mycobactéries, le lot de semence de travail satisfait à l'essai de stérilité.

**Mycobactéries virulentes**. Examinez le lot de semence de travail comme il est prescrit sous Essai, en utilisant 10 cobayes.

*CULTURE ET RÉCOLTE*

Les bactéries sont cultivées sur un milieu approprié, pendant au maximum 21 jours, par culture en surface ou en culture immergée. Le milieu de culture ne contient pas de substances dont on sait qu'elles peuvent entraîner des réactions toxiques ou allergiques chez l'homme ou rendre les bactéries virulentes pour le cobaye. La culture est récoltée et mise en suspension dans un milieu liquide stérile, dont il est démontré par une méthode appropriée de dénombrement qu'il est apte à maintenir la viabilité de la culture.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé soit à partir d'une récolte unique soit à partir du mélange de plusieurs récoltes uniques. Un stabilisant peut être ajouté ; si le stabilisant interfère avec la détermination de la concentration bactérienne du vrac final, celle-ci est déterminée avant l'addition du stabilisant.

Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la préparation du lot final.

**Contamination bactérienne et fongique**. Effectuez l'essai de stérilité (*2.6.1*) en utilisant 10 mL du vrac final pour chaque milieu. Excepté la présence de mycobactéries, le vrac final satisfait à l'essai de stérilité.

**Nombre d'unités viables**. Déterminez le nombre d'unités viables par millilitre du vrac final, par dénombrement des colonies sur milieu solide selon une méthode adaptée au produit à examiner ou par une méthode biochimique appropriée. Effectuez l'essai en parallèle sur une préparation de référence de la même souche.

**Concentration bactérienne**. Déterminez la concentration bactérienne totale par une méthode appropriée, soit directement par détermination de la masse des microorganismes, soit indirectement par une méthode de mesure de l'opacité corrélée avec la détermination de la masse des microorganismes ; si la concentration est mesurée avant l'addition du stabilisant, la concentration dans le vrac final est établie par calcul. La concentration bactérienne totale se situe entre les limites approuvées pour le produit considéré.

Le rapport entre le nombre d'unités viables et la concentration bactérienne n'est pas inférieur à celui approuvé pour le produit considéré.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti en récipients stériles, puis cryodesséché jusqu'à une teneur en eau démontrée favorable à la stabilité du produit ; les récipients sont fermés sous vide ou sous gaz inerte.

Sauf dans le cas où les récipients remplis et fermés sont conservés à une température égale ou inférieure à – 20 °C, la date de péremption est fixée au maximum à 4 ans après la récolte.

Seul un lot final satisfaisant à l'essai du nombre d'unités viables ci-après et qui est conforme à chacun des essais décrits sous Identification, Essai et Nombre d'unités viables peut être libéré. Si l'essai des mycobactéries virulentes a été effectué avec de bons résultats sur le vrac final, il peut ne pas être effectué sur le lot final.

**Nombre d'unités viables**. Déterminez le nombre d'unités viables par millilitre de produit reconstitué, par dénombrement des colonies sur milieu solide selon une méthode adaptée au produit à examiner ou par une méthode biochimique appropriée. Le rapport entre le nombre d'unités viables après cryodessiccation et celui avant cryodessication n'est pas inférieur au rapport approuvé pour le produit considéré.

IDENTIFICATION

Le BCG pour immunothérapie est identifié par examen microscopique des bacilles en frottis colorés, permettant de démontrer leur caractère acido-résistant, et par l'aspect caractéristique des colonies en culture sur milieu solide. Il est également possible d'utiliser des techniques de biologie moléculaire (par exemple, amplification des acides nucléiques).

ESSAI

**Mycobactéries virulentes**. Utilisez 6 cobayes pesant 250-400 g chacun, n'ayant pas subi de traitement susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux, par voie sous-cutanée ou intramusculaire, une quantité de produit à examiner au moins équivalente à 1/25 de 1 dose humaine. Placez les animaux en observation pendant au minimum 42 jours, puis euthanasiez-les et recherchez par autopsie des signes de tuberculose, sans tenir compte d'éventuelles réactions mineures au point d'injection. Examinez de même les animaux morts au cours de la période d'observation. Le produit satisfait à l'essai si aucun des cobayes ne présente de signes de tuberculose et s'il ne meurt pas plus de 1 animal pendant la période d'observation. S'il meurt 2 animaux pendant cette période et si l'autopsie ne révèle aucun signe de tuberculose, répétez l'essai sur 6 autres cobayes. Le produit satisfait à l'essai s'il ne meurt pas plus de 1 de ces cobayes dans les 42 jours suivant l'injection et si l'autopsie ne révèle aucun signe de tuberculose.

**Contamination bactérienne et fongique**. Excepté la présence de mycobactéries, le produit reconstitué satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*).

**Eau** : au maximum la teneur approuvée pour le produit considéré, déterminée par une méthode appropriée.

NOMBRE D'UNITÉS VIABLES

Déterminez le nombre d'unités viables contenues dans le produit reconstitué, par dénombrement des colonies sur milieu solide selon une méthode adaptée au produit à examiner ou par une méthode biochimique validée appropriée. Le résultat obtenu se situe dans les limites indiquées sur l'étiquette. Déterminez en parallèle le nombre d'unités viables contenues dans le témoin de comparaison.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nombre minimal et le nombre maximal d'unités viables par dose de produit reconstitué,
– que le produit doit être protégé de la lumière directe du soleil.



**01/2008:0163**

# VACCIN BCG CRYODESSÉCHÉ

## Vaccinum tuberculosis (BCG) cryodesiccatum

DÉFINITION

Le vaccin BCG cryodesséché est une préparation de bactéries vivantes, dérivées d'une culture du bacille de Calmette et Guérin (*Mycobacterium bovis* BCG), dont l'effet protecteur contre la tuberculose a été démontré.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

La production du vaccin BCG doit être assurée par des personnes en bonne santé, ne travaillant pas avec d'autres agents infectieux, notamment des souches virulentes de *Mycobacterium tuberculosis*, et non exposées à un risque connu d'infection par la tuberculose. Des examens réguliers du personnel doivent être effectués pour déceler la tuberculose. Le vaccin BCG étant sensible à la lumière du soleil, sa préparation doit être conduite de sorte que les cultures et les vaccins soient protégés de la lumière directe du soleil et de la lumière ultraviolette, à tous les stades de la fabrication, des essais et de la conservation.

Le vaccin est préparé selon un système de lot de semence. Il sera démontré que la méthode de production donne de façon constante des vaccins BCG d'innocuité satisfaisante capables d'induire une sensibilisation adéquate à la tuberculine chez l'homme, et ayant une activité protectrice acceptable chez les animaux. Le vaccin est préparé à partir de cultures ayant subi, à partir du lot de semence primaire, un nombre de subcultures aussi réduit que possible et dans tous les cas non supérieur à 8. Au cours de ces subcultures, la préparation ne subit pas plus d'une cryodessiccation.

Si un essai de bioluminescence ou une autre méthode biochimique est utilisée à la place du dénombrement des germes viables, l'essai est validé par rapport au dénombrement des germes viables pour chaque étape de la production à laquelle il est utilisé.

*LOT DE SEMENCE*

La souche utilisée pour établir le lot de semence primaire est choisie et maintenue en culture de façon à conserver ses caractéristiques, sa capacité à sensibiliser l'homme à la tuberculine et à protéger les animaux de la tuberculose, ainsi qu'à garder son caractère relativement non pathogène pour l'homme et les animaux de laboratoire. La souche utilisée devra être identifiée par des données historiques y compris des informations sur son origine et sa manipulation ultérieure.

Un lot approprié de vaccin, préparé à partir du premier lot de semence, est réservé pour servir de vaccin de comparaison. Lors de l'établissement d'un nouveau lot de semence de travail, un essai d'hypersensibilité retardée sur cobaye est effectué pour un lot de vaccin préparé à partir du nouveau lot de semence de travail ; l'activité du vaccin ne doit pas être significativement différente de celle du vaccin de comparaison. Un essai de sensibilité aux agents antimicrobiens est également effectué.

Seul un lot de semence de travail qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la culture.

**Identification**. Les bactéries dans le lot de semence de travail sont identifiées comme étant *Mycobacterium bovis* BCG à l'aide de techniques de microbiologie pouvant être complétées par des techniques de biologie moléculaire (par exemple, amplification des acides nucléiques et polymorphisme de longueur des fragments de restriction).

**Contamination bactérienne et fongique**. Effectuez l'essai de stérilité (*2.6.1*) en utilisant 10 mL pour chaque milieu. Excepté la présence de mycobactéries, le lot de semence de travail satisfait à l'essai de stérilité.

**Mycobactéries virulentes**. Examinez le lot de semence de travail comme prescrit sous Essai, en utilisant 10 cobayes.

*CULTURE ET RÉCOLTE*

Les bactéries sont cultivées sur un milieu approprié, pendant au maximum 21 jours, par culture en surface ou immergée. Le milieu de culture ne contient pas de substances dont on sait qu'elles peuvent entraîner des réactions toxiques ou allergiques chez l'homme ou rendre les bactéries virulentes pour le cobaye. La culture est récoltée et mise en suspension dans un milieu liquide stérile, dont il est démontré par une méthode appropriée de dénombrement qu'il est apte à maintenir la viabilité du vaccin.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé soit à partir d'une récolte unique, soit à partir du mélange de plusieurs récoltes uniques. Un stabilisant peut être ajouté ; si le stabilisant interfère avec la détermination de la concentration bactérienne du vrac final, celle-ci est déterminée avant l'addition du stabilisant.

Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la préparation du lot final.

**Contamination bactérienne et fongique**. Effectuez l'essai de stérilité (*2.6.1*) en utilisant 10 mL du vrac final pour chaque milieu. Excepté la présence de mycobactéries, le vrac final satisfait à l'essai de stérilité.

**Nombre d'unités viables**. Déterminez le nombre d'unités viables par millilitre de vrac final, par dénombrement des colonies sur milieu solide selon une méthode adaptée au vaccin à examiner ou par une méthode biochimique appropriée. Effectuez l'essai en parallèle sur une préparation de référence de la même souche.

**Concentration bactérienne**. Déterminez la concentration bactérienne totale par une méthode appropriée, soit directement par détermination de la masse des microorganismes, soit indirectement par une méthode de mesure de l'opacité corrélée avec la détermination de la masse ; si la concentration est mesurée avant l'addition du stabilisant, la concentration dans le vrac final est établie par calcul. La concentration bactérienne totale se situe entre les limites approuvées pour le produit considéré.

Le rapport entre le nombre d'unités viables et la concentration bactérienne n'est pas inférieur à celui approuvé pour le produit considéré.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti en récipients stériles, puis cryodesséché jusqu'à une teneur en eau démontrée favorable à la stabilité du vaccin ; les récipients sont fermés sous vide ou sous gaz inerte.

Sauf dans le cas où les récipients remplis et fermés sont conservés à une température inférieure ou égale à – 20 °C, la date de péremption est fixée au maximum à 4 ans après la récolte.

Seul un lot final satisfaisant à l'essai ci-après du nombre d'unités viables et qui est conforme à chacun des essais décrits sous Identification, Essai et Nombre d'unités viables peut être libéré. Si l'essai des mycobactéries virulentes a été effectué avec de bons résultats sur le vrac final, il peut ne pas être effectué sur le lot final. Si l'essai de réactivité dermique excessive a été effectué avec de bons résultats sur le lot de semence de travail et sur 5 lots consécutifs produits à partir de celui-ci, il peut ne pas être effectué sur le lot final.

**Nombre d'unités viables**. Déterminez le nombre d'unités viables par millilitre de vaccin reconstitué, par dénombrement des colonies sur milieu solide selon une méthode adaptée au vaccin à examiner ou par une méthode biochimique appropriée. Le rapport du nombre d'unités viables après cryodessiccation à celui avant cryodessiccation n'est pas inférieur au rapport approuvé pour le produit considéré.

IDENTIFICATION

Le vaccin BCG cryodesséché est identifié par examen microscopique des bacilles en frottis colorés, permettant de démontrer leur caractère acido-résistant et par l'aspect caractéristique des colonies en culture sur milieu solide. Il est également possible d'utiliser des techniques de biologie moléculaire (par exemple amplification des acides nucléiques).

ESSAI

**Mycobactéries virulentes**. Utilisez 6 cobayes pesant chacun 250-400 g, n'ayant pas subi de traitement susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux, par voie sous-cutanée ou intramusculaire, une quantité de vaccin équivalant à au moins 50 doses humaines. Placez les animaux en observation pendant au minimum 42 jours, puis euthanasiez-les et recherchez par autopsie des signes de tuberculose, sans tenir compte d'éventuelles réactions mineures au point d'injection. Examinez de même les animaux morts au cours de la période d'observation. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des cobayes ne présente de signes de tuberculose et s'il ne meurt pas plus d'un animal pendant la période d'observation. S'il meurt 2 animaux pendant cette période et si l'autopsie ne révèle aucun signe de tuberculose, répétez l'essai sur 6 autres cobayes. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne meurt pas plus d'un de ces cobayes dans les 42 jours suivant l'injection et si l'autopsie ne révèle aucun signe de tuberculose.

**Contamination bactérienne et fongique**. Excepté la présence de mycobactéries, le vaccin reconstitué satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*).

**Réactivité dermique excessive**. Utilisez 6 cobayes sains pesant chacun au minimum 250 g, de couleur blanche ou claire, n'ayant subi aucun traitement susceptible de fausser l'essai. Injectez par voie intradermique à chacun d'eux, selon un plan aléatoire, 0,1 mL du vaccin reconstitué et 0,1 mL de ses 2 dilutions successives au 1/10, ainsi que des doses équivalentes du vaccin de comparaison. Observez pendant 4 semaines le développement des lésions aux points d'injection. Le vaccin satisfait à l'essai si la réaction qu'il produit n'est pas sensiblement différente de celle produite par le vaccin de comparaison.

**Stabilité thermique**. Maintenez des échantillons du vaccin cryodesséché à 37 °C pendant 4 semaines. Déterminez le nombre d'unités viables contenues dans le vaccin après chauffage et dans le vaccin non chauffé, comme décrit ci-dessus. Le nombre d'unités viables contenues dans le vaccin après chauffage n'est pas inférieur à 20 pour cent de celui dans le vaccin non chauffé.

**Eau** : au maximum la teneur approuvée pour le produit considéré, déterminée par une méthode appropriée.

NOMBRE D'UNITÉS VIABLES

Déterminez le nombre d'unités viables contenues dans le vaccin reconstitué, par dénombrement des colonies sur milieu solide selon une méthode adaptée au vaccin à examiner ou par une méthode biochimique appropriée validée. Le résultat obtenu se situe dans les limites indiquées sur l'étiquette. Déterminez en parallèle le nombre d'unités viables contenues dans le vaccin de comparaison.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nombre minimal et le nombre maximal d'unités viables par millilitre de vaccin reconstitué,
– que le vaccin doit être protégé de la lumière directe du soleil.

**01/2008:0154**

# VACCIN CHOLÉRIQUE

## Vaccinum cholerae

DÉFINITION

Le vaccin cholérique est constitué par une suspension homogène de vibrions cholériques (*Vibrio cholerae*) provenant d'une ou de plusieurs souches appropriées. Il contient au minimum $8 \times 10^9$ bactéries par dose humaine et cette dose n'est pas supérieure à 1,0 mL.

PRODUCTION

La préparation du vaccin est effectuée à partir d'un lot de semence. Le vaccin est composé d'un mélange à parties égales de vaccins préparés à partir de souches lisses des 2 types sérologiques principaux Inaba et Ogawa du biotype classique avec ou sans le biotype El Tor. Une seule ou plusieurs souches de chaque type peuvent être utilisées ; toutes les souches doivent contenir, en plus de leurs antigènes de type O, l'antigène O thermostable commun à Inaba et Ogawa. Si plusieurs souches de chacun des types Inaba et Ogawa sont utilisées, elles sont choisies de façon à contenir, en plus, d'autres antigènes O. L'Organisation Mondiale de la Santé recommande périodiquement de nouvelles souches qui peuvent éventuellement être utilisées, conformément aux dispositions législatives et réglementaires des signataires de la Convention relative à l'Elaboration d'une Pharmacopée Européenne.

Le vaccin doit contenir au minimum 8 × $10^9$ organismes du biotype classique pour remplir les conditions exigées par les certificats de vaccination pour voyages internationaux. Chaque souche est cultivée séparément. Les bactéries sont inactivées par chauffage des suspensions, par exemple à 56 °C pendant 1 h ou par action du formaldéhyde ou du phénol ou par l'association de procédés physiques et chimiques.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait, s'il lui était appliqué, à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), modifié comme suit : injectez 0,5 mL du vaccin par souris ; injectez 1,0 mL du vaccin par cobaye.

IDENTIFICATION

Le vaccin cholérique est identifié par agglutination spécifique.

ESSAI

**Phénol** (*2.5.15*). Si le phénol est utilisé, sa concentration n'est pas supérieure à 5 g/L.

**Production d'anticorps**. Vérifiez la capacité du vaccin cholérique de stimuler la production d'anticorps tels que les anticorps agglutinants, vibriocides ou hémagglutinants chez le cobaye, le lapin ou la souris. Administrez le vaccin à un groupe de 6 animaux au moins. Déterminez, sur la base d'expériences préliminaires, l'intervalle de temps permettant d'obtenir la réponse d'anticorps la plus élevée. Passé ce délai, prélevez le sérum de chaque animal et déterminez-en le titre en anticorps par une méthode appropriée. Le vaccin à examiner satisfait à l'essai si chaque sérotype provoque une réponse significative d'anticorps.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin cholérique satisfait à l'essai de stérilité.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le procédé utilisé pour inactiver les bactéries,
– le nombre de bactéries par dose humaine.

**01/2008:0155**

# VACCIN CHOLÉRIQUE CRYODESSÉCHÉ

## Vaccinum cholerae cryodesiccatum

DÉFINITION

Le vaccin cholérique cryodesséché est une préparation obtenue à partir de vibrions cholériques (*Vibrio cholerae*) provenant d'une ou de plusieurs souches appropriées. Le vaccin reconstitué d'après les indications de l'étiquette se présente sous forme d'une suspension homogène qui contient au minimum 8 × $10^9$ bactéries par dose humaine. Cette dose n'est pas supérieure à 1,0 mL du vaccin reconstitué.

PRODUCTION

La préparation du vaccin est effectuée à partir d'un lot de semence. Le vaccin est composé d'un mélange à parties égales de vaccins préparés à partir de souches lisses des 2 types sérologiques principaux Inaba et Ogawa du biotype classique avec ou sans le biotype El Tor. Une seule ou plusieurs souches de chaque type peuvent être utilisées ; toutes les souches doivent contenir, en plus de leurs antigènes de type O, l'antigène O thermostable commun à Inaba et Ogawa. Si plusieurs souches de chacun des types Inaba et Ogawa sont utilisées, elles sont choisies de façon à contenir, en plus, d'autres antigènes O. L'Organisation Mondiale de la Santé recommande périodiquement de nouvelles souches qui peuvent éventuellement être utilisées, conformément aux dispositions législatives et réglementaires des signataires de la Convention relative à l'Elaboration d'une Pharmacopée Européenne. Le vaccin doit contenir au minimum 8 × $10^9$ organismes du biotype classique pour remplir les conditions exigées par les certificats de vaccination pour voyages internationaux. Chaque souche est cultivée séparément. Les bactéries sont inactivées par chauffage des suspensions, par exemple à 56 °C pendant 1 h ou par action du formaldéhyde ou par l'association de ces 2 derniers procédés. Le phénol ne doit pas être utilisé. Le vaccin est réparti dans des récipients stériles, puis cryodesséché jusqu'à obtention d'une préparation dont la teneur en eau favorise la stabilité du vaccin. Les récipients sont ensuite fermés de façon à prévenir toute contamination.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait, s'il lui était appliqué, à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), modifié comme suit : injectez 0,5 mL du vaccin par souris ; injectez 1,0 mL du vaccin par cobaye.

IDENTIFICATION

Le vaccin cholérique cryodesséché reconstitué d'après les indications de l'étiquette est identifié par agglutination spécifique.

ESSAI

**Phénol** (*2.5.15*). Si le phénol est utilisé, sa concentration n'est pas supérieure à 5 g/L.

**Production d'anticorps**. Vérifiez la capacité du vaccin cholérique de stimuler la production d'anticorps tels que les anticorps agglutinants, vibriocides ou hémagglutinants chez le cobaye, le lapin ou la souris. Administrez le vaccin reconstitué à un groupe de 6 animaux au moins. Déterminez, sur la base d'expériences préliminaires, l'intervalle de temps permettant d'obtenir la réponse d'anticorps la plus élevée. Passé ce délai, prélevez le sérum de chaque animal et déterminez-en le titre en anticorps par une méthode appropriée. Le vaccin à examiner satisfait à l'essai si chaque sérotype provoque une réponse significative d'anticorps.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin reconstitué satisfait à l'essai de stérilité.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le procédé utilisé pour inactiver les bactéries,
– le nombre de bactéries par dose humaine.

**01/2008:2327**

# VACCIN CHOLÉRIQUE ORAL INACTIVÉ

## Vaccinum cholerae perorale inactivatum

DÉFINITION

Le vaccin cholérique oral inactivé est une suspension homogène de souches inactivées appropriées de *Vibrio cholerae* du sérogroupe O1, représentant les sérotypes et les biotypes de souches épidémiques. Le vaccin peut contenir la sous-unité B de toxine cholérique (CTB). Juste avant l'ingestion, une dose de suspension vaccinale est mélangée avec un tampon approprié comme indiqué sur l'étiquette.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Le procédé de production doit être validé de façon à établir qu'il donne, de façon reproductible, des vaccins comparables à celui dont l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées.

Le processus de production doit être validé afin de démontrer l'absence de quantités cliniquement significatives de toxine active dans le produit.

*CHOIX DE LA SOUCHE VACCINALE*

Le vaccin est composé d'un mélange de souches épidémiques de *V. cholerae* inactivées par une méthode appropriée comme l'inactivation par la chaleur ou par la formaline. Toutes les souches expriment un lipopolysaccharide (LPS) lisse. La CTB

est produite par la méthode dite de l'ADN recombinant avec une souche dépourvue du gène codant pour la sous-unité A de la toxine cholérique (*ctxA*⁻). Les souches *V. cholerae* sélectionnées produisent peu de toxine cholérique.

L'organisation Mondiale de la Santé (OMS) peut recommander de nouvelles souches vaccinales ou de nouveaux antigènes pouvant être utilisés, si nécessaire, conformément à la réglementation des Etats signataires de la Convention relative à l'élaboration d'une Pharmacopée Européenne.

*LOTS DE SEMENCE*

Les souches de *V. cholerae* utilisées doivent être identifiées par des données historiques, y compris des informations sur leur origine et leur manipulation ultérieure. La caractérisation et la maintenance de la souche recombinante et des plasmides utilisés pour la production de la sous-unité B recombinante de la toxine cholérique (CTBr) et l'origine du gène codant pour la sous-unité B de la toxine cholérique (*ctxB*) sont consignées. La stabilité du plasmide CTBr dans la souche recombinante durant la conservation et à un niveau de passage supérieur à celui utilisé en production est confirmée.

La caractérisation de la CTBr est faite par diverses techniques analytiques qui comprennent la détermination de la taille moléculaire, la charge et la composition en acides aminés. Les techniques appropriées pour ces déterminations comprennent l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) et différentes chromatographies liquides. L'identité du produit est confirmée par un séquençage *N*-terminal et *C*-terminal des acides aminés, au moins partiel.

Les lots de semence primaire sont multipliés sur des plaques de gélose qui peuvent contenir des antibiotiques appropriés. Les colonies servent à produire des lots de semence de travail en milieux liquides exempts d'antibiotiques. Les cultures issues du lot de semence de travail doivent présenter les mêmes caractéristiques que les cultures de la souche dont dérive le lot de semence primaire.

Seul un lot de semence qui satisfait aux essais suivants peut être utilisé pour la préparation de la récolte monovalente.

**Identification**. Les lots de semence primaire sont identifiés par l'examen morphologique des colonies, et par une caractérisation biochimique, à l'aide de dosages moléculaires ou par des immunodosages appropriés. Les lots de semence de travail sont identifiés par l'examen morphologique des colonies et par des dosages moléculaires ou des immunodosages.

**Pureté**. La pureté des lots de semence primaire et des lots de semence de travail est vérifiée par des méthodes de sensibilité appropriée.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

Chaque souche est cultivée séparément à partir du lot de semence de travail.

La pureté, l'identité, l'opacité cellulaire, le pH et les caractéristiques biochimiques des cultures (subcultures et culture principale) sont vérifiés à différentes étapes de la fermentation. Les cultures non satisfaisantes doivent être éliminées.

La conformité des cultures de production vis-à-vis du taux de croissance, du pH et de la production de cellules ou de produits cellulaires est démontrée.

*RÉCOLTE MONOVALENTE*

Seule une récolte monovalente qui satisfait aux spécifications établies pour les essais suivants peut être utilisée.

**pH** (*2.2.3*) : dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Identification**. Les caractéristiques antigéniques pertinentes sont vérifiées par des dosages immunologiques ou biochimiques appropriés.

**Pureté**. La pureté des échantillons de culture est évaluée par un examen microscopique de frottis à coloration de Gram, par ensemencement de milieux de culture appropriés ou par une autre procédure appropriée.

**Opacité**. L'absorbance à 600 nm (*2.2.25*) se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

*CELLULES MONOVALENTES INACTIVÉES EN VRAC*

Afin de limiter le risque de contamination, l'inactivation est effectuée le plus tôt possible après la préparation. Après lavage, les bactéries sont inactivées, soit par traitement au formaldéhyde, soit par chauffage dans des conditions garantissant l'inactivation.

Seul un vrac de cellules monovalentes inactivées qui satisfait aux spécifications établies pour les essais suivants peut être utilisé pour la préparation du vrac final.

**pH** (*2.2.3*) : dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Identification** : vérifiée par agglutination sur lame.

**Inactivation**. L'inactivation complète est vérifiée par une méthode de culture appropriée.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac de cellules monovalentes inactivées satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

**Opacité**. Le procédé d'inactivation peut affecter l'exactitude des mesures de l'opacité.

**Pureté**. La pureté des échantillons de culture est évaluée par un examen microscopique de frottis à coloration de Gram, par ensemencement de milieux de culture appropriés ou par une autre procédure appropriée.

**Teneur en LPS lisse** : vérifiée par un dosage immunologique approprié (*2.7.1*).

**Toxine cholérique résiduelle**. L'absence de toxine cholérique résiduelle est vérifiée par un dosage immunologique approprié (*2.7.1*) ou par un dosage biochimique approprié.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : teneur à déterminer si du formaldéhyde a été utilisé pour l'inactivation.

*CTBr PURIFIÉE*

La production de la CTBr suit les indications permettant de garantir la qualité des produits pharmaceutiques et biologiques préparés par technologie recombinante et est couverte par la monographie *Produits obtenus par la méthode dite de l'ADN recombinant (0784).* Avant la récolte, la pureté et l'opacité de la culture cellulaire sont contrôlées. La CTBr est récoltée par filtration appropriée, concentrée par diafiltration, purifiée par chromatographie, stérilisée par filtration et conservée dans des conditions appropriées. Le pH du mélange d'éluats est ajusté avant l'échange de tampon.

Seule une CTBr purifiée qui satisfait aux spécifications établies pour les essais suivants peut être utilisée pour la préparation du vrac final.

**pH** (*2.2.3*) : dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Pureté** : vérifiée par SDS-PAGE (*2.2.31*) et par une méthode appropriée de chromatographie liquide (*2.2.29*).

**Stérilité** (*2.6.1*). La CTBr satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

**CTBr**. Déterminez la quantité de CTBr par un dosage immunologique approprié (*2.7.1*).

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé par le mélange aseptique d'un tampon approprié avec des vracs monovalents. La CTBr en vrac, lorsqu'elle est utilisée, est ajoutée dans des quantités appropriées. Si des conservateurs sont utilisés, ils peuvent être ajoutés au cours de cette étape.

Seul un vrac final qui satisfait aux essais suivants peut être utilisé pour la préparation du lot final.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin cholérique oral inactivé satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique ou physicochimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

*LOT FINAL*

Le vrac final est mélangé, homogénéisé et réparti aseptiquement dans des récipients appropriés.

Seul un lot final compris dans les limites approuvées pour le produit considéré et conforme à chacun des essais décrits ci-après sous Identification, Essai et Dosage peut être libéré.

IDENTIFICATION

Les sérotypes sont décelés par un dosage immunologique (*2.7.1*) ou moléculaire approprié. La CTBr est décelée par un immunodosage (*2.7.1*) approprié. Les dosages de la teneur en antigène peuvent également servir d'essai d'identité.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L, dans les cas appropriés.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique ou physicochimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

DOSAGE

**Teneur en antigène**. La teneur en LPS lisse et, dans les cas appropriés, la teneur en CTBr, déterminées par un immunodosage approprié (*2.7.1*), se situent dans les limites approuvées pour le produit considéré.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- le procédé d'inactivation,
- le sérogroupe, les sérotypes et biotypes des souches vaccinales,
- le nombre de bactéries par dose humaine,
- la quantité de CTBr.



**01/2009:1219**

# VACCIN CONJUGUÉ DE L'HAEMOPHILUS TYPE b

## Vaccinum haemophili stirpi b coniugatum

DÉFINITION

Le vaccin conjugué de l'haemophilus type b est une préparation liquide ou cryodesséchée d'un polyoside obtenu à partir d'une souche appropriée d'*Haemophilus influenzae* type b, couplé par liaison covalente à une protéine vectrice. Le polyoside est du phosphate de polyribosylribitol, également appelé PRP, un copolymère linéaire constitué d'un enchaînement d'unités 3-β-D-ribofuranosyl-(1→1)-ribitol-5-phosphate [$(C_{10}H_{19}O_{12}P)_n$], de taille moléculaire définie. La protéine vectrice conjuguée au polyoside est capable d'induire une réponse immunitaire des lymphocytes B, dépendante des lymphocytes T, vis-à-vis du polyoside.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit avoir été établi que le procédé de production employé fournit de façon régulière un vaccin conjugué de l'haemophilus type b dont l'innocuité et le pouvoir immunogène pour l'homme sont satisfaisants. Le PRP et la protéine vectrice sont préparés selon un système de lot de semence.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

Pendant les études de développement et chaque fois qu'il est nécessaire de revalider le procédé de production, il doit être démontré par un essai chez l'animal que le vaccin est capable d'induire de façon régulière une réponse immunitaire des lymphocytes B, dépendante des lymphocytes T.

La stabilité du lot final et des substances intermédiaires appropriées est évaluée au moyen d'un ou de plusieurs essais indicatifs. Les essais indicatifs de stabilité sont par exemple la détermination de la taille moléculaire, la détermination du PRP libre dans le conjugué et l'essai du pouvoir immunogène chez la souris. En fonction des résultats des essais de stabilité, des spécifications de libération des lots sont établies pour ces essais indicatifs de façon à démontrer que le vaccin sera satisfaisant à la fin de la période de validité.

*LOTS DE SEMENCE*

Il est démontré que les lots de semence de *H. influenzae* type b sont exempts de contaminants par des méthodes de sensibilité appropriée. Ces méthodes peuvent comprendre un ensemencement en milieux appropriés, l'examen morphologique des colonies, l'examen microscopique de frottis à coloration de Gram et l'agglutination des cultures à l'aide d'antisérums spécifiques appropriés.

Le milieu utilisé pour préserver la viabilité de la souche, soit à l'état cryodesséché, soit congelée, ne contient aucune substance complexe d'origine animale.

Il est recommandé de caractériser le PRP produit au moyen du lot de semence, à l'aide de la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (*2.2.33*).

*POLYOSIDE DE H. INFLUENZAE TYPE b (PRP)*

*H. influenzae* type b est cultivée dans un milieu liquide ne contenant pas de polyosides de masse moléculaire élevée ; si un ingrédient du milieu contient des substances de groupe sanguin, le procédé de fabrication doit être validé pour démontrer que, suite à l'étape de purification, de telles substances ne sont plus décelables. La pureté bactériologique de la culture est vérifiée par des méthodes de sensibilité appropriée. Ces méthodes peuvent comprendre un ensemencement en milieux appropriés, l'examen morphologique des colonies, l'examen microscopique de frottis à coloration de Gram et l'agglutination des cultures à l'aide d'antisérums spécifiques appropriés. La culture peut ensuite être inactivée. Le PRP est séparé du milieu de culture et purifié par une méthode appropriée. Les substances volatiles, dont l'eau, contenues dans le polyoside purifié sont déterminées par une méthode appropriée ; le résultat de la détermination sert à calculer le résultat de certains essais par rapport à la substance desséchée, selon les indications ci-après.

Seul un PRP satisfaisant aux exigences ci-après peut être utilisé pour la préparation du conjugué.

**Identification**. Le PRP est identifié par une méthode immunochimique (*2.7.1*) ou toute autre méthode appropriée, par exemple, la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire $^{1}H$ (*2.2.33*).

**Distribution de taille moléculaire**. Le pourcentage de PRP élué avant une valeur donnée de $K_0$ ou dans un intervalle donné de $K_0$ est déterminé par chromatographie d'exclusion (*2.2.30*). Une valeur acceptable est établie pour chaque produit considéré et il doit être démontré que chaque lot de PRP est conforme à cette limite. Les limites appliquées aux produits actuellement

approuvés, en utilisant la phase stationnaire indiquée, figurent à titre d'information dans le tableau 1219.-1. Dans les cas appropriés, la taille moléculaire est également déterminée après modification chimique du polyoside.

La chromatographie liquide (*2.2.29*) avec détection à angles multiples de dispersion de lumière laser peut également être utilisée pour déterminer la distribution de taille moléculaire.

Une méthode validée de détermination du degré de polymérisation ou de la moyenne massique de la masse moléculaire et de la dispersion de la masse moléculaire peuvent être utilisées au lieu de la détermination de la distribution de taille moléculaire.

**Ribose** (*2.5.31*). Calculée par rapport à la substance desséchée, la teneur en ribose se situe dans les limites approuvées par l'Autorité compétente pour le produit considéré.

**Phosphore** (*2.5.18*). Calculée par rapport à la substance desséchée, la teneur en phosphore se situe dans les limites approuvées par l'Autorité compétente pour le produit considéré.

**Protéines** (*2.5.16*) : au maximum 1,0 pour cent, calculé par rapport à la substance desséchée. Utilisez une quantité de PRP suffisante pour permettre la détection des protéines à partir d'une concentration de 1 pour cent.

**Acides nucléiques** (*2.5.17*) : au maximum 1,0 pour cent, calculé par rapport à la substance desséchée.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 25 UI par microgramme de PRP.

**Résidus de réactifs**. Dans les cas appropriés, des essais sont effectués pour déterminer les résidus des réactifs utilisés pendant l'inactivation et la purification. Une valeur acceptable est établie pour chaque réactif et pour chaque produit considéré et il est démonté que chaque lot de PRP est conforme à cette limite. Si les études de validation ont démontré l'élimination des résidus d'un réactif, l'essai sur le PRP peut être omis.

*PROTÉINE VECTRICE*

La protéine vectrice est choisie de telle sorte que, une fois conjuguée avec le PRP, elle soit capable d'induire une réponse immunitaire des lymphocytes B, dépendante des lymphocytes T. Les protéines vectrices et les méthodes de couplage actuellement approuvées sont indiquées à titre d'information dans le tableau 1219.-1. Les protéines vectrices sont produites par culture de microorganismes appropriés. La pureté bactériologique de la culture est vérifiée. La culture peut être inactivée. La protéine vectrice est purifiée par une méthode appropriée.

Seule une protéine vectrice qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée pour la préparation du conjugué.

**Identification**. La protéine vectrice est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

**Stérilité** (*2.6.1*). Utilisez pour chaque milieu 10 mL ou l'équivalent de 100 doses, en choisissant la quantité moindre.

**Anatoxine diphtérique**. L'anatoxine diphtérique est préparée selon les indications données dans la monographie *Vaccin diphtérique adsorbé (0443)* et satisfait aux exigences pour l'anatoxine purifiée en vrac.

**Anatoxine tétanique**. L'anatoxine tétanique est préparée selon les indications données dans la monographie *Vaccin tétanique adsorbé (0452)* et satisfait aux exigences pour l'anatoxine purifiée en vrac sauf que la pureté antigénique n'est pas inférieure à 1500 Lf par milligramme d'azote protéique.

**Protéine diphtérique CRM 197** : au minimum 90 pour cent, déterminé par une méthode appropriée. Des essais appropriés sont effectués, pour la validation ou en routine, afin de démontrer que le produit n'est pas toxique.

**Complexe protéique de la membrane externe de *Neisseria meningitidis* groupe B (OMP)**. L'OMP satisfait aux essais suivants de lipopolyosides et de pyrogènes.

*Lipopolyosides* : au maximum 8 pour cent, déterminé par une méthode appropriée.

*Pyrogènes* (*2.6.8*). Injectez à chaque lapin 0,25 µg d'OMP par kilogramme de masse corporelle.

*CONJUGUÉ EN VRAC*

Pour pouvoir être conjugué, le PRP subit une modification chimique ; il est généralement partiellement dépolymérisé avant ou au cours de cette modification. Des groupes fonctionnels réactifs ou espaceurs peuvent être introduits dans la protéine vectrice ou le PRP avant l'obtention du conjugué. Afin de contrôler la régularité du procédé, le degré de dérivatisation est déterminé. Le conjugué est obtenu en couplant le PRP et



Tableau 1219.-1. – *Caractéristiques des produits et spécifications du PRP et de la protéine vectrice dans les produits actuellement approuvés*

| **Vecteur** | | | **Polyoside d'Haemophilus** | | **Conjugaison** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Type** | **Pureté** | **Quantité nominate par dose** | **Nature du PRP** | **Quantité nominale par dose** | **Méthode de liaison** | **Procédure** |
| Anatoxine diphtérique | > 1500 Lf par milligramme d'azote | 18 µg | PRP de taille moléculaire réduite $K_0$ : 0,6-0,7, sur *agarose réticulé pour chromatographie R* | 25 µg | activation du PRP par le bromure de cyanogène | anatoxine diphtérique activée (D-AH$^+$), PRP activé au bromure de cyanogène |
| Anatoxine tétanique | > 1500 Lf par milligramme d'azote | 20 µg | PRP ≥ 50 % ≤ $K_0$ : 0,30 sur *agarose réticulé pour chromatographie R* | 10 µg | carbodiimide | PRP activé par ADH (PRP-cov.-AH) + anatoxine tétanique + EDAC |
| Protéine diphtérique CRM 197 | > 90 % de protéine diphtérique | 25 µg | PRP de taille moléculaire réduite Dp = 15-35 ou 10-35 | 10 µg | amination réductrice (une étape) ou activation par le *N*-hydroxysuccinimide | liaison directe du PRP au CRM 197 (activé par le cyanoborohydrure) |
| Protéine de la membrane externe de méningocoque de groupe B (OMP) | vésicules de la membrance protéique externe : ≤ 8 % de lipopolyoside | 125 µg ou 250 µg | PRP de taille moléculaire réduite $K_0$ < 0,6, sur *agarose réticulé pour chromatographie R* ou $M_w$ > 50 × $10^3$ | 7,5 µg ou 15 µg | liaison thioéther | activation du PRP par le CDI PRP-IM + BuA2 + BrAc = PRP-BuA2-BrAc + OMP thioactivée |

ADH = dihydrazide d'acide adipique
BrAc = chlorure de bromoacétyle
BuA2 = butane-1,4-diamide
CDI = carbonyldiimidazole
Dp = degré de polymérisation
EDAC = 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
IM = imidazolium
$M_w$ = moyenne massique de la masse moléculaire

la protéine vectrice par une liaison covalente. Il est soumis à un traitement de purification destiné à éliminer les réactifs résiduels, et dans les cas appropriés, les groupes fonctionnels restés libres sont neutralisés en cours de fabrication au moyen d'agents masquants.

Seul un conjugué en vrac qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la préparation du vrac final. Une valeur acceptable est établie pour chaque essai et chaque produit considéré et il doit être démontré que chaque lot de conjugué est conforme à ces limites. Pour certains des essais, les limites appliquées aux produits actuellement approuvés sont indiquées à titre d'information dans le tableau 1219.-2. Dans le cas d'un vaccin cryodesséché, certains essais peuvent être effectués sur le lot final et non sur le conjugué en vrac lorsque le procédé de cryodessiccation peut modifier le composé à déterminer.

**PRP**. La teneur en PRP est établie par une détermination du phosphore (*2.5.18*) ou du ribose (*2.5.31*) ou par un dosage immunochimique (*2.7.1*).

**Protéine**. La teneur en protéine est déterminée par une méthode chimique appropriée (par exemple, *2.5.16*).

**Rapport des teneurs en PRP et protéines**. Déterminez le rapport par calcul.

**Distribution de taille moléculaire**. Le conjugué en vrac fait l'objet d'un essai de taille moléculaire effectué par chromatographie d'exclusion (*2.2.30*).

**PRP libre**. Plusieurs techniques ont été utilisées pour séparer le PRP libre du conjugué, comme par exemple la précipitation, la filtration sur gel, la chromatographie d'exclusion, d'échange d'anions ou hydrophobe, l'ultrafiltration et l'ultracentrigugation. Le PRP libre peut alors être quantifié par diverses techniques, comme une chromatographie d'échange d'anions de haute performance couplée à une détection par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD) ou un immunodosage avec des anticorps anti-PRP.

**Protéine vectrice libre**. Déterminez la teneur en protéine vectrice libre soit directement par une méthode appropriée soit par calcul à partir des résultats des autres essais. La teneur est comprise dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Groupes fonctionnels libres**. Le conjugué en vrac ne doit contenir aucun groupe fonctionnel n'ayant pas réagi, à moins qu'il n'ait été démontré lors de la validation du procédé que les groupes fonctionnels libres détectables à ce stade sont éliminés ensuite lors du procédé de fabrication (par exemple du fait de la brièveté de leur demi-vie).

**Réactifs résiduels**. L'élimination des réactifs résiduels, par exemple le cyanure, l'EDAC (éthyldiméthylaminopropylcarbodiimide) et le phénol, est confirmée par des essais appropriés ou par une validation du procédé.

**Stérilité** (*2.6.1*). Utilisez pour chaque milieu 10 mL ou l'équivalent de 100 doses, en choisissant la quantité moindre.

*VRAC FINAL*

Le conjugué en vrac est dilué à la concentration finale avec un diluant approprié. Un adjuvant, un conservateur antimicrobien et un stabilisant peuvent être ajoutés avant la dilution.

Seul un vrac final qui satisfait aux essais suivants peut être utilisé pour la préparation du lot final.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL de vrac final pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Seul peut être libéré un lot final qui satisfait à chacune des exigences suivantes et des exigences spécifiées ci-après sous Identification et Essai. Si l'essai de teneur en conservateur antimicrobien a été effectué sur le vaccin final en vrac, il peut être omis sur le lot final.

**pH** (*2.2.3*). Le pH du vaccin, reconstitué si nécessaire, se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**PRP libre**. Plusieurs techniques ont été utilisées pour séparer le PRP libre du conjugué, comme par exemple la précipitation, la filtration sur gel, la chromatographie d'exclusion, d'échange d'anions ou hydrophobe, l'ultrafiltration et l'ultracentrigugation. Le PRP libre peut alors être quantifié par diverses techniques, comme une HPAEC-PAD ou un immunodosage avec des anticorps anti-PRP. La teneur en PRP libre n'est pas supérieure à celle approuvée pour le produit considéré.

## IDENTIFICATION

Le vaccin est identifié par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) pour le PRP.

## ESSAI

**PRP** : au minimum 80 pour cent de la quantité de PRP indiquée sur l'étiquette. La teneur en PRP est déterminée soit par un dosage du ribose (*2.5.31*) ou du phosphore (*2.5.18*), soit par une méthode immunochimique (*2.7.1*), soit par chromatographie liquide d'échange d'anions avec un détecteur ampérométrique à pulsations (*2.2.29*).

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à la valeur dont il a été établi qu'elle correspond au seuil d'efficacité ni supérieure à 115 pour cent de la quantité indiquée sur l'étiquette.

**Eau** (*2.5.12*) : au maximum 3,0 pour cent pour les vaccins cryodesséchés.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin à examiner satisfait à l'essai de stérilité.

**Pyrogènes** (*2.6.8*). Le vaccin à examiner satisfait à l'essai des pyrogènes. Injectez par kilogramme de masse corporelle de lapin une quantité de vaccin équivalente à : 1 µg de PRP si

Tableau 1219.-2. – *Spécifications des conjugués en vrac des produits actuellement approuvés*

| **Essai** | **Protéine vectrice** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Anatoxine diphtérique** | **Anatoxine tétanique** | **CRM 197** | **OMP** |
| PRP libre | < 37 % | < 20 % | < 25 % | < 15 % |
| Protéine libre | < 4 % | < 1 % ; dans les cas appropriés | < 1 % ou 2 % selon la méthode de liaison | non applicable |
| Rapport PRP : protéine | 1,25 - 1,8 | 0,30 - 0,55 | 0,3 - 0,7 | 0,05 - 0,1 |
| Taille moléculaire ($K_0$) : | | | | |
| *agarose réticulé pour chromatographie R* | 95 % < 0,75 | 60 % < 0,2 | 50 % 0,3 - 0,6 | 85 % < 0,3 |
| *agarose réticulé pour chromatographie R1* | 0,6 - 0,7 | 85 % < 0,5 | | |

la protéine vectrice est l'anatoxine diphtérique ou la protéine diphtérique CRM 197 ; 0,1 µg de PRP si la protéine vectrice est l'anatoxine tétanique ; 0,025 µg de PRP si la protéine vectrice est l'OMP.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- le nombre de microgrammes de PRP par dose humaine unitaire,
- la nature de la protéine vectrice et la quantité nominale par dose humaine unitaire.

**01/2008:2112**
**corrigé 6.0**

# VACCIN CONJUGUÉ MÉNINGOCOCCIQUE GROUPE C

## Vaccinum meningococcale classis C coniugatum

DÉFINITION

Le vaccin conjugué méningococcique groupe C est une préparation liquide ou cryodesséchée d'un polyoside capsulaire purifié, obtenu à partir d'une souche appropriée de *Neisseria meningitidis* groupe C, lié de façon covalente à une protéine vectrice. Le polyoside méningococcique groupe C est constitué d'une répétition d'unités d'acide sialique partiellement *O*-acétylées ou *O*-désacétylées, reliées par des ponts glycosidiques 2α→9. La protéine vectrice conjuguée au polyoside méningococcique groupe C est capable d'induire une réponse immunitaire des lymphocytes B, dépendante des lymphocytes T, vis-à-vis du polyoside. Le vaccin peut contenir un adjuvant.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit avoir été établi que le procédé de production employé donne de façon régulière des vaccins conjugués méningococciques groupe C dont l'innocuité et le pouvoir immunogène pour l'homme sont satisfaisants. Le polyoside méningococcique groupe C et la protéine vectrice sont préparés selon un système de lot de semence.

Pendant les études de développement et chaque fois qu'il est nécessaire de revalider le procédé de production, un essai des pyrogènes (*2.6.8*) est réalisé en injectant une dose appropriée du lot final à des lapins. Il est démontré que le vaccin est satisfaisant en ce qui concerne l'absence de pyrogène.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

Pendant les études de développement et chaque fois qu'il est nécessaire de revalider le procédé de production, il doit être démontré par un essai chez l'animal que le vaccin est capable d'induire de façon régulière une réponse immunitaire des lymphocytes B dépendante des lymphocytes T.

La stabilité du lot final et des substances intermédiaires appropriées est évaluée au moyen d'un ou de plusieurs essais indicatifs. Les essais indicatifs de stabilité sont par exemple la détermination de la taille moléculaire, la détermination du polyoside libre dans le conjugué et l'essai du pouvoir immunogène chez l'animal.

*LOTS DE SEMENCE*

Les souches bactériennes utilisées pour préparer les lots de semence primaires doivent être identifiées par des données historiques indiquant notamment leur origine et les essais utilisés pour caractériser la souche. Les cultures préparées à partir du lot de semence de travail doivent avoir les mêmes caractéristiques que les souches utilisées pour préparer les lots de semence primaires.

La pureté des cultures bactériennes est vérifiée par des méthodes de sensibilité appropriée. Ces méthodes peuvent comprendre un ensemencement en milieux appropriés, l'examen morphologique des colonies, l'examen microscopique de frottis à coloration de Gram et l'agglutination des cultures à l'aide d'antisérums spécifiques appropriés.

*POLYOSIDE MÉNINGOCOCCIQUE GROUPE C*

*N. meningitidis* est cultivée dans un milieu liquide ne contenant pas de polyoside de masse moléculaire élevée et exempt d'ingrédient formant un précipité par addition de bromure de cétyltriméthylammonium (BCTA). La culture peut ensuite être désactivée par la chaleur et filtrée avant précipitation des polyosides par addition de BCTA. Le précipité est alors purifié par des méthodes appropriées pour éliminer les acides nucléiques, les protéines et les lipopolysaccharides. L'étape finale de purification consiste en une précipitation éthanolique. Une étape de *O*-désacétylation peut aussi être incluse. Les substances volatiles dont l'eau, contenues dans le polyoside purifié, sont déterminées par une méthode appropriée telle que la thermogravimétrie (*2.2.34*) ; le résultat de la détermination sert à calculer le résultat de certains essais par rapport à la substance desséchée, selon les indications ci-après.

Seul un polyoside méningococcique groupe C satisfaisant aux exigences ci-après peut être utilisé pour la préparation du conjugué.

**Protéine** (*2.5.16*) : au maximum 1,0 pour cent, calculé par rapport à la substance desséchée.

**Acide nucléique** (*2.5.17*) : au maximum 1,0 pour cent, calculé par rapport à la substance desséchée.

**Groupements *O*-acétyle**. Examinez par une méthode appropriée (par exemple, *2.5.19*). Une valeur acceptable est établie pour le produit considéré et il doit être démontré que chaque lot de polyoside méningococcique groupe C est conforme à cette limite.

**Acide sialique** (*2.5.23*) : au minimum 0,800 g d'acide sialique par gramme de polyoside méningococcique groupe C, en utilisant de l'*acide N-acétylneuraminique R* pour préparer la solution témoin.

**Résidus de réactifs**. Dans les cas appropriés, des essais sont effectués pour déterminer les résidus des réactifs utilisés pendant l'inactivation et la purification. Une valeur acceptable pour chaque réactif est établie pour le produit considéré et il est démontré que chaque lot de polyoside méningococcique groupe C est conforme à cette limite. Si les études de validation ont démontré l'élimination des résidus d'un réactif, l'essai sur le polyoside méningococcique groupe C purifié peut être omis.

**Distribution de taille moléculaire**. Examinez par chromatographie d'exclusion (*2.2.30*). Une valeur acceptable est établie pour le produit considéré et il doit être démontré que chaque lot de polyoside méningococcique groupe C est conforme à cette limite. Dans les cas appropriés, la distribution de la taille moléculaire est également déterminée après modification chimique du polyoside méningococcique groupe C.

**Identification et spécificité sérologique**. L'identité et la spécificité sérologique sont déterminées par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) ou toute autre méthode appropriée, par exemple la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire $^{1}H$ (*2.2.33*).

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 100 UI par microgramme de polyoside méningococcique groupe C.

*PROTÉINE VECTRICE*

La protéine vectrice est choisie de telle sorte que, une fois conjuguée avec le polyoside méningococcique groupe C, elle soit capable d'induire une réponse immunitaire dépendante des lymphocytes T. L'anatoxine tétanique et la protéine mutante CRM197 apparentée à la toxine diphtérique mais

Vaccins

dépourvue de propriétés toxiques, conviennent. Les protéines vectrices sont produites par culture de microorganismes appropriés. La pureté bactériologique de la culture est vérifiée.

Seule une protéine vectrice qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée pour la préparation du conjugué.

**Identification**. La protéine vectrice est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

**Protéine apparentée à la toxine diphtérique**. Lorsque la protéine apparentée à la toxine diphtérique est utilisée comme vecteur, elle contient au minimum 90 pour cent de CRM197, déterminé par une méthode appropriée. Des essais appropriés sont effectués, pour la validation ou en routine, afin de démontrer que le produit n'est pas toxique.

**Anatoxine tétanique**. Lorsque l'anatoxine tétanique est utilisée comme vecteur, elle est préparée selon les indications données dans la monographie *Vaccin tétanique adsorbé (0452)* et satisfait aux exigences pour l'anatoxine purifiée en vrac sauf que la pureté antigénique (*2.7.27*) est au minimum de 1500 Lf par milligramme d'azote protéique.

*CONJUGUÉ EN VRAC*

Pour pouvoir être conjugué, le polyoside méningococcique groupe C subit une modification chimique ; il est généralement partiellement dépolymérisé avant ou au cours de cette modification. Le conjugué est obtenu en couplant le polyoside méningococcique groupe C activé et la protéine vectrice par une liaison covalente. Les techniques de purification du conjugué sont destinées à éliminer les réactifs résiduels utilisés pour la conjugaison. L'élimination des réactifs résiduels et des sous-produits de la réaction est confirmée par un essai approprié ou par la validation du procédé de purification.

Seul un conjugué en vrac qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la préparation du vrac final. Des limites d'acceptabilité sont établies pour chaque essai et chaque produit considéré et il doit être démontré que chaque lot de conjugué est conforme à ces limites.

**Distribution de taille moléculaire**. Examinez par chromatographie d'exclusion (*2.2.30*). Une valeur acceptable est établie pour le produit considéré et il est démontré que chaque lot de conjugué en vrac est conforme à cette limite.

**Osides**. La teneur en osides est déterminée par un dosage approprié validé (par exemple *2.5.23*). La chromatographie liquide à échange d'anions avec un détecteur ampérométrique à pulsations (*2.2.29*) peut également être utilisée pour déterminer la teneur en osides. Une valeur acceptable est établie pour le produit considéré et il est démontré que chaque lot de conjugué en vrac est conforme à cette limite.

**Protéine**. La teneur en protéine est déterminée par une méthode chimique appropriée (par exemple, *2.5.16*). Une valeur acceptable est établie pour le produit considéré et il est démontré que chaque lot de conjugué en vrac est conforme à cette limite.

**Rapport des teneurs en osides et protéines**. Déterminez le rapport par calcul.

**Osides libres**. La détermination est effectuée après élimination du conjugué, notamment par chromatographie liquide à échange d'anions, chromatographie d'exclusion ou hydrophobe, par ultrafiltration ou par d'autres procédés validés. Une valeur acceptable est établie pour le produit considéré et il est démontré que chaque lot de conjugué en vrac est conforme à cette limite.

**Protéine vectrice libre**. Déterminez la teneur en protéine vectrice libre soit directement par une méthode appropriée, soit par calcul à partir des résultats des autres essais. Une valeur acceptable est établie pour le produit considéré et il est démontré que chaque lot de conjugué en vrac est conforme à cette limite.

**Résidus de réactifs**. L'élimination de réactifs résiduels tels que le cyanure est confirmée par un essai approprié ou par validation du procédé.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le conjugué en vrac satisfait à l'essai de stérilité, effectué en utilisant 10 mL pour chaque milieu ou l'équivalent de 100 doses, en choisissant la quantité minimale.

*VRAC FINAL*

Un adjuvant et un stabilisant peuvent être ajoutés au conjugué en vrac avant dilution à la concentration finale avec un diluant approprié.

Seul un vrac final qui satisfait à l'essai suivant et qui se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré peut être utilisé pour la préparation du lot final.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité, effectué en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Seul peut être libéré un lot final qui se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré et qui satisfait à chacune des exigences spécifiées ci-après sous Identification, Essai et Activité.

## IDENTIFICATION

Le vaccin est identifié par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

## ESSAI

**pH** (*2.2.3*). Le pH du vaccin, reconstitué si nécessaire, ne diffère pas de plus de 0,5 unité pH de la limite approuvée pour le produit considéré.

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Eau** (*2.5.12*) : au maximum 3,0 pour cent pour les vaccins cryodesséchés.

**Osides libres**. La détermination est effectuée après élimination du conjugué, notamment par chromatographie liquide à échange d'anions, chromatographie d'exclusion ou hydrophobe, par ultrafiltration ou par d'autres procédés validés. Une valeur acceptable, compatible avec un pouvoir immunogène adéquat tel qu'établi par les essais cliniques, est fixée pour le produit considéré et il est démontré que chaque lot final est conforme à cette limite.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin à examiner satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 25 UI par dose humaine unitaire.

## ACTIVITÉ

**Osides** : au minimum 80 pour cent de la quantité de polyoside méningococcique groupe C indiquée sur l'étiquette. La teneur en osides est déterminée par un dosage approprié validé, comme par exemple le dosage de l'acide sialique (*2.5.23*) ou la chromatographie liquide à échange d'anions avec un détecteur ampérométrique à pulsations (*2.2.29*).

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nombre de microgrammes de polyoside méningococcique groupe C par dose humaine,
– le type et le nombre de microgrammes de protéine vectrice par dose humaine.

**01/2010:0161**

# VACCIN COQUELUCHEUX ADSORBÉ À CELLULES ENTIÈRES

## Vaccinum pertussis ex cellulis integris adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin coquelucheux adsorbé à cellules entières est une suspension stérile de cellules entières inactivées d'une ou de plusieurs souches de *Bordetella pertussis*, traitées de manière à réduire leur toxicité au minimum tout en maintenant leur activité. Le vaccin contient un adsorbant minéral tel que du phosphate d'aluminium hydraté ou de l'hydroxyde d'aluminium.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit être établi que le procédé de production utilisé donne de façon reproductible des vaccins comparables à celui dont l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées.

Les niveaux de toxine coquelucheuse, de toxine thermosensible active (toxine dermonécrotique) ou de cytotoxine trachéale doivent être comparables aux niveaux présents dans le vaccin dont l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées et avoir été approuvés par l'Autorité compétente.

*CHOIX DE LA SOUCHE VACCINALE*

Le vaccin est composé d'un mélange d'une ou de plusieurs souches de *B. pertussis*. Les souches de *B. pertussis* utilisées pour la préparation des vaccins sont bien caractérisées et sélectionnées de façon à obtenir un vaccin final contenant principalement des cellules en phase I présentant des fimbriae des types 2 et 3, déterminées par un essai d'agglutination ou toute autre méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

*LOTS DE SEMENCE*

La production du vaccin coquelucheux est basée sur un système de lot de semence.

Les souches de *B. pertussis* utilisées sont identifiées par des données historiques complètes, y compris des informations sur leur origine et leur manipulation ultérieure, sur les caractéristiques de leur isolement, et plus particulièrement sur tous les essais périodiquement effectués pour vérifier les caractères des souches.

Les milieux choisis pour la multiplication de *B. pertussis* doivent être sélectionnés avec soin et permettre au microorganisme de conserver les caractéristiques de la phase I.

Tout sang ou produit sanguin animal éventuellement utilisé est éliminé par lavage des bactéries récoltées.

Le sang humain ou les produits sanguins humains ne sont utilisés dans aucun des milieux de culture pour la propagation des bactéries, que ce soit pour la semence ou pour le vaccin.

*PROPAGATION ET RÉCOLTE*

Chaque souche est cultivée séparément à partir du lot de semence de travail.

Les cultures sont contrôlées à différentes étapes de la fermentation (subcultures et culture principale) pour en vérifier la pureté, l'identité, l'opacité cellulaire et le pH. Les cultures non satisfaisantes doivent être éliminées.

Il convient de démontrer que les cultures de production sont satisfaisantes, de façon reproductible, quant à leur taux de croissance, leur pH et quant au rendement de la production de cellules ou de produits cellulaires.

Les bactéries sont récoltées et peuvent être lavées pour éliminer les substances dérivées du milieu puis mises en suspension dans une solution de chlorure de sodium à 9 g/L ou autre solution isotonique appropriée.

*RÉCOLTE MONOVALENTE*

La régularité de la production est contrôlée en vérifiant le taux de croissance, le pH et le rendement ainsi qu'en démontrant les caractéristiques des organismes de phase I dans la culture, comme la présence de fimbriae des types 2 et 3, et l'activité hémolytique. Des récoltes individuelles ne sont utilisées pour le vrac final que s'il a été démontré qu'elles contiennent des cellules de *B. pertussis* présentant les mêmes caractéristiques que la souche d'origine quant à la croissance et aux agglutinogènes et qu'elles sont exemptes de contamination bactérienne et fongique.

Seule une récolte monovalente qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée pour les étapes suivantes de la production.

**Pureté**. La pureté d'échantillons de récoltes individuelles prélevés avant inactivation est évaluée par un examen microscopique de frottis à coloration de Gram, par un ensemencement en milieu de culture approprié ou par une autre procédure appropriée.

**Opacité**. L'opacité de chaque récolte individuelle est mesurée au plus tard 2 semaines après la récolte et avant que la suspension bactérienne n'ait été soumise à un procédé susceptible d'en altérer l'opacité, par comparaison avec la préparation internationale de référence d'opacité, et utilisée comme base de calcul pour les stades ultérieurs de la préparation du vaccin. La correspondance entre les Unités Internationales et la préparation internationale de référence est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

Une méthode spectrophotométrique validée par rapport à la préparation de référence d'opacité peut être utilisée et l'absorbance peut, par exemple, être mesurée à 600 nm (*2.2.25*).

*INACTIVATION ET DÉTOXIFICATION DE LA SUSPENSION DE B. PERTUSSIS*

L'inactivation est effectuée dès que possible après le prélèvement d'échantillons des récoltes individuelles pour le contrôle de la pureté et la mesure de l'opacité. Les bactéries sont tuées et détoxifiées dans des conditions contrôlées soit par un agent chimique approprié, soit par chauffage, soit par une combinaison de ces méthodes. La suspension est maintenue à 5 ± 3 °C pendant une période appropriée pour en diminuer la toxicité.

Seul un vrac monovalent inactivé qui satisfait aux spécifications établies pour les essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du vrac final.

***B. pertussis* vivantes résiduelles**. L'inactivation des cellules entières de *B. pertussis* est vérifiée sur un milieu de culture approprié.

**Toxine coquelucheuse**. La présence de toxine coquelucheuse est mesurée par un titrage de culture cellulaire CHO avec détermination semi-quantitative et l'intervalle est déterminé pour le produit considéré.

**pH** (*2.2.3*) : dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Identification** : vérifiée par un essai d'agglutination ou un essai d'immunodiffusion approprié.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin à examiner satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL pour chaque milieu.

**Opacité**. L'opacité de chaque récolte individuelle est mesurée en phase finale, à la fin du principal procédé de fermentation, par comparaison avec la préparation internationale de référence d'opacité. La correspondance entre les Unités Internationales et la préparation internationale de référence est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé. L'absorbance, mesurée par exemple à 600 nm (*2.2.25*), se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé par mélange, dans des conditions d'asepsie, de quantités appropriées des récoltes individuelles inactivées.

Vaccins

Si 2 souches, ou davantage, de *B. pertussis* sont utilisées, la proportion de chacune des souches, exprimée en unités d'opacité, doit être similaire dans les lots successifs de vrac final. La concentration bactérienne du vrac final ne doit pas dépasser celle correspondant à une opacité de 20 UI par dose humaine unitaire. L'opacité mesurée sur les récoltes individuelles sert à calculer la concentration bactérienne dans le vrac final. Un adsorbant minéral tel que du phosphate d'aluminium hydraté ou de l'hydroxyde d'aluminium est ajouté à la suspension de cellules. Des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent être ajoutés. Le phénol ne doit pas être utilisé comme conservateur.

Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Fimbriae**. Chaque vrac fait l'objet d'un examen, avant l'addition d'adsorbant, pour vérifier la présence de fimbriae des types 2 et 3 et ainsi garantir que la croissance bactérienne a donné lieu à une expression appropriée.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. La teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

*LOT FINAL*

Le vrac final est mélangé, homogénéisé et réparti aseptiquement dans des récipients appropriés.

Seul un lot final compris dans les limites approuvées pour le produit considéré et conforme à chacun des essais décrits ci-après sous Identification, Essai et Dosage peut être libéré. Si les essais Toxicité spécifique, Formaldéhyde libre et Conservateur antimicrobien, et la détermination de l'activité ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

## IDENTIFICATION

Dissolvez dans le vaccin coquelucheux adsorbé à cellules entières une quantité suffisante de *citrate de sodium R* pour obtenir une solution à 100 g/L. Faites incuber à 37 °C pendant environ 16 h et centrifugez pour sédimenter les bactéries. L'identification du vaccin coquelucheux est basée sur une réaction immunologique comme, par exemple, l'agglutination de bactéries remises en suspension avec un sérum anticoquelucheux spécifique ou toute autre méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

## ESSAI

**Toxicité spécifique**. Utilisez au moins 5 souris en bonne santé, pesant 14-16 g, pour le vaccin et pour la solution saline de contrôle. Les souris doivent être de même sexe ou mâles et femelles répartis également entre les groupes. Injectez à chaque souris du groupe à vacciner, par voie intrapéritonéale et sous un volume de 0,5 mL, une quantité de vaccin équivalant à au moins la moitié de la dose humaine unitaire. Injectez à chaque souris du groupe témoin 0,5 mL d'une solution stérile de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, contenant de préférence, le cas échéant, la même quantité de conservateur antimicrobien que celle injectée avec le vaccin. Pesez les souris immédiatement avant l'injection, puis 72 h après, puis 7 jours après l'injection. Le vaccin satisfait à l'essai si : (a) après 72 h la masse moyenne du groupe de souris vaccinées n'est pas inférieure à ce qu'elle était avant l'injection ; (b) après 7 jours le gain pondéral moyen par souris vaccinée n'est pas inférieur à 60 pour cent de celui par souris témoin ; et (c) au maximum 5 pour cent du nombre total de souris vaccinées meurent durant l'essai. Si l'essai est effectué en utilisant 5 souris et que 1 souris vaccinée meurt, l'essai peut être répété en utilisant 15 souris et les résultats des 2 essais peuvent être combinés.

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L, dans les cas appropriés.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à la teneur minimale qui s'est avérée efficace et elle n'est pas supérieure à 115 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin coquelucheux adsorbé à cellules entières satisfait à l'essai de stérilité.

## DOSAGE

Effectuez le titrage de l'activité du vaccin coquelucheux (*2.7.7*).

L'activité estimée n'est pas inférieure à 4,0 UI par dose humaine unitaire et la limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 2,0 UI par dose humaine unitaire.

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nombre minimal d'Unités Internationales par dose humaine unitaire,
– la méthode d'inactivation utilisée,
– le nom et la quantité d'adsorbant,
– que le vaccin doit être agité avant l'emploi,
– que le vaccin ne doit pas être congelé.

**01/2008:1595**
**corrigé 6.0**

# VACCIN COQUELUCHEUX (ADSORBÉ, COPURIFIÉ, ACELLULAIRE)

## Vaccinum pertussis sine cellulis copurificatum adsorbatum

## DÉFINITION

Le vaccin coquelucheux (adsorbé, copurifié, acellulaire) est une préparation de composants antigéniques de *Bordetella pertussis*, adsorbés sur un support minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté.

Le vaccin contient une fraction antigénique purifiée sans séparation préalable des composants individuels. Cette fraction antigénique est traitée par une méthode permettant de transformer la toxine coquelucheuse en anatoxine de façon à la rendre inoffensive tout en préservant les propriétés immunogènes de l'ensemble des composants et en évitant la réversibilité à la toxine. La fraction antigénique est composée d'anatoxine coquelucheuse, d'hémagglutinine filamenteuse, de pertactine (une protéine de la membrane externe de 69 kDa) et d'autres composants définis de *B. pertussis* tels que les antigènes fimbria-2 et fimbria-3. Le vaccin peut avoir une teneur en toxine coquelucheuse résiduelle qui ne dépasse pas celle approuvée par l'Autorité compétente. La composition et les caractéristiques antigéniques reposent sur la démonstration de l'induction d'une protection et de l'absence de réactions inattendues dans le groupe cible auquel est destiné le vaccin.

## PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit être établi que le procédé de production utilisé donne de façon reproductible des vaccins comparables à celui pour lequel l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées.

*Vaccin de référence*. Un lot de vaccin démontré efficace lors d'essais cliniques ou un autre lot représentatif est utilisé comme vaccin de référence. Le lot représentatif doit être préparé par un procédé strictement identique à celui utilisé pour le vaccin

soumis aux essais cliniques. Le vaccin de référence est de préférence stabilisé, par une méthode dont il a été démontré qu'elle n'a aucun effet significatif sur la détermination d'activité lorsque les lots stabilisés et les lots non stabilisés sont comparés.

*CARACTÉRISATION DES COMPOSANTS*

Lors du développement du vaccin, le procédé de production fait l'objet d'une validation visant à démontrer qu'il permet d'obtenir de façon reproductible une fraction antigénique qui satisfait aux essais suivants ; une fois la reproductibilité du procédé démontrée, ces essais ne sont pas nécessairement effectués en routine sur chaque lot.

**Adénylcyclase**. Déterminée par immunotransfert ou par une autre méthode appropriée, la quantité d'adénylcyclase contenue dans l'équivalent de 1 dose du vaccin final n'est pas supérieure à 500 ng.

**Cytotoxine trachéale**. Déterminée par une méthode appropriée, par exemple un titrage biologique ou une chromatographie liquide (*2.2.29*), la quantité de cytotoxine trachéale contenue dans l'équivalent de 1 dose du vaccin final n'est pas supérieure à 2 pmol.

**Absence de toxine dermonécrotique résiduelle**. A 3 souriceaux non sevrés, injectez par voie intradermique et sous un volume de 0,1 mL, une quantité de fraction antigénique équivalant à 1 dose du vaccin final. Placez les animaux en observation pendant 48 h. Aucune réaction dermonécrotique n'est constatée.

**Propriétés spécifiques**. La fraction antigénique est analysée par une ou plusieurs des méthodes indiquées ci-après, afin d'établir l'identité et les propriétés spécifiques (activité par quantité unitaire de protéine) de ses composants par comparaison à des préparations de référence.

*Toxine coquelucheuse*. Méthodes *in vitro* : effet d'aggrégation des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) et hémagglutination. Méthodes *in vivo* : stimulation de la lymphocytose, sensibilisation à l'histamine, action sur l'insulinosécrétion. La toxine possède une activité ADP-ribosyl-transférase utilisant la transducine comme accepteur.

*Hémagglutinine filamenteuse*. Hémagglutination et inhibition par un anticorps spécifique.

*Pertactine, antigènes fimbria-2 et fimbria-3*. Réactivité à des anticorps spécifiques.

*Anatoxine coquelucheuse*. L'anatoxine induit chez les animaux la production d'anticorps capables d'inhiber toutes les propriétés de la toxine coquelucheuse.

*FRACTION ANTIGÉNIQUE PURIFIÉE*

La fraction antigénique est préparée selon un système de lots de semence. Les cultures de semence sont organisées de façon à maintenir le pouvoir toxigène ou, si besoin est, à le restaurer par une sélection délibérée.

Aucun des milieux utilisés aux différents stades de la production ne doit contenir de sang ou de dérivés sanguins d'origine humaine. Seuls les milieux utilisés pour la préparation des lots de semence et des inoculums peuvent contenir du sang ou des dérivés sanguins d'origine animale.

La fraction antigénique est purifiée puis, après caractérisation appropriée, détoxifiée au moyen de réactifs adéquats, par une méthode limitant au minimum le risque de réversion de l'anatoxine à la toxine, notamment lors de la conservation ou d'une exposition à la chaleur. Le procédé de purification est validé pour démontrer qu'il y a une réduction appropriée de la teneur en substances utilisées pendant la culture ou la purification.

La teneur en endotoxines bactériennes (*2.6.14*) est déterminée pour suivre la procédure de purification et limiter la teneur en endotoxines du vaccin final. Les limites sont telles que le vaccin final contient au maximum 100 UI d'endotoxines par dose humaine unitaire.

Avant la détoxification, la pureté de la fraction antigénique est déterminée par une méthode appropriée, telle que l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) ou la chromatographie liquide. La méthode SDS-PAGE ou l'analyse par immunotransfert au moyen d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques peuvent également être utilisées pour une caractérisation des sous-unités. Des limites sont établies pour chaque produit individuel.

Seule peut être utilisée pour la préparation du vrac final une fraction antigénique purifiée qui satisfait aux spécifications ci-après.

**Stérilité**. Effectuez l'essai de stérilité (*2.6.1*) en utilisant pour chaque milieu une quantité de préparation équivalant à au moins 100 doses de vaccin.

**Toxine coquelucheuse résiduelle**. Utilisez 3 groupes d'au moins 5 souris sensibles à l'histamine, pesant chacune de 18 g à 26 g. A l'aide de solution saline tamponnée phosphate contenant 2 g/L de gélatine, préparez une série de dilutions de la fraction antigénique purifiée dont il a été démontré qu'elles donnent une réponse graduée. Attribuez chaque dilution à un groupe séparé de souris et injectez à chaque souris, par voie intrapéritonéale, la dilution attribuée à son groupe. Injectez le diluant , par voie intrapéritonéale, à un 4<sup>e</sup> groupe de souris (témoins). 5 jours plus tard, injectez à chaque souris, par voie intrapéritonéale, 1 mg d'histamine base sous un volume maximal de 0,5 mL. Notez le nombre d'animaux qui meurent dans les 24 h suivant l'épreuve histaminique. Calculez par des méthodes statistiques appropriées comme l'analyse de probits (voir *5.3*) la masse ou le volume de préparation qui produit la sensibilisation de 50 pour cent des souris. L'activité résiduelle de la toxine coquelucheuse n'est pas supérieure à celle de lots dont l'innocuité a été établie lors des études cliniques.

La sensibilité à l'histamine de la lignée de souris utilisée est vérifiée à intervalles appropriés par la méthode suivante : injectez des dilutions au 1/3 d'une préparation de référence de la toxine coquelucheuse dans de la solution saline tamponnée phosphate contenant 2 g/L de gélatine, et effectuez une épreuve histaminique comme indiqué ci-dessus. La lignée est acceptable si plus de 50 pour cent des animaux sont sensibilisés par 50 ng de toxine coquelucheuse et si aucun des animaux témoins traités avec le diluant seul, puis soumis à l'épreuve histaminique, ne présente de signes de sensibilisation.

La *toxine coquelucheuse PBR* convient comme toxine coquelucheuse de référence.

Un essai validé basé sur l'effet d'aggrégation des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) peut être utilisé au lieu de l'essai sur souris.

**Teneur résiduelle en agents de détoxification et autres réactifs**. La teneur résiduelle en agents de détoxification et autres réactifs est déterminée et démontrée conforme à la limite approuvée sauf si la validation du procédé a démontré une réduction appropriée.

**Teneur en antigènes**. Effectuez une détermination quantitative complète de la composition en antigènes de la fraction antigénique par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) et déterminez la teneur en azote protéique par minéralisation par l'acide sulfurique (*2.5.9*) ou par une autre méthode appropriée. Le rapport entre la teneur totale en antigènes et la teneur en azote protéique se situe dans les limites établies pour le produit.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé par adsorption d'une quantité appropriée de la fraction antigénique sur de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté. Un conservateur antimicrobien approprié peut être ajouté.

Seul peut être utilisé pour la préparation d'un lot final un vrac final qui satisfait aux spécifications ci-après.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. La valeur obtenue n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité**. Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Seul un lot final qui satisfait aux essais décrits ci-après sous Identification, Essai et Activité peut être libéré.

Si les essais de toxine coquelucheuse résiduelle, de réversibilité de l'anatoxine, de teneur en conservateur antimicrobien, de formaldéhyde libre et le titrage d'activité ont été réalisés avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

IDENTIFICATION

Traitez le vaccin par un procédé de désorption approprié. Le procédé suivant peut être utilisé : dissolvez dans le vaccin à examiner la quantité de *citrate de sodium R* nécessaire pour obtenir une solution à 10 g/L ; faites incuber à 37 °C pendant environ 16 h puis centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Examiné par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), le surnageant réagit avec des immunosérums spécifiques des différents composants indiqués sur l'étiquette.

ESSAI

**Toxine coquelucheuse résiduelle**. Utilisez 3 groupes d'au moins 5 souris sensibles à l'histamine (voir sous Production), pesant chacune de 18 g à 26 g. A l'aide de solution saline tamponnée phosphate contenant 2 g/L de gélatine, préparez une série de dilutions du vaccin à examiner dont il a été démontré qu'elles donnent une réponse graduelle. Attribuez chaque dilution à un groupe séparé de souris et injectez à chaque souris, par voie intrapéritonéale, la dilution attribuée à son groupe. Injectez le diluant, par voie intrapéritonéale, à un 4[e] groupe de souris (témoins). 5 jours plus tard, injectez aux souris, par voie intrapéritonéale, 1 mg d'histamine base sous un volume maximal de 0,5 mL. Notez le nombre d'animaux qui meurent dans les 24 h suivant l'épreuve histaminique. Calculez par des méthodes statistiques appropriées comme l'analyse de probits (voir *5.3*) la masse ou le volume de préparation qui produit la sensibilisation de 50 pour cent des souris. L'activité résiduelle de la toxine coquelucheuse n'est pas supérieure à celle de lots dont l'innocuité a été établie lors des études cliniques.

**Réversibilité de l'anatoxine**. Opérez comme décrit ci-dessus dans l'essai de toxine coquelucheuse résiduelle mais en utilisant en parallèle le vaccin incubé à 37 °C pendant 4 semaines et un échantillon conservé à une température de 2 °C à 8 °C. Le degré de réversibilité n'est pas supérieur à celui de lots dont l'innocuité a été établie lors des études cliniques.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à la valeur minimale efficace préalablement établie ni supérieure à 115 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Stérilité**. Le vaccin à examiner satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*).

ACTIVITÉ

Le vaccin satisfait au titrage d'activité du vaccin coquelucheux acellulaire (*2.7.16*).

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- le nom et la quantité des composants antigéniques du vaccin,
- la teneur maximale en toxine coquelucheuse résiduelle,
- le degré maximal de réversion de l'anatoxine à la toxine pendant la durée de validité,
- le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
- que le vaccin doit être agité avant emploi,
- que le vaccin ne doit pas être congelé.

**01/2008:1356**
**corrigé 6.0**

# VACCIN COQUELUCHEUX (ADSORBÉ, MULTICOMPOSÉ, ACELLULAIRE)

## Vaccinum pertussis sine cellulis ex elementis praeparatum adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin coquelucheux (adsorbé, multicomposé, acellulaire) est une préparation de composants antigéniques de *Bordetella pertussis*, préparés et purifiés séparément puis adsorbés sur un support minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté.

Le vaccin contient soit l'anatoxine coquelucheuse soit une protéine apparentée à la toxine coquelucheuse mais dénuée de propriétés toxiques, obtenue par l'expression d'une forme modifiée génétiquement du gène correspondant. L'anatoxine est obtenue à partir de la toxine par une méthode qui la rend inoffensive mais qui maintient des propriétés immunogènes adéquates et évite la réversibilité. Le vaccin peut également contenir l'hémagglutinine filamenteuse et la pertactine (protéine de 69 kDa de la membrane externe) et d'autres composants définis de *B. pertussis*, par exemple les antigènes fimbria-2 et fimbria-3, ces 2 derniers antigènes pouvant être copurifiés. La composition des antigènes et leurs caractéristiques reposent sur la démonstration de l'induction d'une protection et de l'absence de réactions inattendues dans le groupe cible auquel est destiné le vaccin.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit être établi que le procédé de production utilisé permet d'obtenir de façon constante des vaccins comparables à celui pour lequel l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées.

Si une forme génétiquement modifiée de *B. pertussis* est utilisée, la régularité de la production et la stabilité génétique doivent être démontrées conformément aux exigences de la monographie *Produits obtenus par la méthode dite de l'ADN recombinant (0784)*.

*Vaccin de référence*. Un lot de vaccin démontré efficace lors d'essais cliniques ou un autre lot représentatif est utilisé comme vaccin de référence. Le lot représentatif doit être préparé par un procédé strictement identique à celui utilisé pour le vaccin soumis aux essais cliniques. Le vaccin de référence est de préférence stabilisé, par une méthode dont il a été démontré qu'elle n'a aucun effet significatif sur la détermination d'activité lorsque les lots stabilisés et les lots non stabilisés sont comparés.

*CARACTÉRISATION DES COMPOSANTS*

Lors du développement du vaccin, le procédé de production doit être validé afin de démontrer qu'il permet d'obtenir de façon constante des composants individuels qui satisfont aux essais ci-après ; une fois la régularité du procédé démontrée, ces essais ne sont pas nécessairement effectués en routine sur chaque lot.

**Adénylcyclase**. Déterminée par immunotransfert ou par une autre méthode appropriée, la quantité d'adénylcyclase contenue dans l'équivalent de 1 dose du vaccin final n'est pas supérieure à 500 ng.

Vaccins

**Cytotoxine trachéale**. Déterminée par une méthode appropriée, par exemple un dosage biologique ou la chromatographie liquide (*2.2.29*), la quantité de cytotoxine trachéale contenue dans l'équivalent d'une dose du vaccin final n'est pas supérieure à 2 pmol.

**Absence de toxine dermonécrotique résiduelle**. A 3 souriceaux, injectez par voie intradermique et sous un volume de 0,1 mL, une quantité de composant individuel équivalant à une dose du vaccin final. Placez les animaux en observation pendant 48 h. Aucune réaction dermonécrotique n'est constatée.

**Propriétés spécifiques**. Les composants du vaccin sont analysés par une ou plusieurs des méthodes indiquées ci-après, afin d'établir leur identité et leurs propriétés spécifiques (activité par quantité unitaire de protéine) par comparaison à des préparations de référence.

*Toxine coquelucheuse.* Méthodes *in vitro* : effet d'agrégation des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) et hémagglutination. Méthodes *in vivo* : stimulation de la lymphocytose, sensibilisation à l'histamine, action sur l'insulinosécrétion. La toxine possède une activité ADP-ribosyl-transférase utilisant la transducine comme accepteur.

*Hémagglutinine filamenteuse.* Hémagglutination et inhibition par un anticorps spécifique.

*Pertactine, antigènes fimbria-2 et fimbria-3.* Réactivité à des anticorps spécifiques.

*Anatoxine coquelucheuse.* L'anatoxine induit chez les animaux la production d'anticorps capables d'inhiber toutes les propriétés de la toxine coquelucheuse.

*COMPOSANTS PURIFIÉS*

La production de chaque composant du vaccin est basée sur un système de lot de semence. Les cultures de semence à partir desquelles est préparée la toxine sont organisées de façon à maintenir le pouvoir toxigène ou, si besoin est, à le restaurer par une nouvelle sélection.

Aucun des milieux utilisés aux différents stades de la production ne doit contenir de sang ou de produits du sang d'origine humaine. Seuls les milieux utilisés pour la préparation des lots de semence peuvent contenir du sang ou des dérivés sanguins d'origine animale.

La toxine coquelucheuse et, le cas échéant, l'hémagglutinine filamenteuse et la pertactine sont purifiées, puis, après caractérisation appropriée, détoxifiées au moyen d'agents chimiques adéquats par une méthode éliminant tout risque de réversibilité à la toxine, notamment lors de la conservation ou d'une exposition à la chaleur. Les autres composants éventuels tels que les antigènes fimbria-2 et fimbria-3 sont purifiés, soit séparément, soit ensemble, puis caractérisés ; il doit être démontré qu'ils ne comprennent pas de substances toxiques. Le procédé de purification est validé pour démontrer qu'il y a une réduction appropriée de la teneur en substances utilisées pendant la culture ou la purification.

La teneur en endotoxines bactériennes (*2.6.14*) est déterminée pour suivre la procédure de purification et limiter la teneur en endotoxines du vaccin final. Les limites admises pour les composants individuels sont telles que le vaccin final contient moins de 100 UI par dose humaine unitaire.

Avant la détoxification, la pureté des différents composants est déterminée par une méthode appropriée, telle que l'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) ou la chromatographie liquide. La méthode SDS-PAGE ou l'analyse par immunotransfert au moyen d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques peuvent également être utilisées pour une caractérisation des sous-unités. Des limites sont établies pour chaque produit individuel.

Seuls peuvent être utilisés pour la préparation du vrac final des composants purifiés qui satisfont aux spécifications ci-après.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant pour chaque milieu une quantité du composant équivalant à 100 doses de vaccin.

**Absence de toxine coquelucheuse résiduelle**. *Cet essai n'est pas nécessaire pour le produit obtenu par modification génétique.* A un groupe de 5 souris au moins, pesant chacune 18-26 g et sensibles à l'histamine, injectez soit l'équivalent de 1 dose humaine unitaire par voie intraveineuse soit l'équivalent de 2 fois la dose humaine unitaire par voie intrapéritonéale, les doses étant diluées à un volume maximal de 0,5 mL avec de la solution saline tamponnée phosphate contenant 2 g/L de gélatine. Injectez le diluant par voie intrapéritonéale à un second groupe de souris (témoins). 5 jours plus tard, injectez aux animaux, par voie intrapéritonéale, 2 mg d'histamine base sous un volume maximal de 0,5 mL et placez les animaux en observation pendant 24 h. Si aucun animal ne meurt, la préparation satisfait à l'essai.

La sensibilité à l'histamine de la lignée de souris utilisée est vérifiée à intervalles appropriés par la méthode suivante : injectez des dilutions au 1/3 d'une préparation de référence de la toxine coquelucheuse dans de la solution saline tamponnée phosphate contenant 2 g/L de gélatine, et effectuez une épreuve à l'histamine comme indiqué ci-dessus. La lignée est acceptable si plus de 50 pour cent des animaux sont sensibilisés par 50 ng de toxine coquelucheuse et si aucun des animaux témoins traités avec le diluant seul puis soumis à l'épreuve à l'histamine ne présente de signes de sensibilisation.

La *toxine coquelucheuse PBR* convient comme toxine coquelucheuse de référence.

Un essai validé basé sur l'effet d'aggrégation des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) peut être utilisé au lieu de l'essai chez la souris.

**Teneur résiduelle en agents de détoxification et autres réactifs**. La teneur résiduelle de chaque réactif est déterminée et démontrée conforme à la limite approuvée sauf si la validation du procédé a démontré une réduction appropriée.

**Teneur en antigène**. Déterminez la teneur en antigène par une méthode immunochimique (*2.7.1*) appropriée et la teneur en azote protéique par minéralisation par l'acide sulfurique (*2.5.9*) ou par une autre méthode appropriée. Le rapport entre la teneur en antigène et la teneur en azote protéique se situe dans les limites établies pour le produit spécifique.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé par adsorption de quantités appropriées des composants purifiés, séparément ou ensemble, sur de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté. Un conservateur antimicrobien approprié peut être ajouté.

Seul peut être utilisé pour la préparation du lot final un vrac final qui satisfait aux spécifications ci-après.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la valeur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Seul un lot final qui satisfait aux essais décrits ci-après sous Identification, Essai et Activité peut être libéré. Si les essais Absence de toxine coquelucheuse résiduelle et irréversibilité de l'anatoxine coquelucheuse, Conservateur antimicrobien et Formaldéhyde libre, et la détermination de l'activité ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

IDENTIFICATION

Traitez le vaccin par un procédé de désorption approprié. Le procédé suivant peut être utilisé : dissolvez dans le vaccin à examiner la quantité de *citrate de sodium R* nécessaire

Vaccins

pour obtenir une solution à 10 g/L ; placez en incubation à 37 °C pendant 16 h environ puis centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Examiné par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), le surnageant réagit avec des immunosérums spécifiques des différents composants indiqués sur l'étiquette.

ESSAI

**Absence de toxine coquelucheuse résiduelle et irréversibilité de l'anatoxine coquelucheuse**. *Cet essai n'est pas nécessaire pour les produits obtenus par modification génétique.* Utilisez 3 groupes ne comptant pas moins de 5 souris sensibles à l'histamine. Injectez au premier groupe, par voie intrapéritonéale, l'équivalent de 2 fois la dose humaine unitaire du vaccin conservé à une température de 2-8 °C. Injectez au deuxième groupe, par voie intrapéritonéale, l'équivalent de 2 fois la dose humaine unitaire du vaccin incubé à une température de 37 °C pendant 4 semaines. Injectez le diluant par voie intrapéritonéale au troisième groupe de souris. Après 5 jours, injectez à chaque souris, par voie intrapéritonéale, 2 mg d'histamine base dans un volume maximal de 0,5 mL et placez les animaux en observation pendant 24 h. L'essai n'est pas valable si 1 ou plusieurs souris témoins meurent suite à l'épreuve à l'histamine. Si 1 souris meurt dans le premier et/ou le deuxième groupe, l'essai peut être répété avec le même nombre ou avec un plus grand nombre de souris, en combinant les résultats des essais valables ; le vaccin satisfait à l'essai si, dans les 2 groupes recevant le vaccin, pas plus de 5 pour cent du nombre total de souris ne meurent suite à l'épreuve à l'histamine.

La sensibilité à l'histamine de la lignée de souris utilisée est vérifiée à intervalles appropriés par la méthode suivante : injectez, par voie intraveineuse, des dilutions au tiers d'une préparation de référence de la toxine coquelucheuse dans de la solution saline tamponnée phosphate contenant 2 g/L de gélatine, et effectuez une épreuve à l'histamine comme indiqué ci-dessus. La lignée est acceptable si plus de 50 pour cent des animaux sont sensibilisés par 50 ng de toxine coquelucheuse et si aucun des animaux témoins traités avec le diluant seul, puis soumis à l'épreuve à l'histamine ne présente de signes de sensibilisation.

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à la valeur minimale efficace préalablement établie, ni supérieure à 115 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin à examiner satisfait à l'essai de stérilité.

ACTIVITÉ

La capacité du vaccin à induire la formation d'anticorps spécifiques est comparée à celle d'une préparation de référence examinée en parallèle. Le titre en anticorps est déterminé par une méthode immunochimique (*2.7.1*) du type ELISA par exemple. L'essai chez la souris décrit ci-après emploie un modèle à 3 points mais après validation pour les essais de routine, un modèle comportant une seule dilution peut être utilisé.

*Spécification d'activité.* La capacité du vaccin à examiner à induire la formation d'anticorps n'est pas inférieure de façon significative ($P$ = 0,95) à celle du vaccin de référence.

*La méthode décrite ci-après est donnée à titre d'exemple d'un essai qui s'est avéré satisfaisant pour un vaccin donné.*

*Choix des animaux et répartition en groupes.* Utilisez des souris saines (par exemple, de la souche CD1) provenant du même élevage et âgées de 4 à 8 semaines. Répartissez les animaux en 6 groupes d'effectif approprié aux exigences de l'essai. Utilisez 3 dilutions du vaccin à examiner et 3 dilutions du vaccin de référence, en affectant une dilution différente à chaque groupe d'animaux. Injectez à chaque souris, par voie intrapéritonéale ou sous-cutanée, 0,5 mL de la dilution affectée à son groupe.

*Collecte des échantillons de sérum.* 4 à 5 semaines après la vaccination, anesthésiez les souris et saignez-les individuellement. Conservez le sérum à – 20 °C jusqu'au moment de la détermination du titre en anticorps.

*Détermination du titre en anticorps.* Déterminez séparément le titre en anticorps spécifiques de chaque sérum par une méthode validée telle que l'essai ELISA décrit ci-après.

*Titrage ELISA.* Recouvrez des plaques de microtitrage appropriées à l'antigène considéré, en poly(chlorure de vinyle) ou polystyrène, avec l'antigène purifié à une concentration de 100 ng par puits. Lavez, puis bloquez les sites libres par mise en incubation avec une solution de sérum-albumine bovine et lavez à nouveau. Préparez directement sur les plaques des dilutions au demi du sérum des souris vaccinées avec le vaccin à examiner ou avec le vaccin de référence. Placez en incubation à 22-25 °C pendant 1 h, puis lavez les plaques. Ajoutez dans chaque puits une solution appropriée d'IgG anti-souris conjuguée à une enzyme et placez en incubation à 22-25 °C pendant 1 h. Lavez à nouveau puis faites réagir avec un substrat chromogène à partir duquel l'enzyme conjuguée libère un chromophore qui peut être quantifié par mesure de l'absorbance (*2.2.25*). Les conditions de l'essai sont choisies afin d'obtenir une réponse linéaire pour l'absorbance en fonction de la teneur en anticorps sur la gamme d'absorbance utilisée et des valeurs d'absorbance situées entre 0,1 et 2,0.

Un immunosérum de référence ayant une activité nominale connue est utilisé pour servir de base pour le calcul du titre en anticorps des sérums à examiner. Un sérum témoin standardisé est également utilisé.

L'essai n'est pas valable si :

– la valeur obtenue pour le sérum témoin diffère de la valeur nominale de plus de 2 fois l'écart type,
– les limites de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée sont inférieures à 50 pour cent ou supérieures à 200 pour cent.

*Calcul.* Calculez les titres d'anticorps dans le sérum des souris vaccinées avec le vaccin à examiner et avec le vaccin de référence. A partir des valeurs obtenues, calculez l'activité du vaccin à examiner par rapport au vaccin de référence, par les méthodes statistiques habituelles.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nom et la quantité des antigènes contenus dans le vaccin,
– dans les cas appropriés, que le vaccin contient une protéine apparentée à la toxine coquelucheuse, préparée par modification génétique,
– le nom et la quantité de l'adsorbant,
– que le vaccin doit être agité avant emploi,
– que le vaccin ne doit pas être congelé.

**01/2008:2188**

# VACCIN DE LA FIÈVRE CHARBONNEUSE POUR USAGE HUMAIN (ADSORBÉ, PRÉPARÉ À PARTIR DE FILTRATS DE CULTURE)

## Vaccinum anthracis adsorbatum ab colato culturarum ad usum humanum

DÉFINITION

Le vaccin de la fièvre charbonneuse pour usage humain (adsorbé, préparé à partir de filtrats de culture) est une préparation d'antigènes de *Bacillus anthracis* précipités par



Vaccins

le sulfate d'aluminium et de potassium. Les antigènes sont préparés à partir d'un filtrat de culture stérile produite par une souche avirulente ou atténuée, non encapsulée, de *B. anthracis*.

Les principales composantes de la virulence de *B. anthracis* sont la capsule d'acide polyglutamique et 2 toxines binaires de la fièvre charbonneuse, la toxine létale et la toxine oedématogène, issues des combinaisons respectives de l'antigène protecteur avec le facteur létal (LF) et avec le facteur oedématogène (EF). LF est une endopeptidase zinc-dépendante et EF est une adénylate-cyclase calcium-dépendante et calmoduline active. Des cultures de *B. anthracis* dépourvues de cellules contiennent l'antigène protecteur et, du fait de la régulation coordonnée de l'expression des gènes des 3 composants de la toxine, LF et EF sont également présents. De plus, il est probable que le vaccin contienne de nombreux autres antigènes de *B. anthracis*, parmi lesquels des protéines membranaires, des protéines sécrétées, des protéines cytoplasmiques, des peptidoglycanes, des acides nucléiques et des hydrates de carbone.

## PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Les cultures sont organisées dans un système de lot de semence. La souche vaccinale est toxigène, mais dépourvue du plasmide comprenant des gènes permettant la synthèse de la capsule, facteur de virulence important.

Il doit être établi que le procédé de production utilisé donne de façon reproductible un produit actif dont les profils d'efficacité et d'innocuité sont appropriés ou équivalents à ceux de lots précédents. Le vaccin doit présenter des niveaux de protection contre une souche virulente de *B. anthracis*, dans un modèle approprié d'infection animale, égaux ou supérieurs à ceux d'un vaccin de référence. Le vaccin ne doit pas présenter des niveaux de toxicité supérieurs à ceux d'un vaccin de référence.

La méthode de production et la stabilité du lot final et des substances intermédiaires appropriées sont évaluées au moyen d'un ou de plusieurs essais indicatifs. Ces essais indicatifs comprennent des essais d'activité, de toxicité spécifique et peuvent être confirmés par des essais montrant la présence des antigènes appropriés et des protéines associées. Les spécifications relatives à la libération et à la date de péremption sont établies sur la base des résultats des essais de stabilité, de manière à garantir une performance satisfaisante du produit jusqu'à la date de péremption approuvée.

*LOTS DE SEMENCE*

La souche atténuée non encapsulée de *B. anthracis* utilisée est identifiée par des données historiques comprenant des informations sur son origine, sur les manipulations ultérieures et sur les essais utilisés pour la caractérisation de la souche. Ces informations comprennent les propriétés morphologiques, biochimiques et génétiques de la souche ainsi que les propriétés de sa culture. Seul un lot de semence primaire ou, dans les cas appropriés, des lots de semence de travail qui satisfont aux essais ci-après peuvent être utilisés.

**Identification**. Chaque lot de semence est identifié comme contenant *B. anthracis*.

**Paramètres phénotypiques**. Chaque lot de semence doit avoir un profil biochimique et enzymatique connu, et ne doit présenter aucun antécédent connu de résistance aux antibiotiques.

**Pureté microbienne**. Chaque lot de semence satisfait aux exigences d'absence d'organismes contaminants. La pureté des cultures bactériennes est vérifiée par des méthodes de sensibilité appropriée.

**Essai de virulence**. L'absence de capsule bactérienne est démontrée pour chaque lot de semence par coloration de McFadyean et par l'essai de toxicité spécifique (essai de l'oedème).

*PRÉPARATION DE RÉFÉRENCE*

L'activité et la toxicité du vaccin en vrac sont vérifiées en utilisant des préparations de référence issues de lots de vaccins représentatifs. Ces lots sont caractérisés de manière approfondie pour l'usage auquel ils sont destinés, et conservés en aliquots de taille appropriée dans des conditions garantissant leur stabilité.

*CULTURE ET RÉCOLTE*

La souche atténuée est cultivée en milieu liquide approprié. En fin de culture, des essais de pureté sont effectués sur la culture. Le milieu de culture est séparé de la masse bactérienne par filtration. Le pH du filtrat est déterminé après dilution dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L ; il est démontré que ce pH se situe dans des limites convenables pour la stabilité. Une recherche de l'absence de *B. anthracis* vivant, incluant les spores, est effectuée à l'aide d'une méthode appropriée. A ce stade, du sulfate d'aluminium et de potassium ou un adjuvant équivalent peut être ajouté. Un conservateur antimicrobien peut être ajouté à la suspension pour former la récolte purifiée.

Seule une récolte purifiée qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée pour la préparation du lot final.

**Identité immunologique**. Confirmez la présence de l'antigène protecteur de *B. anthracis* par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

**Conservateur antimicrobien**. Déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

*VRAC FINAL*

La récolte purifiée est diluée aseptiquement avec une solution saline stérile pour former le vrac final.
Seul un vrac final qui satisfait à l'essai ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des ampoules de verre stériles à fermeture inviolable et scellées à chaud pour prévenir toute contamination.

Un lot final ne peut être libéré pour emploi que s'il satisfait à chacune des exigences spécifiées ci-après sous Identification, Essai et Activité. Si le titrage de l'activité, l'essai de toxicité spécifique (essai de l'oedème) et l'essai de conservateur antimicrobien ont été réalisés avec des résultats satisfaisants sur la récolte purifiée, ils peuvent être omis sur le lot final.

## IDENTIFICATION

La présence de l'antigène protecteur de *B. anthracis* est confirmée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

## ESSAI

**Toxicité anormale**. Utilisez au moins 10 souris en bonne santé, pesant chacune 17-22 g. Injectez à chacune d'elles par voie intrapéritonéale jusqu'à 4 doses humaines de vaccin. Observez les souris quotidiennement pendant 7 jours. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun animal ne présente de signes de maladie.

**Toxicité spécifique (essai de l'oedème)**. Utilisez au moins 2 lapins par essai. Préparez des séries de dilutions de raison 2 du vaccin avec une solution saline normale, correspondant respectivement à 4, 2, 1, 0,5 et 0,25 doses humaines. Injectez par voie intradermique 0,1 mL de chaque dilution du vaccin à examiner et du vaccin de référence dans les flancs rasés de 2 lapins. Administrez les 10 injections préparées au préalable (5 dilutions du vaccin à examiner et 5 dilutions du vaccin de référence) à chacun des lapins. Sur l'un des lapins, injectez les concentrations les plus basses au niveau antérieur et les concentrations les plus hautes au niveau postérieur. Utilisez l'ordre inverse pour le 2$^{e}$ lapin. Maintenez les lapins en observation pendant 24 h et recherchez des signes d'oedème

Vaccins

aux sites d'injection. Le vaccin satisfait à l'essai si les réactions oedémateuses ne sont pas plus importantes que celles observées avec le vaccin de référence.

Des titrages *in vitro* de l'activité du facteur létal et de l'adénylate cyclase peuvent également être utilisés, sous réserve de validation.

**Conservateur antimicrobien**. Déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à la valeur minimale efficace préalablement établie ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin de la fièvre charbonneuse pour usage humain satisfait à l'essai de stérilité.

ACTIVITÉ

L'activité du vaccin de la fièvre charbonneuse est évaluée par détermination de la dose nécessaire pour protéger des cobayes contre une épreuve intradermique par une souche virulente de *B. anthracis*. Cette dose est comparée à celle d'une préparation de référence appropriée nécessaire pour assurer la même protection. Utilisez 9 groupes d'au moins 16 cobayes femelles, pesant chacun 250-350 g. Préparez 4 dilutions du vaccin et de la préparation de référence contenant 1,5, 0,5, 0,17 et 0,05 doses humaines dans 0,5 mL. Attribuez chaque dilution à un groupe différent. Le groupe restant reçoit 0,5 mL de solution saline et sert à vérifier la dose d'épreuve. Administrez par voie sous-cutanée à chaque cobaye 0,5 mL de la dilution attribuée à son groupe, en 2 injections à 1 semaine d'intervalle. 7 jours après la 2$^{e}$ injection, injectez à chaque cobaye par voie intradermique 2000 spores d'une souche virulente de *B. anthracis* (Vollum) dans 0,1 mL. Maintenez les animaux en observation pendant 10 jours et enregistrez le nombre de cobayes morts par groupe. L'essai n'est valable que si tous les animaux témoins meurent dans les 5 jours suivant l'épreuve. Calculez l'activité du vaccin à examiner par rapport à celle de la préparation de référence sur la base de la proportion d'animaux survivants dans chaque groupe de cobayes vaccinés, en utilisant les méthodes statistiques habituelles (*5.3*). Le vaccin satisfait à l'essai si :

- l'activité relative estimée est supérieure à 1,0,
- ou l'intervalle de confiance à 95 pour cent de l'activité relative inclut 1,0, et la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 pour cent n'est pas inférieure à 50 pour cent de l'activité relative estimée.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique que le vaccin ne doit pas être congelé.

**01/2008:1526**

# VACCIN DE L'HÉPATITE A (INACTIVÉ) ET DE L'HÉPATITE B (ADNr), ADSORBÉ

## Vaccinum hepatitidis A inactivatum et hepatitidis B (ADNr) adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin de l'hépatite A (inactivé) et de l'hépatite B (ADNr), adsorbé est une suspension d'une souche appropriée du virus de l'hépatite A, cultivé en cultures cellulaires et inactivé par une méthode validée, et de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg), une protéine constitutive du virus de l'hépatite B obtenue par la méthode dite de l'ADN recombinant ; les antigènes sont adsorbés sur un support minéral, tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate hydraté d'aluminium.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Les deux composantes du vaccin sont respectivement préparées comme décrit dans les monographies *Vaccin inactivé de l'hépatite A adsorbé (1107)* et *Vaccin de l'hépatite B (ADNr) (1056)*, et satisfont aux exigences de ces monographies.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

*Préparation de référence* : est utilisée comme préparation de référence une partie d'un lot représentatif dont on a démontré que le pouvoir immunogène chez l'animal est au moins égal à celui d'un lot qui, lors d'études cliniques conduites chez de jeunes adultes sains, a produit 95 pour cent au moins de séroconversion après immunisation primaire complète. Le critère de séroconversion correspond au taux d'anticorps neutralisants reconnu comme protecteur ; pour le virus de l'hépatite A, un taux égal ou supérieur à 20 mUI/mL déterminé par un dosage par immunoadsorption à enzyme conjuguée est reconnu comme étant protecteur ; pour le virus de l'hépatite B, un taux égal ou supérieur à 10 mUI/mL d'anticorps contre l'HBsAg est reconnu comme étant protecteur.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé à partir d'une ou plusieurs récoltes inactivées du virus de l'hépatite A et d'un ou plusieurs lots de l'antigène purifié.

Seuls des vracs finals qui satisfont aux exigences suivantes peuvent être utilisés pour la préparation du lot final.

**Conservateur antimicrobien**. Déterminez, s'il y a lieu, la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Seuls des lots finals qui satisfont aux essais décrits ci-après sous Identification, Essai et Activité peuvent être libérés. Si l'essai du formaldéhyde libre (le cas échéant) et l'essai de teneur en conservateur antimicrobien (le cas échéant) ont été réalisés avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent être omis sur le lot final. Si le titrage d'activité de la composante hépatite A ou hépatite B est effectué *in vivo* et que des résultats satisfaisants ont été obtenus sur le vrac final, il peut ne pas être répété sur le lot final.

IDENTIFICATION

Le vaccin est identifié comme mélange de l'antigène du virus de l'hépatite A et de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B, par des méthodes immunochimiques appropriées (*2.7.1*) utilisant des anticorps spécifiques ou par les essais du pouvoir immunogène sur souris décrits sous Activité.

ESSAI

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Déterminez, s'il y a lieu, la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à la valeur établie comme seuil d'efficacité ni supérieure à 115 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 2 UI par dose humaine.

ACTIVITÉ

**Composante hépatite A**. Le vaccin satisfait au titrage d'activité du vaccin de l'hépatite A (*2.7.14*).

**Composante hépatite B**. Le vaccin satisfait au titrage d'activité du vaccin de l'hépatite B (ADNr) (*2.7.15*).

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– la quantité d'antigène du virus de l'hépatite A et la quantité d'antigène de surface du virus de l'hépatite B par récipient,
– le type de cellules utilisé pour la production du vaccin,
– le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
– que le vaccin doit être agité avant emploi,
– que le vaccin ne doit pas être congelé.

**01/2010:1935**

# VACCIN DE L'HÉPATITE A (INACTIVÉ, VIROSOMAL)

## Vaccinum hepatitidis A inactivatum virosomale

DÉFINITION

Le vaccin de l'hépatite A (inactivé, virosomal) est une suspension d'une souche appropriée du virus de l'hépatite A cultivé en cultures cellulaires et inactivé par une méthode validée. Des virosomes composés de protéines d'un virus grippal appartenant à une souche approuvée pour ce produit et de phospholipides sont utilisés comme adjuvants.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit avoir été établi que le procédé de production utilisé donne, de façon reproductible, des vaccins comparables à celui dont l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrés.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

*Préparation de référence*. Une préparation de référence d'antigène de l'hépatite A inactivé est étalonnée par rapport à un lot de vaccin de l'hépatite A (inactivé, virosomal) qui, lors d'études cliniques conduites chez de jeunes adultes sains, a produit au moins 95 pour cent de séroconversion après immunisation primaire complète. Le critère de séroconversion correspond au taux d'anticorps neutralisants reconnu comme protecteur. Un taux égal ou supérieur à 20 mUI/mL déterminé par un dosage immunologique à enzyme conjuguée est reconnu comme étant protecteur.

*PRÉPARATION DE L'ANTIGÈNE DE L'HÉPATITE A*

La production de l'antigène de l'hépatite A est basée sur un système de lot de semence virale et un système de banque de cellules. Il doit être démontré que la méthode de production donne de façon reproductible des vaccins conformes aux exigences de pouvoir immunogène, d'innocuité et de stabilité.

Sauf exception justifiée et autorisée, le virus contenu dans le vaccin final ne doit pas avoir subi, depuis le lot de semence primaire, un nombre de passages supérieur à celui utilisé pour préparer le vaccin dont les études cliniques ont démontré l'innocuité et l'efficacité.

*SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS DE L'HÉPATITE A*

Le virus est multiplié dans une lignée de cellules diploïdes humaines (*5.2.3*).

*LOTS DE SEMENCE DU VIRUS DE L'HÉPATITE A*

La souche de virus de l'hépatite A utilisée pour préparer le lot de semence primaire doit être identifiée par des données historiques indiquant notamment son origine et les manipulations qu'elle a subies par la suite.

Un lot de semence ne peut être utilisé pour la multiplication du virus que s'il satisfait aux essais ci-après.

**Identification**. Chaque lot de semence primaire et de travail est identifié comme virus de l'hépatite A à l'aide d'anticorps spécifiques.

**Concentration en virus**. La concentration en virus de chaque lot de semence primaire et de travail est déterminée, afin de contrôler la reproductibilité de la production.

**Agents étrangers**. Le lot de semence de travail satisfait aux exigences définies pour les lots de semence pour vaccins viraux (*2.6.16*).

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE DU VIRUS DE L'HÉPATITE A*

Toutes les manipulations effectuées sur la banque de cellules et les cultures cellulaires dérivées sont conduites dans des conditions d'asepsie dans un local où ne sont pas manipulées d'autres cellules. Un sérum animal (à l'exclusion de sérum humain) peut être utilisé dans les milieux pour cultures cellulaires. Il est vérifié que le sérum et la trypsine employés pour la préparation des suspensions cellulaires et des milieux ne comportent pas d'agents étrangers. Les milieux de culture cellulaire peuvent contenir un indicateur de pH, tel que le rouge de phénol, et des antibiotiques à la concentration correspondant au seuil minimal d'efficacité. Un volume d'au moins 500 mL des cultures cellulaires utilisées pour la production du vaccin est destiné à la culture de cellules non infectées (cellules témoins). Les différentes récoltes obtenues à partir d'une même culture cellulaire de production peuvent être mélangées et considérées comme une récolte unique.

Une récolte unique ne peut être utilisée pour la préparation du vaccin que si elle satisfait aux essais ci-après. Lorsque la détermination du rapport entre la concentration en virus et la teneur en antigène a été effectuée sur un nombre approprié de récoltes uniques afin de démontrer la reproductibilité du procédé de production, il est admis de ne plus l'effectuer en tant que contrôle de routine.

**Identification**. La détermination de la teneur en antigène sert également à identifier la récolte unique.

**Contamination bactérienne et fongique**. La récolte unique satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

**Mycoplasmes** (*2.6.7*). La récolte virale unique satisfait à l'essai des mycoplasmes.

**Cellules témoins**. Les cellules témoins de la culture cellulaire de production satisfont à un essai d'identification et aux exigences concernant les agents étrangers (*2.6.16*).

**Teneur en antigène**. La teneur en antigène du virus de l'hépatite A est déterminée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), afin de surveiller la reproductibilité de la production ; la teneur se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Rapport entre la concentration en virus et la teneur en antigène**. Le rapport entre la concentration en virus infectieux, déterminée par une méthode appropriée en culture cellulaire, et la teneur en antigène est établi pour un nombre approprié de récoltes uniques afin de valider la reproductibilité de cette valeur.

*PURIFICATION ET RÉCOLTE PURIFIÉE DU VIRUS DE L'HÉPATITE A*

La récolte, qui peut être un mélange de plusieurs récoltes uniques, est purifiée par des méthodes validées. Si la production est effectuée au moyen de lignées cellulaires continues, il doit être démontré que le procédé de purification employé réduit régulièrement la teneur en ADN issu de la cellule hôte.

Une récolte purifiée ne peut être utilisée pour la préparation de la récolte inactivée que si elle satisfait aux essais ci-après.

**Concentration en virus**. Le titre en virus infectieux de la récolte purifiée est déterminé par une méthode de culture cellulaire appropriée, comme paramètre de surveillance de la régularité de la production et comme point d'origine dans le contrôle de la courbe d'inactivation.

**Rapport entre la teneur en antigène et la teneur en protéines totales**. La teneur en antigène du virus de l'hépatite A est déterminée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), et la teneur en protéines totales par une méthode validée. Le rapport entre la teneur en antigène de l'hépatite A et la teneur en protéines totales doit se situer dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Sérum-albumine bovine** : au maximum 50 ng par dose humaine unitaire, en cas d'utilisation de sérum foetal bovin, déterminé par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). Le cas échéant, selon le procédé de fabrication, d'autres marqueurs protéiques appropriés peuvent être utilisés pour démontrer l'efficacité du procédé de purification.

**Résidus chimiques**. Si des substances chimiques sont utilisées au cours du procédé de purification, elles sont recherchées dans la récolte purifiée (ou dans la récolte inactivée), sauf si la validation du procédé a démontré leur élimination totale. La teneur ne doit pas dépasser celle approuvée pour le produit considéré.

*INACTIVATION ET RÉCOLTE INACTIVÉE DU VIRUS DE L'HÉPATITE A*

Avant de procéder à l'inactivation, il est possible de mélanger plusieurs récoltes purifiées. La formation d'agrégats viraux entraîne une inactivation incomplète : afin d'éviter un défaut d'inactivation des virus présents sous forme d'agrégats, il est nécessaire d'empêcher la formation de ces derniers ou de les éliminer immédiatement avant le procédé d'inactivation et/ou au cours de celui-ci. La suspension virale est inactivée par une méthode validée, dont il a été démontré qu'elle permet d'inactiver de façon reproductible le virus de l'hépatite A sans compromettre l'activité antigénique et le pouvoir immunogène ; pour chaque opération d'inactivation, une courbe d'inactivation représentant l'évolution dans le temps de la concentration en virus infectieux résiduel, avec au moins 3 mesures (par exemple, aux jours 0, 1 et 2 du procédé d'inactivation), est établie. Si le formaldéhyde est employé pour l'inactivation, la présence d'un excès de formaldéhyde libre à la fin de l'inactivation est vérifiée.

Une récolte inactivée ne peut être utilisée pour préparer le vrac final que si elle satisfait aux essais ci-après.

**Inactivation**. Procédez à un essai d'enrichissement en virus infectieux résiduel de l'hépatite A. Inoculez à des cultures cellulaires du même type que celles utilisées pour la production du vaccin une quantité équivalant à 5 pour cent du lot ou, si la récolte contient l'équivalent de 30 000 doses ou plus, 1500 doses au moins de vaccin ; faites incuber pendant un total d'au moins 70 jours en procédant à au moins 1 passage de cellules pendant cette période. A la fin de la période d'incubation, utilisez une méthode de sensibilité appropriée pour détecter le virus infectieux résiduel. Aucun signe de multiplication du virus de l'hépatite A n'est observé dans les échantillons prélevés à la fin de l'étape d'inactivation. Effectuez en parallèle des inoculums de virus infectieux comme témoins positifs pour vérifier la sensibilité des cellules et l'absence d'interférence.

**Stérilité** (*2.6.1*). La récolte virale inactivée satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 2 UI dans l'équivalent d'une dose humaine unitaire.

**Teneur en antigène**. Déterminez la teneur en antigène du virus de l'hépatite A par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

**Résidus chimiques**. Procédez selon les indications données sous Purification et récolte purifiée.

*PRÉPARATION DU VIRUS GRIPPAL INACTIVÉ*

La production du virus grippal est basée sur un système de lot de semence. Les lots de semence de travail ne doivent pas avoir subi plus de 15 passages à partir du virus réassorti approuvé ou de l'isolat de virus approuvé. La production finale représente 1 passage à partir du lot de semence de travail. La souche de virus grippal à utiliser est approuvée par l'Autorité compétente.

*SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS GRIPPAL*

La semence de virus grippal destinée à être utilisée dans la production du vaccin est cultivée dans des oeufs embryonnés provenant d'élevages de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (*5.2.2*) ou dans des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*), par exemple des fibroblastes d'embryons de poulet ou des cellules rénales de poussin provenant d'élevages de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (*5.2.2*). Pour la production, le virus est cultivé dans la cavité allantoïdienne d'oeufs embryonnés de poules provenant d'élevages reconnus sains.

*LOTS DE SEMENCE DU VIRUS GRIPPAL*

Les antigènes hémagglutinine et neuraminidase de chaque lot de semence sont identifiés comme étant ceux du virus grippal de la souche appropriée par des méthodes convenables.

Un lot de semence de travail ne peut être utilisé dans la préparation du mélange de récoltes monovalent que s'il satisfait aux essais ci-après.

**Contamination bactérienne et fongique**. Effectuez l'essai de stérilité (*2.6.1*) en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Mycoplasmes** (*2.6.7*). Effectuez l'essai des mycoplasmes en utilisant 10 mL.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE DU VIRUS GRIPPAL*

Un agent antimicrobien peut être ajouté à l'inoculum. Après incubation à température contrôlée, les liquides allantoïdiens sont recueillis et réunis pour former le mélange de récoltes monovalent. Un agent antimicrobien peut être ajouté au moment de la récolte. A aucun stade de la production, la pénicilline ou la streptomycine ne sont utilisées.

*MÉLANGE DE RÉCOLTES DU VIRUS GRIPPAL*

Afin de limiter la possibilité de contamination, l'inactivation commence dès que possible après la préparation. Le virus est inactivé par une méthode dont l'efficacité s'est avérée constante sur 3 lots consécutifs entre les mains du fabricant. Il devra également être démontré que le procédé d'inactivation est capable d'inactiver le virus grippal sans détruire l'antigénicité de l'hémagglutinine. Le procédé d'inactivation devra aussi être capable d'inactiver les virus de la leucose aviaire et les mycoplasmes. Si le mélange de récoltes monovalent est conservé après inactivation, il sera maintenu à une température de 5 ± 3 °C. Si une solution de formaldéhyde est utilisée, la concentration ne doit dépasser 0,2 g/L de $CH_2O$ à aucun moment de l'inactivation ; si la bêtapropiolactone est utilisée, la concentration ne doit dépasser 0,1 pour cent *V/V* à aucun moment de l'inactivation.

Un mélange de récoltes ne peut être utilisé dans la préparation des virosomes que s'il satisfait aux essais ci-après.

**Antigène hémagglutinine**. Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par un essai d'immunodiffusion (*2.7.1*). L'essai est effectué à 20-25 °C par comparaison avec une préparation de référence d'antigène d'hémagglutinine ou une préparation d'antigène étalonnée par rapport à elle.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Inactivation virale**. Inoculez 0,2 mL de récolte dans la cavité allantoïdienne de chacun de 10 oeufs embryonnés ; incubez à 33-37 °C pendant 3 jours. L'essai n'est valable que si les embryons d'au moins 8 oeufs sur 10 survivent. Recueillez dans chaque embryon survivant 0,5 mL de liquide allantoïdien et mélangez les liquides. Inoculez 0,2 mL de liquide mélangé dans un autre groupe de 10 oeufs embryonnés et incubez à 33-37 °C pendant 3 jours. L'essai n'est valable que si les embryons d'au moins 8 oeufs sur 10 survivent. Recueillez dans chaque embryon environ 0,1 mL de liquide allantoïdien et effectuez sur chaque liquide individuel un essai d'hémagglutination. S'il se produit une hémagglutination lors de l'essai, effectuez à partir du liquide concerné un passage sur oeufs supplémentaire et un essai d'hémagglutination ; aucune hémagglutination ne se produit.

**Ovalbumine** : au maximum 1 μg d'ovalbumine dans l'équivalent de 1 dose humaine, déterminé par une technique appropriée, en utilisant une préparation de référence d'ovalbumine appropriée.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Résidus chimiques**. Effectuez des essais sur le mélange de récoltes monovalent pour déceler les substances chimiques utilisées pour inactiver le virus, les limites étant approuvées par l'Autorité compétente.

*PRÉPARATION DES VIROSOMES*

En utilisant un détersif adapté, mettez les virions grippaux inactivés en solution et purifiez-les par centrifugation à grande vitesse afin d'obtenir des surnageants contenant principalement des antigènes grippaux. Après l'ajout de phospholipides appropriés, formez les virosomes en retirant le détersif par chromatographie d'adsorption ou par toute autre méthode appropriée.

Les virosomes ne peuvent être utilisés dans la préparation du vrac final que s'ils sont conformes aux exigences ci-après.

**Teneur en hémagglutinine**. Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par un essai d'immunodiffusion (*2.7.1*), par comparaison avec une préparation de référence d'antigène hémagglutinine ou une préparation d'antigène étalonnée par rapport à elle.

**Phospholipides**. La teneur et l'identité des phospholipides sont déterminées par des méthodes immunochimiques ou physicochimiques appropriées.

**Rapport entre la teneur en phospholipides et la teneur en hémagglutinine**. Le rapport entre la teneur en phospholipides et la teneur en hémagglutinine doit se situer dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Résidus chimiques**. Effectuez des essais pour détecter les substances chimiques utilisées pendant l'opération. La concentration, pour chaque résidu chimique, se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

*VRAC FINAL*

Le vaccin en vrac est préparé en ajoutant des virosomes au virus inactivé de l'hépatite A pour produire un rapport approuvé entre antigènes de l'hépatite A et hémagglutinine. Plusieurs vracs peuvent être mélangés. Des stabilisants et des conservateurs antimicrobiens approuvés peuvent être ajoutés.

Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Teneur en protéines**. La teneur en protéines est déterminée à l'aide d'une technique appropriée, les limites étant approuvées par l'Autorité compétente.

**Phospholipides**. La teneur et l'identité des phospholipides sont déterminées par des méthodes immunochimiques ou physicochimiques appropriées. La teneur en phospholipides est conforme aux limites approuvées pour le produit considéré.

**Teneur en hémagglutinine**. Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par un essai d'immunodiffusion (*2.7.1*). La teneur en hémagglutinine ne dépasse pas les limites approuvées pour le produit considéré.

**Teneur en antigène de l'hépatite A**. Déterminez la teneur en antigène de l'hépatite A par une méthode immunochimique appropriée. La teneur en antigène ne dépasse pas les limites approuvées pour le produit considéré.

**Rapport entre la teneur en antigène de l'hépatite A et la teneur en hémagglutinine**. Le rapport entre la teneur en antigène de l'hépatite A et la teneur en hémagglutinine se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Ovalbumine** : au maximum 1 μg par dose humaine, déterminé par une technique appropriée, en utilisant une préparation de référence d'ovalbumine appropriée.

**Taille du virosome**. La distribution de la taille du mélange de virosomes et de virus de l'hépatite A se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. La teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Résidus chimiques**. Si des substances chimiques sont utilisées au cours de la formulation, leurs teneurs sont déterminées, les limites étant approuvées par l'Autorité compétente.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti en récipients stériles dans des conditions aseptiques. Les récipients sont ensuite fermés de façon à empêcher toute contamination.

Seul un lot final qui satisfait à chacun des essais décrits ci-après sous Identification, Essai et Activité peut être libéré. Si l'essai de formaldéhyde libre (s'il y a lieu) et l'essai de teneur en conservateur antimicrobien (s'il y a lieu) ont été réalisés avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent être omis sur le lot final. Lorsque le titrage d'activité est effectué *in vivo*, s'il a été effectué avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, il peut être omis sur le lot final.

## IDENTIFICATION

Il est démontré que le vaccin contient l'antigène du virus de l'hépatite A, par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) utilisant des anticorps spécifiques.

## ESSAI

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. Elle n'est pas inférieure à la teneur minimale reconnue comme étant efficace ni supérieure à 115 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 2 UI par dose humaine.

## ACTIVITÉ

Déterminez la teneur en antigène du vaccin au moyen d'une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), par comparaison avec la préparation de référence. Les critères d'acceptabilité sont approuvés par l'Autorité compétente pour une préparation de référence donnée.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– l'origine biologique des cellules utilisées pour la préparation du vaccin,
– que le support contient des protéines de virus grippal préparé sur oeufs,
– que le vaccin ne doit pas être congelé,
– que le vaccin doit être agité avant l'emploi.

**01/2008:1056**

# VACCIN DE L'HÉPATITE B (ADNr)

## Vaccinum hepatitidis B (ADNr)

DÉFINITION

Le vaccin de l'hépatite B (ADNr) est une préparation de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg), une protéine constitutive du virus de l'hépatite B, qui peut être adsorbé sur un support minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate hydraté d'aluminium. L'antigène est obtenu par la méthode dite de l'ADN recombinant.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit être démontré que le vaccin suscite chez l'homme la formation d'anticorps spécifiques protecteurs et que le procédé de production donne de façon constante des vaccins qui satisfont aux exigences de pouvoir immunogène et d'innocuité.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

Le vaccin de l'hépatite B (ADNr) est obtenu par l'expression du gène codant pour l'HBsAg dans des cellules de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) ou de mammifères (cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO) ou d'autres lignées cellulaires appropriées), de la purification de l'HBsAg qui en résulte et de la transformation de cet antigène en une préparation immunogène. Le choix et l'innocuité des cellules utilisées sont approuvés par l'Autorité compétente.

Le vaccin peut contenir soit le produit du gène S (protéine majeure), soit une combinaison des produits des gènes S et pré-S2 (protéine moyenne), soit une combinaison des gènes S, pré-S2 et pré-S1 (grande protéine).

*Préparation de référence* : est utilisée comme préparation de référence une partie d'un lot représentatif dont on a démontré que le pouvoir immunogène chez l'animal est au moins égal à celui d'un lot qui, lors d'études cliniques conduites chez de jeunes adultes sains, a produit 95 pour cent au moins de séroconversion après immunisation primaire complète. Le critère de séroconversion correspond au taux d'anticorps neutralisants reconnu comme protecteur ; un taux égal ou supérieur à 10 mUI/mL d'anticorps contre L'HBsAg est reconnu comme étant protecteur.

*CARACTÉRISATION DE LA SUBSTANCE*

Des études de développement sont effectuées pour caractériser l'antigène. La structure complète protéinique, lipidique et en hydrates de carbone est déterminée. Les caractéristiques morphologiques des particules d'antigène sont déterminées par microscopie électronique. La densité moyenne des particules d'antigène est déterminée par une méthode physicochimique, telle que la centrifugation en gradient de densité. Les épitopes antigéniques sont caractérisés. La structure primaire de la partie protéinique est caractérisée, par exemple par détermination de la composition en acides aminés, par une analyse séquentielle partielle d'acides aminés et par la cartographie peptidique.

*CULTURE ET RÉCOLTE*

L'identité, la pureté microbienne, la rétention du plasmide et la régularité du rendement sont déterminées à des stades appropriés de la production. Si des cellules de mammifères sont employées, des essais d'agents étrangers et de mycoplasmes sont effectués selon les prescriptions de *Essais des agents étrangers dans les vaccins viraux pour usage humain* (*2.6.16*) en utilisant 200 mL de récolte dans l'essai de recherche d'autres agents étrangers sur cultures cellulaires.

*ANTIGÈNE PURIFIÉ*

Seul un antigène purifié satisfaisant aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du vrac final.

**Protéines totales**. La teneur en protéines totales est déterminée par une méthode validée. La teneur se situe dans les limites approuvées pour le produit spécifique.

**Teneur en antigène et identification**. La quantité et la spécificité de l'HBsAg sont déterminées par comparaison soit avec l'étalon international de HBsAg sous-type *ad* soit avec une référence interne, par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), par exemple un dosage radioimmunologique (RIA), un dosage par immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA), par immunoempreinte (de préférence avec un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope protecteur) ou par un essai de diffusion radiale simple. Le rapport antigène/protéines se situe dans les limites approuvées pour le produit spécifique.

La masse moléculaire de la bande principale trouvée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) effectuée dans des conditions réductrices correspond à la valeur attendue en fonction des séquences connues des acides nucléiques et du polypeptide, ainsi que de la glycosylation éventuelle.

**Pureté antigénique**. La pureté de l'antigène est contrôlée par comparaison avec la préparation de référence par chromatographie liquide ou par toute autre méthode appropriée telle que l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS-PAGE avec coloration par le bleu acide 92 et l'argent. Une méthode est appropriée notamment si elle présente une sensibilité suffisante pour détecter un contaminant potentiel à une concentration de 1 pour cent de protéine totale. Au minimum 95 pour cent des protéines totales sont constituées de l'antigène de surface de l'hépatite B.

**Composition**. La teneur en protéines, lipides, acides nucléiques et hydrates de carbone est déterminée.

**ADN résiduel de la cellule hôte et du vecteur**. Si le vaccin est produit sur des cellules de mammifères, la teneur en ADN n'est pas supérieure à 10 pg dans la quantité d'antigène purifié équivalant à une dose humaine unitaire de vaccin.

**Césium**. Si un sel de césium est utilisé pendant la production, un essai de césium résiduel est effectué sur l'antigène purifié. La teneur se situe dans les limites approuvées pour le produit spécifique.

**Stérilité** (*2.6.1*). L'antigène purifié satisfait à l'essai de stérilité. Effectuez l'essai en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

En fonction de la méthode de production, d'autres essais sur l'antigène purifié peuvent être nécessaires, par exemple un essai de sérum animal résiduel si des cellules de mammifères ont été utilisées pour la production ou des essais de résidus des substances chimiques utilisées dans l'extraction et la purification de l'antigène.

*VRAC FINAL*

Un conservateur antimicrobien et un adjuvant peuvent être incorporés au vaccin.

Seul un vrac final satisfaisant aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Conservateur antimicrobien**. Déterminez, s'il y a lieu, la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité. Effectuez l'essai en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Seul un lot final qui satisfait à chacun des essais décrits sous Identification, Essai et Activité peut être libéré. Si les essais de formaldéhyde libre (le cas échéant) et de teneur en conservateur antimicrobien (le cas échéant) ont été effectués avec de bons résultats sur le vrac final, ils peuvent ne pas être répétés sur le lot final. Si le titrage d'activité est effectué *in vivo* et que des résultats satisfaisants ont été obtenus sur le vrac final, il peut ne pas être répété sur le lot final.

IDENTIFICATION

La détermination de l'activité ou, dans les cas appropriés, le profil électrophorétique, servent également à identifier le vaccin.

ESSAI

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Déterminez, s'il y lieu, la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à la valeur établie comme seuil d'efficacité ni supérieure à 115 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

**Pyrogènes** (*2.6.8*). Le vaccin satisfait à l'essai des pyrogènes. Injectez à chaque lapin l'équivalent d'une dose humaine.

ACTIVITÉ

Le vaccin satisfait au titrage d'activité du vaccin de l'hépatite B (ADNr) (*2.7.15*).

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- la quantité d'HBsAg par récipient,
- le type de cellules utilisé pour la production du vaccin,
- le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
- que le vaccin doit être agité avant emploi,
- que le vaccin ne doit pas être congelé.

**01/2008:0443**
**corrigé 6.0**

# VACCIN DIPHTÉRIQUE ADSORBÉ

## Vaccinum diphtheriae adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin diphtérique adsorbé est une préparation d'anatoxine diphtérique avec un adsorbant minéral. L'anatoxine est obtenue par l'action du formaldéhyde sur la toxine résultant de la croissance de *Corynebacterium diphtheriae*.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

**Toxicité spécifique**. Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai suivant, s'il lui était appliqué : utilisez 5 cobayes en bonne santé, pesant 250-350 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux par voie sous-cutanée une quantité équivalant à 5 fois la dose humaine unitaire indiquée sur l'étiquette. Si, dans les 42 jours qui suivent l'injection, un des animaux présente des signes ou meurt de toxémie diphtérique, le vaccin ne satisfait pas à l'essai. Si plus de 1 animal meurt de causes non spécifiques, répétez l'essai une seule fois ; si plus de 1 animal meurt dans le second essai, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

*ANATOXINE PURIFIÉE*

Pour la production de la toxine diphtérique, à partir de laquelle l'anatoxine est préparée, les cultures de semence sont organisées dans un système défini de lot de semence où le pouvoir toxigène est maintenu et restauré, si besoin est, par une nouvelle sélection. Une souche de *Corynebacterium diphtheriae* fortement toxigène dont l'origine et l'historique sont connus, est cultivée en milieu liquide approprié. En fin de croissance, la pureté de chaque culture est vérifiée et les cultures contaminées sont éliminées. Le milieu de culture contenant la toxine est séparé aseptiquement et dès que possible de la masse bactérienne. La teneur en toxine (Lf par millilitre) est déterminée (*2.7.27*) afin de contrôler la régularité de la production. Plusieurs récoltes peuvent être réunies pour préparer l'anatoxine purifiée. La toxine est purifiée pour éliminer les composants susceptibles de causer des réactions indésirables en usage humain. La toxine purifiée est détoxifiée par le formaldéhyde selon une méthode qui évite de détruire l'activité immunogène de l'anatoxine et la réversibilité de la toxine, notamment par action de la chaleur. La purification peut également être effectuée après détoxification.

Seule une anatoxine purifiée qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée dans la préparation du vrac final.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Absence de toxine et irréversibilité de l'anatoxine**. A l'aide de la solution tampon, sans adsorbant, utilisée dans le vaccin final, préparez une solution d'anatoxine purifiée en vrac contenant 100 Lf/mL. Divisez la solution en 2 parties égales. Maintenez 1 partie à 5 ± 3 °C et l'autre partie à 37 °C, pendant 6 semaines. Effectuez une recherche de toxine diphtérique active sur cellules Vero en utilisant 50 µL/cupule des 2 échantillons. L'échantillon ne doit pas contenir de conservateurs antimicrobiens et il doit être déterminé que les agents de détoxification se situent à des concentrations inférieures à la concentration toxique vis-à-vis des cellules Vero. La toxicité non spécifique peut être éliminée par dialyse.

Utilisez des cellules Vero récemment trypsinisées à une concentration appropriée, par exemple $2{,}5 \times 10^5\ mL^{-1}$ et une toxine diphtérique de référence diluée dans de l'anatoxine diphtérique à 100 Lf/mL. Une toxine diphtérique de référence appropriée contiendra soit 100 $DL_{50}$/mL au minimum, soit 67 à 133 lr/100 dans 1 Lf et 25 000 à 50 000 fois la dose minimale de réaction pour cobayes dans 1 Lf (la *toxine diphtérique PBR* convient comme toxine de référence). Diluez la toxine dans de l'anatoxine diphtérique à 100 Lf/mL jusqu'à une concentration appropriée, par exemple $2 \times 10^{-4}$ Lf/mL. Préparez des dilutions en série de raison 2 de la toxine diphtérique diluée et utilisez des échantillons à examiner non dilués (50 µL/cupule). Répartissez les dilutions dans les cupules d'une plaque stérile pour culture cellulaire contenant du milieu approprié aux cellules Vero. Afin de vérifier qu'un effet cytotoxique constaté est spécifique à la toxine diphtérique, préparez en parallèle des dilutions où la toxine est neutralisée par de l'antitoxine diphtérique à une concentration appropriée, par exemple 100 UI/mL. Préparez sur chaque plaque des cupules témoins sans anatoxine ni toxine et avec anatoxine non toxique à 100 Lf/mL afin de vérifier la croissance normale des cellules. Ajoutez de la suspension de cellules à chaque cupule, scellez les plaques et faites-les incuber à 37 °C pendant 5-6 jours. Un effet cytotoxique est constaté s'il y a inhibition métabolique totale des cellules Vero, montrée par l'indicateur de pH du milieu. Confirmez l'effet cytopathogène par examen microscopique ou par une coloration appropriée telle que la coloration au MTT. L'essai n'est pas valable si $5 \times 10^{-5}$ Lf/mL de toxine diphtérique de référence dans de l'anatoxine à 100 Lf/mL n'exerce pas d'effet cytotoxique sur les cellules Vero ou si l'effet cytotoxique de cette quantité de toxine n'est pas neutralisé dans les cupules contenant de l'antitoxine diphtérique. L'anatoxine purifiée satisfait à l'essai s'il ne se présente aucune toxicité neutralisable par l'antitoxine dans l'un ou l'autre des échantillons.

**Pureté antigénique** (*2.7.27*). L'anatoxine purifiée contient au minimum 1500 Lf par milligramme d'azote protéique.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé par adsorption d'une quantité appropriée d'anatoxine purifiée sur un support minéral tel que du phosphate d'aluminium hydraté ou de l'hydroxyde d'aluminium ; le mélange obtenu est approximativement isotonique au sang. Des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent être ajoutés. L'activité antigénique du vaccin est altérée par certains conservateurs antimicrobiens, notamment ceux du type phénolique, qui ne doivent pas être ajoutés au vaccin.

Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable. Les récipients sont fermés de façon à prévenir toute contamination.

Seul un lot final qui est conforme à chacun des essais décrits sous Identification, Essai et Activité peut être libéré. Si l'essai de conservateur antimicrobien et la détermination de l'activité ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

Si la teneur en formaldéhyde libre a été déterminée sur les antigènes purifiés en vrac ou sur le vrac final et s'il a été démontré que la teneur dans le lot final ne dépassera pas 0,2 g/L, l'essai du formaldéhyde libre peut ne pas être effectué sur le lot final.

IDENTIFICATION

L'anatoxine diphtérique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Dissolvez dans le vaccin diphtérique adsorbé une quantité suffisante de *citrate de sodium R* pour obtenir une solution à 100 g/L. Faites incuber à 37 °C pendant environ 16 h et centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Le liquide surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité.

ESSAI

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à la teneur minimale qui s'est avérée efficace et elle n'est pas supérieure à 115 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin diphtérique adsorbé satisfait à l'essai de stérilité.

ACTIVITÉ

Evaluez l'activité du vaccin diphtérique adsorbé par un des titrages prescrits (*2.7.6*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 30 UI par dose humaine unitaire.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nombre minimal d'Unités Internationales par dose humaine unitaire,
– dans les cas appropriés, que le vaccin est destiné à la vaccination primaire des enfants et pas nécessairement à la vaccination des adultes, ni aux rappels ultérieurs,
– le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
– que le vaccin doit être agité avant l'emploi,
– que le vaccin ne doit pas être congelé.

**01/2008:0646**

# VACCIN DIPHTÉRIQUE ADSORBÉ, À TENEUR RÉDUITE EN ANTIGÈNE

## Vaccinum diphtheriae, antigeniis minutum, adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin diphtérique adsorbé, à teneur réduite en antigène, est une préparation d'anatoxine diphtérique avec un adsorbant minéral. L'anatoxine est obtenue par l'action du formaldéhyde sur la toxine résultant de la croissance de *Corynebacterium diphtheriae*. Il sera démontré à l'Autorité compétente que la quantité d'anatoxine diphtérique utilisée ne produit pas de réaction indésirable chez des sujets des groupes d'âge auxquels le vaccin est destiné.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

**Toxicité spécifique**. Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai suivant, s'il lui était appliqué : utilisez 5 cobayes en bonne santé, pesant 250-350 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux par voie sous-cutanée une quantité équivalant à 5 fois la dose humaine unitaire indiquée sur l'étiquette. Si, dans les 42 jours qui suivent l'injection, un des animaux présente des signes ou meurt de toxémie diphtérique, le vaccin ne satisfait pas à l'essai. Si plus d'un animal meurt de causes non spécifiques, répétez l'essai une seule fois ; si plus d'un animal meurt dans le second essai, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

*ANATOXINE PURIFIÉE*

L'anatoxine diphtérique purifiée est préparée comme décrit dans la monographie *Vaccin diphtérique adsorbé (0443)* et satisfait aux spécifications qui y sont prescrites.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé par adsorption d'une quantité appropriée d'anatoxine purifiée sur un support minéral tel que du phosphate d'aluminium hydraté ou de l'hydroxyde d'aluminium ; le mélange obtenu est approximativement isotonique au sang. Des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent être ajoutés. L'activité antigénique du vaccin est altérée par certains conservateurs antimicrobiens, notamment ceux du type phénolique, qui ne doivent pas être ajoutés au vaccin.

Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable. Les récipients sont fermés de façon à prévenir toute contamination.

Vaccins

Seul un lot final qui est conforme à chacun des essais décrits sous Identification, Essai et Activité peut être libéré. Si l'essai de conservateur antimicrobien et la détermination de l'activité ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

Si la teneur en formaldéhyde libre a été déterminée sur l'anatoxine purifiée en vrac ou sur le vrac final et s'il a été démontré que la teneur dans le lot final ne dépassera pas 0,2 g/L, l'essai du formaldéhyde libre peut ne pas être effectué sur le lot final.

IDENTIFICATION

L'anatoxine diphtérique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Dissolvez dans le vaccin à examiner une quantité suffisante de *citrate de sodium R* pour obtenir une solution à 100 g/L. Faites incuber à 37 °C pendant environ 16 h et centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Le surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité. Si un résultat satisfaisant n'est pas obtenu avec un vaccin adsorbé sur de l'hydroxyde d'aluminium, effectuez l'essai de la manière suivante. Centrifugez 15 mL du vaccin à examiner et mettez le culot en suspension dans 5 mL d'un mélange récemment préparé de 1 volume d'une solution d'*édétate de sodium R* à 56 g/L et de 49 volumes d'une *solution de phosphate disodique R* à 90 g/L. Maintenez à 37 °C pendant au moins 6 h, puis centrifugez. Le surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité.

ESSAI

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à la teneur minimale qui s'est avérée efficace et elle n'est pas supérieure à 115 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin à examiner satisfait à l'essai de stérilité.

ACTIVITÉ

Evaluez l'activité du vaccin diphtérique adsorbé pour adultes et adolescents par un des titrages prescrits (*2.7.6*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 2 UI par dose humaine unitaire.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- le nombre minimal d'Unités Internationales par dose humaine unitaire,
- le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
- que le vaccin doit être agité avant l'emploi,
- que le vaccin ne doit pas être congelé.

**01/2008:0444**

# VACCIN DIPHTÉRIQUE ET TÉTANIQUE ADSORBÉ

## Vaccinum diphtheriae et tetani adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin diphtérique et tétanique adsorbé est une préparation d'anatoxine diphtérique et d'anatoxine tétanique avec un adsorbant minéral. Les anatoxines sont obtenues par l'action du formaldéhyde sur les toxines résultant de la croissance de *Corynebacterium diphtheriae* et *Clostridium tetani*, respectivement.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

**Toxicité spécifique des composants diphtérique et tétanique**. Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai suivant, s'il lui était appliqué : utilisez 5 cobayes en bonne santé, pesant 250-350 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux par voie sous-cutanée une quantité équivalant à 5 fois la dose humaine unitaire indiquée sur l'étiquette. Si, dans les 42 jours qui suivent l'injection, un des animaux présente des signes ou meurt de toxémie diphtérique ou du tétanos, le vaccin ne satisfait pas à l'essai. Si plus de 1 animal meurt de causes non spécifiques, répétez l'essai une seule fois ; si plus de 1 animal meurt dans le second essai, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

*ANATOXINES DIPHTÉRIQUE ET TÉTANIQUE PURIFIÉES*

Les anatoxines diphtérique et tétanique purifiées sont préparées comme décrit dans les monographies *Vaccin diphtérique adsorbé (0443)* et *Vaccin tétanique adsorbé (0452)* et satisfont aux spécifications qui y sont prescrites.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé par adsorption de quantités appropriées d'anatoxine diphtérique et d'anatoxine tétanique purifiées sur un support minéral tel que du phosphate d'aluminium hydraté ou de l'hydroxyde d'aluminium ; le mélange obtenu est approximativement isotonique au sang. Des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent être ajoutés. L'activité antigénique du vaccin est altérée par certains conservateurs antimicrobiens, notamment ceux du type phénolique, qui ne doivent pas être ajoutés au vaccin.
Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable. Les récipients sont fermés de façon à prévenir toute contamination.
Seul un lot final qui est conforme à chacun des essais décrits sous Identification, Essai et Activité peut être libéré. Si l'essai de conservateur antimicrobien et la détermination de l'activité ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

Si la teneur en formaldéhyde libre a été déterminée sur les antigènes purifiés en vrac ou sur le vrac final et s'il a été démontré que la teneur dans le lot final ne dépassera pas 0,2 g/L, l'essai du formaldéhyde libre peut ne pas être effectué sur le lot final.

IDENTIFICATION

A. L'anatoxine diphtérique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Dissolvez dans le vaccin diphtérique et tétanique adsorbé une quantité suffisante de *citrate de sodium R* pour obtenir une solution à 100 g/L. Faites incuber à 37 °C pendant environ 16 h et centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Le surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité.

Vaccins

B. L'anatoxine tétanique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec une antitoxine tétanique appropriée en donnant un précipité.

ESSAI

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à la teneur minimale qui s'est avérée efficace et elle n'est pas supérieure à 115 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin diphtérique et tétanique adsorbé satisfait à l'essai de stérilité.

ACTIVITÉ

**Composant diphtérique**. Evaluez l'activité du composant diphtérique par un des titrages prescrits (*2.7.6*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 30 UI par dose humaine unitaire.

**Composant tétanique**. Evaluez l'activité du composant tétanique adsorbé par un des titrages prescrits (*2.7.8*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 40 UI par dose humaine unitaire.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nombre minimal d'Unités Internationales de chaque composant par dose humaine unitaire,
– dans les cas appropriés, que le vaccin est destiné à la vaccination primaire des enfants et pas nécessairement à la vaccination des adultes, ni aux rappels ultérieurs,
– le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
– que le vaccin doit être agité avant l'emploi,
– que le vaccin ne doit pas être congelé.

Vaccins

**01/2008:0647**

# VACCIN DIPHTÉRIQUE ET TÉTANIQUE ADSORBÉ, À TENEUR RÉDUITE EN ANTIGÈNE(S)

## Vaccinum diphtheriae et tetani, antigeni-o(-is) minutum, adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin diphtérique et tétanique adsorbé, à teneur réduite en antigène(s), est une préparation d'anatoxine diphtérique et d'anatoxine tétanique avec un adsorbant minéral. Les anatoxines sont obtenues par l'action du formaldéhyde sur les toxines résultant de la croissance de *Corynebacterium diphtheriae* et *Clostridium tetani*, respectivement. Il doit être démontré à l'Autorité compétente que la quantité d'anatoxine diphtérique utilisée ne produit pas de réaction indésirable chez des sujets des groupes d'âge auxquels le vaccin est destiné.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

**Toxicité spécifique des composants diphtérique et tétanique**. Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai suivant, s'il lui était appliqué : utilisez 5 cobayes en bonne santé, pesant 250-350 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux par voie sous-cutanée une quantité équivalant à 5 fois la dose humaine unitaire indiquée sur l'étiquette. Si, dans les 42 jours qui suivent l'injection, un des animaux présente des signes ou meurt de toxémie diphtérique ou du tétanos, le vaccin ne satisfait pas à l'essai. Si plus d'un animal meurt de causes non spécifiques, répétez l'essai une seule fois ; si plus d'un animal meurt dans le second essai, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

*ANATOXINES DIPHTÉRIQUE ET TÉTANIQUE PURIFIÉES*

Les anatoxines diphtérique et tétanique purifiées sont préparées comme décrit dans les monographies *Vaccin diphtérique adsorbé (0443)* et *Vaccin tétanique adsorbé (0452)* et satisfont aux spécifications qui y sont prescrites.

*VRAC FINAL*

Le vaccin est préparé par adsorption de quantités appropriées d'anatoxine diphtérique et d'anatoxine tétanique purifiées sur un support minéral tel que du phosphate d'aluminium hydraté ou de l'hydroxyde d'aluminium ; le mélange obtenu est approximativement isotonique au sang. Des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent être ajoutés. L'activité antigénique du vaccin est altérée par certains conservateurs antimicrobiens, notamment ceux du type phénolique, qui ne doivent pas être ajoutés au vaccin.

Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable. Les récipients sont fermés de façon à prévenir toute contamination.

Seul un lot final qui est conforme à chacun des essais décrits sous Identification, Essai et Activité peut être libéré. Si l'essai de conservateur antimicrobien et la détermination de l'activité ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

Si la teneur en formaldéhyde libre a été déterminée sur les anatoxines purifiées en vrac ou sur le vrac final et s'il a été démontré que la teneur dans le lot final ne dépassera pas 0,2 g/L, l'essai du formaldéhyde libre peut ne pas être effectué sur le lot final.

IDENTIFICATION

A. L'anatoxine diphtérique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Dissolvez dans le vaccin à examiner une quantité suffisante de *citrate de sodium R* pour obtenir une solution à 100 g/L. Faites incuber à 37 °C pendant environ 16 h et centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Le surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité. Si un résultat satisfaisant n'est pas obtenu avec un vaccin adsorbé sur de l'hydroxyde d'aluminium, effectuez l'essai de la manière suivante. Centrifugez 15 mL du vaccin à examiner et mettez le culot en suspension dans 5 mL d'un mélange récemment préparé de 1 volume d'une solution d'*édétate de sodium R* à 56 g/L et de 49 volumes d'une solution de *phosphate disodique R* à 90 g/L. Maintenez à 37 °C pendant au moins 6 h, puis centrifugez. Le surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité.

B. L'anatoxine tétanique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec une antitoxine tétanique appropriée en donnant un précipité.

ESSAI

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à la teneur minimale qui s'est avérée efficace et elle n'est pas supérieure à 115 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin à examiner satisfait à l'essai de stérilité.

ACTIVITÉ

**Composant diphtérique**. Evaluez l'activité du composant diphtérique par un des titrages prescrits (*2.7.6*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 2 UI par dose humaine unitaire.

**Composant tétanique**. Evaluez l'activité du composant tétanique par un des titrages prescrits (*2.7.8*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 20 UI par dose humaine unitaire.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nombre minimal d'Unités Internationales de chaque composant par dose humaine unitaire,
– le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
– que le vaccin doit être agité avant l'emploi,
– que le vaccin ne doit pas être congelé.

**01/2008:2067**
**corrigé 6.0**

# VACCIN DIPHTÉRIQUE, TÉTANIQUE, COQUELUCHEUX (ACELLULAIRE, MULTICOMPOSÉ), DE L'HÉPATITE B (ADNr), POLIOMYÉLITIQUE (INACTIVÉ) ET CONJUGUÉ DE L'HAEMOPHILUS TYPE b, ADSORBÉ

## Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis sine cellulis ex elementis praeparatum, hepatitidis B (ADNr), poliomyelitidis inactivatum et haemophili stirpi b coniugatum adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin diphtérique, tétanique, coquelucheux (acellulaire, multicomposé), de l'hépatite B (ADNr), poliomyélitique (inactivé) et conjugué de l'haemophilus type b, adsorbé, est un vaccin combiné composé d'anatoxine diphtérique, d'anatoxine tétanique, de composants antigéniques, purifiés séparément, de *Bordetella pertussis*, de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg), de souches appropriées de virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3, cultivés en cultures cellulaires appropriées et inactivées par une méthode validée, et de phosphate de polyribosylribitol (PRP) couplé par liaison covalente à une protéine vectrice. Les antigènes présents dans le vaccin peuvent être adsorbés sur un support minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté. Sous certaines présentations du produit, le composant haemophilus peut se trouver dans un récipient séparé dont le contenu est mélangé aux autres composants immédiatement avant l'utilisation ou au cours de celle-ci.

Les anatoxines sont obtenues par action du formaldéhyde sur les toxines résultant de la croissance de *Corynebacterium diphtheriae* et de *Clostridium tetani*, respectivement.

Le vaccin contient soit l'anatoxine coquelucheuse, soit une protéine apparentée à la toxine coquelucheuse mais dépourvue de propriétés toxiques, obtenue par l'expression d'une forme génétiquement modifiée du gène correspondant. L'anatoxine coquelucheuse est obtenue à partir de la toxine coquelucheuse par une méthode qui la rend inoffensive mais maintient des propriétés immunogènes adéquates et évite la réversibilité. Le vaccin peut également contenir de l'hémagglutinine filamenteuse et de la pertactine (protéine de 69 kDa de la membrane externe) ainsi que d'autres composants définis de *B. pertussis*, par exemple les antigènes fimbria-2 et fimbria-3 ; ces 2 antigènes peuvent être copurifiés. La composition et les caractéristiques antigéniques reposent sur la démonstration de l'induction d'une protection et de l'absence de réactions non attendues dans le groupe cible auquel est destiné le vaccin.

L'antigène de surface de l'hépatite B est une protéine constitutive du virus de l'hépatite B. Il est obtenu par la méthode dite de l'ADN recombinant.

Le PRP est un copolymère linéaire constitué d'un enchaînement d'unités 3-β-D-ribofuranosyl-(1 → 1)-ribitol-5-phosphate [$(C_{10}H_{19}O_{12}P)_n$], de taille moléculaire définie, obtenu à partir d'une souche appropriée d'*Haemophilus influenzae* type b. La protéine vectrice conjuguée au polyoside est capable d'induire une réponse immunitaire des lymphocytes B, dépendante des lymphocytes T, vis-à-vis du polyoside.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit être établi que le procédé de production utilisé donne de façon reproductible des vaccins comparables à celui dont l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées.

Si le composant haemophilus du vaccin se présente dans un récipient séparé, pendant les études destinées à démontrer la régularité du procédé de production, les titrages d'activité des composants diphtérique, tétanique, coquelucheux, hépatite B et poliomyélitique sont effectués sur un nombre approprié de lots du vaccin reconstitué selon le mode d'emploi. Par la suite, les titrages d'activité peuvent être effectués sans mélange avec le composant haemophilus.

**Toxicité spécifique des composants diphtérique et tétanique**. Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai suivant, s'il lui était appliqué : utilisez 5 cobayes en bonne santé, pesant 250-350 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux par voie sous-cutanée une quantité équivalant à 5 fois la dose humaine unitaire indiquée sur l'étiquette. Si, dans les 42 jours qui suivent l'injection, un des animaux présente des signes ou meurt de toxémie diphtérique ou du tétanos, le vaccin ne satisfait pas à l'essai. Si plus de 1 animal meurt de causes non spécifiques, répétez l'essai une seule fois ; si plus de 1 animal meurt dans le second essai, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

Une détermination de la teneur en endotoxines bactériennes (*2.6.14*) sur l'anatoxine diphtérique purifiée, l'anatoxine tétanique purifiée, les composants coquelucheux purifiés, l'antigène de surface de l'hépatite B, les récoltes monovalentes de virus poliomyélitiques purifiées et inactivées et le conjugué PRP en vrac est effectuée afin de contrôler la procédure de purification et de limiter la teneur en endotoxines du vaccin final. Dans le cas de chaque composant, la teneur en endotoxines bactériennes n'est pas supérieure à la limite approuvée.

Pendant les études de développement et chaque fois qu'il est nécessaire de revalider le procédé de production, un essai des pyrogènes (*2.6.8*) est réalisé en injectant une dose appropriée du lot final à des lapins. Il est démontré que le vaccin est satisfaisant en ce qui concerne l'absence d'activité pyrogène.

Pendant les études de développement et chaque fois qu'il est nécessaire de revalider le procédé de production, il doit être démontré par un essai chez l'animal que le vaccin est capable d'induire vis-à-vis du PRP une réponse immunitaire des lymphocytes B, dépendante des lymphocytes T.

La stabilité du lot final et des substances intermédiaires appropriées est évaluée au moyen d'un ou de plusieurs essais indicatifs. Pour le composant haemophilus, les essais indicatifs de stabilité sont par exemple la détermination de la taille moléculaire, la détermination du PRP libre dans le conjugué et la cinétique de dépolymérisation. En fonction des résultats des essais de stabilité, des spécifications de libération des lots sont établies pour ces essais indicatifs de façon à démontrer que le vaccin sera satisfaisant à la fin de la période de validité.

*Vaccin(s) de référence.* Sous réserve qu'ils permettent d'effectuer des titrages d'activité valables, les vaccins monocomposants de référence peuvent être utilisés pour les déterminations d'activité du vaccin combiné. Si leur utilisation n'est pas possible, du fait d'interactions entre les composants du vaccin combiné ou de différences de composition entre le vaccin de référence monocomposant et le vaccin à examiner, un lot du vaccin combiné dont l'efficacité a été démontrée lors d'essais cliniques ou un autre lot représentatif est utilisé comme vaccin de référence. Le lot représentatif doit être préparé par un procédé strictement identique à celui utilisé pour le lot soumis aux essais cliniques. Le vaccin de référence peut être stabilisé par une méthode dont l'absence d'effet sur la procédure de détermination de l'activité a été démontrée.

*PRODUCTION DES COMPOSANTS*

La production des composants est conforme aux exigences des monographies *Vaccin diphtérique adsorbé (0443), Vaccin tétanique adsorbé (0452), Vaccin coquelucheux (adsorbé, multicomposé, acellulaire) (1356), Vaccin de l'hépatite B (ADNr) (1056), Vaccin poliomyélitique inactivé (0214)* et *Vaccin conjugué de l'haemophilus type b (1219).*

*VRACS FINALS*

*Vaccin dont tous les composants sont dans le même récipient.* Le vrac final est préparé par adsorption de quantités appropriées d'anatoxine diphtérique purifiée, d'anatoxine tétanique purifiée, de composants coquelucheux purifiés et d'antigène de surface de l'hépatite B purifié, séparément ou ensemble, sur un support minéral tel que de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté, puis addition de quantités appropriées de conjugué PRP et de récoltes monovalentes purifiées et inactivées de virus poliomyélitiques de type 1, 2 et 3 ou d'une quantité appropriée de mélange trivalent de ces récoltes monovalentes purifiées. Des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent être ajoutés.

*Vaccin dont le composant haemophilus se présente dans un récipient séparé.* Le vrac final contenant les composants diphtérique, tétanique, coquelucheux, hépatite B et poliomyélitique est préparé par adsorption de quantités appropriées d'anatoxine diphtérique purifiée, d'anatoxine tétanique purifiée, de composants coquelucheux purifiés et d'antigène de surface de l'hépatite B purifié, séparément ou ensemble, sur un support minéral tel que de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté, puis addition de quantités appropriées de récoltes monovalentes purifiées et inactivées de virus poliomyélitique de type 1, 2 et 3 ou un mélange approprié de ces récoltes monovalentes. Ce vrac final est rempli séparément. Des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent être ajoutés. Le vrac final du composant haemophilus est préparé par dilution du conjugué en vrac jusqu'à sa concentration finale à l'aide d'un diluant approprié. Un stabilisateur peut être ajouté.

Un vrac final ne peut être utilisé pour la préparation du lot final que s'il satisfait aux exigences suivantes.

**Sérum-albumine bovine**. Déterminée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) sur les composants poliomyélitiques après purification de la récolte et avant préparation du vrac final, avant addition de l'adsorbant, la quantité de sérum-albumine bovine est telle que la teneur dans le lot final ne sera pas supérieure à 50 ng par dose humaine unitaire.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final du composant haemophilus est cryodesséché lorsque le composant haemophilus se présente dans un récipient séparé. Un lot final ne peut être libéré que s'il satisfait à l'essai d'osmolalité et aux exigences spécifiées ci-après sous Identification, Essai et Activité.

Si l'essai d'osmolalité, l'essai d'absence de toxine coquelucheuse résiduelle et irréversibilité de l'anatoxine coquelucheuse, l'essai de teneur en conservateur antimicrobien et les titrages d'activité des composants diphtérique, tétanique et coquelucheux ont été réalisés avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent être omis sur le lot final.

Si la teneur en formaldéhyde libre a été déterminée soit sur les antigènes purifiés en vrac et sur les récoltes monovalentes purifiées ou le mélange trivalent de virus poliomyélitiques, soit sur le vrac final et s'il a été démontré que la teneur du lot final ne dépassera pas 0,2 g/L, l'essai du formaldéhyde libre peut ne pas être effectué sur le lot final.

Si l'essai de la sérum-albumine bovine a été effectué avec des résultats satisfaisants sur le mélange trivalent de récoltes monovalentes inactivées du composant poliomyélitique ou sur le vrac final, il peut être omis sur le lot final.

Dans le cas où le titrage d'activité du composant hépatite B est effectué *in vivo*, s'il a été effectué avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, il peut être omis sur le lot final.

Si le titrage d'activité *in vivo* du composant poliomyélitique a été effectué avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, il peut être omis sur le lot final.

Le titrage d'activité *in vivo* du composant poliomyélitique peut ne pas être effectué s'il a été démontré sur un produit donné et pour chaque type de poliovirus, que les critères d'acceptation de la détermination de la teneur en antigène D sont tels qu'ils fournissent les mêmes résultats que le titrage d'activité *in vivo* en termes d'acceptation ou de rejet d'un lot. Cette démonstration doit comprendre des essais sur des lots à activité altérée, produits de manière expérimentale si nécessaire via un traitement par la chaleur par exemple ou d'autres moyens permettant de diminuer l'activité immunogène. En cas de modification significative du procédé de production des antigènes ou de leur formulation, l'impact sur les titrages d'activité *in vivo* et *in vitro* devra être évalué, et le besoin de revalidation devra être considéré.

**PRP libre**. Pour les vaccins dont tous les composants sont dans le même récipient, la teneur en PRP libre est mesurée sur la fraction non adsorbée. La détermination est effectuée sur le composant haemophilus après élimination du conjugué, par exemple au moyen de chromatographie d'échange d'anions, d'exclusion ou hydrophobe, par ultrafiltration ou d'autres procédés validés. La teneur en PRP libre n'est pas supérieure à celle approuvée pour le produit considéré.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de la limite approuvée pour le produit considéré.

**Osmolalité** (*2.2.35*). L'osmolalité du vaccin, reconstitué dans les cas appropriés, se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

IDENTIFICATION

*Si le composant haemophilus du vaccin se présente dans un récipient séparé, les identifications A, B, C, D et E sont effectuées sur le récipient contenant les composants diphtérique, tétanique, coquelucheux, hépatite B et poliomyélitique. L'identification F est effectuée sur le récipient contenant le composant haemophilus.*

A. L'anatoxine diphtérique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après est donnée à titre d'exemple. Dissolvez dans le vaccin à examiner une quantité suffisante de *citrate de sodium R* pour obtenir une solution à 100 g/L. Maintenez à 37 °C pendant environ 16 h et centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Le surnageant réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité.

B. L'anatoxine tétanique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec une antitoxine tétanique appropriée en donnant un précipité.

C. Examiné par des méthodes immunochimiques appropriées (*2.7.1*), le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec des immunosérums spécifiques des composants coquelucheux du vaccin.

D. Le composant hépatite B est identifié par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), par exemple le titrage d'activité *in vitro*, ou par une méthode d'électrophorèse appropriée (*2.2.31*).

E. Il est démontré, par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) telle que la détermination de l'antigène D par immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA), que le vaccin contient les virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3.

F. Le PRP et sa protéine vectrice sont identifiés par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

ESSAI

*Si le composant haemophilus du vaccin se présente dans un récipient séparé, les essais d'absence de toxine coquelucheuse résiduelle et irréversibilité de l'anatoxine coquelucheuse, du formaldéhyde libre, de l'aluminium, du conservateur antimicrobien et de la stérilité sont effectués sur le récipient contenant les composants diphtérique, tétanique, coquelucheux, poliomyélitique et de l'hépatite B ; les essais PRP, Eau, Conservateur antimicrobien (dans les cas appropriés), Aluminium (dans les cas appropriés) et Stérilité sont effectués sur le récipient contenant le composant haemophilus.*

*Certains essais sur le composant haemophilus sont effectués sur le produit cryodesséché plutôt que sur le conjugué en vrac, car la cryodessiccation peut affecter le composant à examiner.*

**Absence de toxine coquelucheuse résiduelle et irréversibilité de l'anatoxine coquelucheuse**. *Cet essai n'est pas nécessaire pour le produit obtenu par modification génétique.* Utilisez 3 groupes d'au moins 5 souris sensibles à l'histamine. Injectez au premier groupe, par voie intrapéritonéale, l'équivalent de 2 fois la dose humaine unitaire du vaccin conservé à une température de 2-8 °C. Injectez au deuxième groupe, par voie intrapéritonéale, l'équivalent de 2 fois la dose humaine unitaire du vaccin incubé à une température de 37 °C pendant 4 semaines. Injectez le diluant, par voie intrapéritonéale, au troisième groupe de souris. Après 5 jours, injectez à chaque souris, par voie intrapéritonéale, 2 mg d'histamine base dans un volume maximal de 0,5 mL et placez les animaux en observation pendant 24 h. L'essai n'est pas valable si 1 ou plusieurs souris témoins meurent suite à l'épreuve à l'histamine. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux du premier ou du deuxième groupe ne meurt suite à l'épreuve à l'histamine. Si 1 souris meurt dans le premier et/ou le deuxième groupe, l'essai peut être répété avec le même nombre ou avec un plus grand nombre de souris, en combinant les résultats des essais valables ; le vaccin satisfait à l'essai si, dans les 2 groupes recevant le vaccin, pas plus de 5 pour cent du nombre total de souris meurent suite à l'épreuve à l'histamine.

La sensibilité à l'histamine de la lignée de souris utilisée est vérifiée à intervalles appropriés par la méthode suivante : injectez par voie intraveineuse des dilutions au tiers d'une préparation de référence de la toxine coquelucheuse dans de la solution saline tamponnée phosphate contenant 2 g/L de gélatine, et effectuez une épreuve à l'histamine comme indiqué ci-dessus. La lignée est acceptable si plus de 50 pour cent des animaux sont sensibilisés par 50 ng de toxine coquelucheuse et si aucun des animaux témoins traités avec le diluant seul, puis soumis à l'épreuve à l'histamine ne présente de signes de sensibilisation.

La *toxine coquelucheuse PBR* convient comme toxine coquelucheuse de référence.

**PRP** : au minimum 80 pour cent de la quantité de PRP indiquée sur l'étiquette pour un vaccin dont le composant haemophilus se présente dans un récipient séparé.

Pour un vaccin dont tous les composants sont dans le même récipient, la teneur en PRP déterminée sur la fraction non adsorbée n'est pas inférieure à celle approuvée pour le produit.

La teneur en PRP est déterminée soit par dosage du ribose (*2.5.31*), ou du phosphore (*2.5.18*), soit par dosage immunochimique (*2.7.1*), soit par chromatographie liquide (*2.2.29*) à échange d'anions avec détection ampérométrique à pulsations.

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg d'aluminium (Al) par dose humaine unitaire si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L de formaldéhyde libre par dose humaine unitaire.

**Conservateur antimicrobien**. Déterminez, s'il y a lieu, la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à la valeur minimale efficace préalablement établie, ni supérieure à 115 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

**Eau** (*2.5.12*) : au maximum 3,0 pour cent pour le composant haemophilus cryodesséché.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

ACTIVITÉ

**Composant diphtérique**. Evaluez l'activité du composant diphtérique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin diphtérique adsorbé (*2.7.6*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à l'activité minimale indiquée sur l'étiquette.

Sauf exception justifiée et autorisée, l'activité minimale indiquée sur l'étiquette est de 30 UI par dose humaine unitaire.

**Composant tétanique**. Evaluez l'activité du composant tétanique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin tétanique adsorbé (*2.7.8*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 40 UI par dose humaine unitaire.

**Composant coquelucheux**. Le vaccin satisfait au titrage d'activité du vaccin coquelucheux (acellulaire) (*2.7.16*).

**Composant hépatite B**. Le vaccin satisfait au titrage d'activité du vaccin de l'hépatite B (*2.7.15*).

**Composant poliomyélitique**

*Teneur en antigène D*. Afin de contrôler la reproductibilité de la production, déterminez la teneur en antigène D pour les virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3 après désorption par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), en utilisant une préparation de référence étalonnée en Unités Pharmacopée Européenne d'antigène D. Pour chaque type, la teneur mesurée, exprimée par rapport à la teneur en antigène D indiquée sur l'étiquette, se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré. Le *vaccin poliomyélitique inactivé PBR*,

étalonné en Unités Pharmacopée Européenne, est destiné à la détermination de la teneur en antigène D. L'Unité Pharmacopée Européenne et l'Unité Internationale sont équivalentes.

*Essai in vivo.* Le vaccin satisfait au titrage d'activité *in vivo* du vaccin poliomyélitique inactivé (*2.7.20*).

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- le nombre minimal d'Unités Internationales d'anatoxine diphtérique et d'anatoxine tétanique par dose humaine unitaire,
- le nom et la quantité des composants coquelucheux par dose humaine unitaire,
- la quantité de HBsAg par dose humaine unitaire,
- la quantité nominale du virus poliomyélitique de chaque type (1, 2 et 3), exprimée en Unités Pharmacopée Européenne d'antigène D, par dose humaine unitaire,
- les substrats cellulaires utilisés pour la production des composants poliomyélitique et hépatite B,
- la quantité de PRP, en microgrammes, par dose humaine unitaire,
- la nature de la protéine vectrice et la quantité nominale par dose humaine unitaire,
- dans les cas appropriés, que le vaccin est destiné à la vaccination primaire des enfants et ne convient pas nécessairement à la vaccination des adultes, ni aux rappels ultérieurs,
- le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
- que le vaccin doit être agité avant l'emploi,
- que le vaccin ne doit pas être congelé,
- dans les cas appropries, que le vaccin contient une protéine apparentée à la toxine coquelucheuse, produite par modification génétique.

**01/2008:1932**
**corrigé 6.0**

# VACCIN DIPHTÉRIQUE, TÉTANIQUE, COQUELUCHEUX (ACELLULAIRE, MULTICOMPOSÉ) ET CONJUGUÉ DE L'HAEMOPHILUS TYPE b, ADSORBÉ

## Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis sine cellulis ex elementis praeparatum cumque haemophili stirpi b coniugatum adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin diphtérique, tétanique, coquelucheux (acellulaire, multicomposé) et conjugué de l'haemophilus type b, adsorbé, est un vaccin combiné composé d'anatoxine diphtérique, d'anatoxine tétanique, de composants antigéniques de *Bordetella pertussis* purifiés séparément, de phosphate de polyribosylribitol (PRP) couplé par liaison covalente à une protéine vectrice et d'un adsorbant minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté. Sous certaines présentations du produit, le composant haemophilus type b peut se trouver dans un récipient séparé dont le contenu est mélangé aux autres composants immédiatement avant l'utilisation.

Les anatoxines sont obtenues par action du formaldéhyde sur les toxines résultant respectivement de la croissance de *Corynebacterium diphtheriae* et de *Clostridium tetani*.

Le vaccin contient soit l'anatoxine coquelucheuse, soit une protéine apparentée à la toxine coquelucheuse mais dépourvue de propriétés toxiques, obtenue par l'expression d'une forme génétiquement modifiée du gène correspondant. L'anatoxine coquelucheuse est obtenue à partir de la toxine coquelucheuse par une méthode qui la rend inoffensive mais qui maintient des propriétés immunogènes adéquates et évite la réversibilité. Le composant coquelucheux acellulaire peut également contenir de l'hémagglutinine filamenteuse et de la pertactine (protéine de 69 kDa de la membrane externe) ainsi que d'autres composants définis de *B. pertussis*, par exemple les antigènes fimbria-2 et fimbria-3, ces 2 antigènes pouvant être copurifiés. La composition et les caractéristiques antigéniques reposent sur la démonstration de l'induction d'une protection et de l'absence de réactions non attendues dans le groupe cible auquel est destiné le vaccin.

Le PRP est un copolymère linéaire constitué d'un enchaînement d'unités 3-β-D-ribofuranosyl-(1→1)-ribitol-5-phosphate $[(C_{10}H_{19}O_{12}P)_n]$, de taille moléculaire définie, obtenu à partir d'une souche appropriée d'*Haemophilus influenzae* type b. La protéine vectrice conjuguée au PRP est capable d'induire une réponse immunitaire des lymphocytes B, dépendante des lymphocytes T, vis-à-vis du polyoside.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit être établi que le procédé de production utilisé donne de façon reproductible des vaccins comparables à celui dont l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées.

Si le composant haemophilus du vaccin se présente dans un récipient séparé, pendant les études destinées à démontrer la régularité du procédé de production, les titrages d'activité des composants diphtérique, tétanique et coquelucheux sont effectués sur un nombre approprié de lots du vaccin reconstitué selon le mode d'emploi. Par la suite, les titrages d'activité peuvent être effectués sans mélange avec le composant haemophilus.

**Toxicité spécifique des composants diphtérique et tétanique**. Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai suivant, s'il lui était appliqué : utilisez 5 cobayes en bonne santé, pesant 250-350 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux par voie sous-cutanée une quantité équivalant à 5 fois la dose humaine unitaire indiquée sur l'étiquette. Si dans les 42 jours qui suivent l'injection, un des animaux présente des signes ou meurt de toxémie diphtérique ou du tétanos, le vaccin ne satisfait pas à l'essai. Si plus de 1 animal meurt de causes non spécifiques, répétez l'essai une seule fois ; si plus de 1 animal meurt dans le second essai, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

Une détermination de la teneur en endotoxines bactériennes (*2.6.14*) sur l'anatoxine diphtérique purifiée, l'anatoxine tétanique purifiée, les composants coquelucheux purifiés et le conjugué PRP en vrac est effectuée afin de contrôler la procédure de purification et limiter la teneur en endotoxines du vaccin final. Pour chaque composant, la teneur en endotoxines bactériennes est inférieure à la limite approuvée pour le vaccin individuel et, en tout cas, si le composant haemophilus est présenté dans un récipient séparé, les teneurs en antigènes diphtérique, tétanique et coquelucheux sont telles que le récipient final de ces composants contient moins de 100 UI par dose humaine unitaire.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

Pendant les études de développement et chaque fois qu'il est nécessaire de revalider le procédé de production, il doit être démontré par un essai chez l'animal que le vaccin est capable d'induire une réponse immunitaire des lymphocytes B, dépendante des lymphocytes T, vis-à-vis du PRP.

*Vaccin(s) de référence.* Sous réserve qu'ils permettent d'effectuer des titrages d'activité valables, les vaccins monocomposants de référence peuvent être utilisés pour les déterminations d'activité du vaccin combiné. Si leur utilisation n'est pas possible, du fait d'interactions entre les composants

Vaccins

du vaccin combiné ou de différences de composition entre le vaccin de référence monocomposant et le vaccin à examiner, un lot du vaccin combiné dont l'efficacité a été démontrée lors d'essais cliniques ou un lot représentatif est utilisé comme vaccin de référence. Le lot représentatif doit être préparé par un procédé strictement identique à celui utilisé pour le lot soumis aux essais cliniques. Le vaccin de référence peut être stabilisé par une méthode dont l'absence d'effet sur la procédure de détermination de l'activité a été démontrée.

*PRODUCTION DES COMPOSANTS*

La production des composants est conforme aux exigences des monographies *Vaccin diphtérique adsorbé (0443), Vaccin tétanique adsorbé (0452), Vaccin coquelucheux (adsorbé, multicomposé, acellulaire) (1356),* et *Vaccin conjugué de l'haemophilus type b (1219).*

*VRAC FINAL*

Différentes méthodes de préparation peuvent être utilisées : le vrac final peut être préparé, par adsorption séparée ou concomitante, de quantités appropriées d'anatoxine diphtérique purifiée, d'anatoxine tétanique purifiée, de composants coquelucheux purifiés acellulaires et de conjugué PRP, sur un support minéral tel que de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté ; il est également possible de préparer et remplir séparément 2 vracs finals, l'un contenant les composants diphtérique, tétanique et coquelucheux, l'autre le composant haemophilus, éventuellement cryodesséché. Des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent être ajoutés.

Un vrac final ne peut être utilisé pour la préparation du lot final que s'il satisfait aux exigences suivantes.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Un lot final ne peut être libéré que s'il satisfait à l'essai d'osmolalité et aux exigences spécifiées ci-après sous Identification, Essai et Activité.

Si l'essai d'absence de toxine coquelucheuse résiduelle, l'essai d'irréversibilité de l'anatoxine coquelucheuse, l'essai de teneur en conservateur antimicrobien et le titrage d'activité ont été réalisés avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent être omis sur le lot final.

Si la teneur en formaldéhyde libre a été déterminée sur les antigènes purifiés en vrac ou sur le vrac final et s'il a été démontré que la teneur du lot final ne dépassera pas 0,2 g/L, l'essai du formaldéhyde libre peut ne pas être effectué sur le lot final.

**Osmolalité** (*2.2.35*). L'osmolalité du vaccin, reconstitué le cas échéant, se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**pH** (*2.2.3*). Le pH du vaccin, reconstitué si nécessaire, se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**PRP libre**. La détermination est effectuée après élimination du conjugué, par exemple, au moyen de chromatographie d'échange d'anions, d'exclusion ou hydrophobe, par ultrafiltration ou d'autres procédés validés. La teneur en PRP libre n'est pas supérieure à celle approuvée pour le produit considéré.

## IDENTIFICATION

*Si le composant haemophilus du vaccin se présente dans un récipient séparé, les identifications A, B et C sont effectuées sur le récipient contenant les composants diphtériques, tétaniques et coquelucheux. L'identification D est effectuée sur le récipient contenant le composant haemophilus.*

A. L'anatoxine diphtérique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Dissolvez dans le vaccin à examiner une quantité suffisante de *citrate de sodium R* pour obtenir une solution à 100 g/L. Maintenez à 37 °C pendant environ 16 h et centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Le surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité.

B. L'anatoxine tétanique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec une antitoxine tétanique appropriée en donnant un précipité.

C. Les composants coquelucheux sont identifiés par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec des immunosérums spécifiques des composants coquelucheux du vaccin.

D. Le composant haemophilus est identifié par une méthode immunochimique (*2.7.1*) appropriée pour le PRP.

## ESSAI

*Si le composant haemophilus du vaccin se présente dans un récipient séparé, les essais Absence de toxine coquelucheuse résiduelle, Irréversibilité de l'anatoxine coquelucheuse, Aluminium, Formaldéhyde libre, Conservateur antimicrobien et Stérilité sont effectués sur le récipient contenant les composants diphtérique, tétanique et coquelucheux, les essais Teneur en PRP, Teneur en eau (le cas échéant), Stérilité et Pyrogènes sur le récipient contenant le composant haemophilus.*

*Si le composant haemophilus est cryodesséché, certains essais peuvent être effectués sur le produit cryodesséché plutôt que sur le conjugué en vrac, car la cryodessiccation peut affecter le composant à examiner.*

**Absence de toxine coquelucheuse résiduelle et irréversibilité de l'anatoxine coquelucheuse**. *Cet essai n'est pas nécessaire pour les produits obtenus par modification génétique.* Utilisez 3 groupes ne comptant pas moins de 5 souris sensibles à l'histamine. Injectez au premier groupe, par voie intrapéritonéale, l'équivalent de 2 fois la dose humaine unitaire du vaccin conservé à une température de 2-8 °C. Injectez au deuxième groupe, par voie intrapéritonéale, l'équivalent de 2 fois la dose humaine unitaire du vaccin incubé à une température de 37 °C pendant 4 semaines. Injectez le diluant, par voie intrapéritonéale, au troisième groupe de souris. Après 5 jours, injectez à chaque souris, par voie intrapéritonéale, 2 mg d'histamine base dans un volume maximal de 0,5 mL et placez les animaux en observation pendant 24 h. L'essai n'est pas valable si 1 ou plusieurs souris témoins meurent suite à l'épreuve à l'histamine. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux du premier ou du deuxième groupe ne meurt suite à l'épreuve à l'histamine. Si 1 souris meurt dans le premier et/ou le deuxième groupe, l'essai peut être répété avec le même nombre ou avec un plus grand nombre de souris, en combinant les résultats des essais valables ; le vaccin satisfait à l'essai si, dans les 2 groupes recevant le vaccin, pas plus de 5 pour cent du nombre total de souris ne meurent suite à l'épreuve à l'histamine.

La sensibilité à l'histamine de la lignée de souris utilisée est vérifiée à intervalles appropriés par la méthode suivante : injectez, par voie intraveineuse, des dilutions au 1/3 d'une préparation de référence de la toxine coquelucheuse dans de la solution saline tamponnée phosphate contenant 2 g/L de gélatine, et effectuez une épreuve à l'histamine comme indiqué ci-dessus. La lignée est acceptable si plus de 50 pour cent des animaux sont sensibilisés par 50 ng de toxine coquelucheuse et si aucun des animaux témoins traités avec le diluant seul,

Vaccins

puis soumis à l'épreuve à l'histamine ne présente de signes de sensibilisation.

La *toxine coquelucheuse PBR* convient comme toxine coquelucheuse de référence.

**PRP** : au minimum 80 pour cent de la quantité de PRP indiquée sur l'étiquette. La teneur en PRP est déterminée soit par dosage du ribose (*2.5.31*), ou du phosphore (*2.5.18*), soit par dosage immunochimique (*2.7.1*), soit par chromatographie liquide (*2.2.29*) à échange d'anions avec détection ampérométrique à pulsations.

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Déterminez, s'il y a lieu, la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à la valeur minimale efficace préalablement établie, ni supérieure à 115 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

**Eau** (*2.5.12*) : au maximum 3,0 pour cent, pour le composant haemophilus cryodesséché.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

**Pyrogènes** (*2.6.8*). Le vaccin satisfait à l'essai des pyrogènes. Injectez à chaque lapin, par kilogramme de masse corporelle, une quantité de vaccin équivalente à : 1 µg de PRP si la protéine vectrice est l'anatoxine diphtérique ou la protéine diphtérique CRM 197 ; 0,1 µg de PRP si la protéine vectrice est l'anatoxine tétanique ; 0,025 µg de PRP si la protéine vectrice est l'OMP.

ACTIVITÉ

**Composant diphtérique**. Evaluez l'activité du composant diphtérique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin diphtérique adsorbé (*2.7.6*).

La limite inférieure de confiance (*P* = 0,95) de l'activité mesurée n'est pas inférieure à l'activité minimale indiquée sur l'étiquette.

Sauf exception justifiée et autorisée, l'activité minimale indiquée sur l'étiquette est de 30 UI par dose humaine unitaire.

**Composant tétanique**. Evaluez l'activité du composant tétanique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin tétanique adsorbé (*2.7.8*).

La limite inférieure de confiance (*P* = 0,95) de l'activité mesurée n'est pas inférieure à 40 UI par dose humaine unitaire.

**Composant coquelucheux**. Le vaccin satisfait au titrage d'activité du vaccin coquelucheux (acellulaire) (*2.7.16*).

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nombre minimal d'Unités Internationales d'anatoxine diphtérique et d'anatoxine tétanique par dose humaine unitaire,
– le nom et la quantité des composants coquelucheux par dose humaine unitaire,
– la quantité de PRP, en microgrammes, par dose humaine unitaire,
– la nature de la protéine vectrice et la quantité nominale par dose humaine unitaire.
– dans les cas appropriés, que le vaccin est destiné à la vaccination primaire des enfants et ne convient pas nécessairement à la vaccination des adultes, ni aux rappels ultérieurs,
– le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
– que le vaccin doit être agité avant l'emploi,
– que le vaccin ne doit pas être congelé,
– dans les cas appropriés, que le vaccin contient une protéine apparentée à la toxine coquelucheuse, produite par modification génétique.

**01/2008:1933**
**corrigé 6.0**

# VACCIN DIPHTÉRIQUE, TÉTANIQUE, COQUELUCHEUX (ACELLULAIRE, MULTICOMPOSÉ) ET DE L'HÉPATITE B (ADNr), ADSORBÉ

## Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis sine cellulis ex elementis praeparatum et hepatitidis B (ADNr) adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin diphtérique, tétanique, coquelucheux (acellulaire, multicomposé) et de l'hépatite B (ADNr), adsorbé est un vaccin combiné composé d'anatoxine diphtérique, d'anatoxine tétanique, de composants antigéniques de *Bordetella pertussis* purifiés séparément, de l'antigène de surface de l'hépatite B et d'un adsorbant minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté.

Les anatoxines sont obtenues par l'action du formaldéhyde sur les toxines résultant respectivement de la croissance de *Corynebacterium diphtheriae* et *Clostridium tetani*.

Le vaccin contient soit l'anatoxine coquelucheuse, soit une protéine apparentée à la toxine coquelucheuse mais exempte de propriétés toxiques, produite par l'expression d'une forme génétiquement modifiée du gène correspondant. L'anatoxine coquelucheuse est obtenue à partir de la toxine par une méthode qui la rend inoffensive mais qui maintient des propriétés immunogènes adéquates et évite la réversibilité. Le vaccin peut également contenir de l'hémagglutinine filamenteuse et de la pertactine (protéine de 69 kDa de la membrane externe) ainsi que d'autres composants définis de *B. pertussis*, par exemple les antigènes fimbria-2 et fimbria-3, ces 2 antigènes pouvant être copurifiés. La composition et les caractéristiques antigéniques reposent sur la démonstration de l'induction d'une protection et de l'absence de réactions non attendues dans le groupe cible auquel est destiné le vaccin.

L'antigène de surface de l'hépatite B est une protéine constitutive du virus de l'hépatite B. Il est obtenu par la méthode dite de l'ADN recombinant.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit être établi que le procédé de production utilisé donne, de façon reproductible, des vaccins comparables à celui dont l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées.

**Toxicité spécifique des composants diphtériques et tétaniques**. Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai suivant, s'il lui était appliqué : utilisez 5 cobayes en bonne santé, pesant 250-350 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux par voie sous-cutanée une quantité équivalant à 5 fois la dose humaine unitaire indiquée sur l'étiquette. Si, dans les 42 jours qui suivent l'injection, un des animaux présente des signes ou meurt de toxémie diphtérique ou du tétanos, le vaccin ne satisfait pas à l'essai. Si plus de 1 animal meurt de causes non spécifiques, répétez l'essai une seule fois ; si plus de 1 animal meurt dans le second essai, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

Une détermination de la teneur en endotoxines bactériennes (*2.6.14*) sur l'anatoxine diphtérique purifiée, l'anatoxine tétanique purifiée et les composants coquelucheux purifiés est effectuée afin de contrôler la procédure de purification et de limiter la teneur en endotoxines du vaccin final. Pour chaque composant, la teneur en endotoxines bactériennes est inférieure à la limite approuvée pour le vaccin individuel.

*Vaccin(s) de référence.* Sous réserve qu'ils permettent d'effectuer des titrages d'activité valables, des vaccins monocomposants de référence peuvent être utilisés pour les déterminations d'activité du vaccin combiné. Si leur utilisation n'est pas possible, du fait d'interactions entre les composants du vaccin combiné ou de différences de composition entre le vaccin de référence monocomposant et le vaccin à examiner, un lot du vaccin combiné dont l'efficacité a été démontrée lors d'essais cliniques ou un lot représentatif est utilisé comme vaccin de référence. Le lot représentatif doit être préparé par un procédé strictement identique à celui utilisé pour le lot soumis aux essais cliniques. Le vaccin de référence peut être stabilisé par une méthode dont l'absence d'effet sur la procédure de détermination de l'activité a été démontrée.

*PRODUCTION DES COMPOSANTS*

La production des composants est conforme aux exigences des monographies *Vaccin diphtérique adsorbé (0443), Vaccin tétanique adsorbé (0452),Vaccin coquelucheux (adsorbé, multicomposé, acellulaire) (1356)* et *Vaccin de l'hépatite B (ADNr) (1056).*

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé par adsorption séparée ou concomitante de quantités appropriées d'anatoxine diphtérique purifiée, d'anatoxine tétanique purifiée, de composants coquelucheux acellulaires purifiés et d'antigène de surface de l'hépatite B, sur un support minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté. Des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent être ajoutés.
Un vrac final ne peut être utilisé pour la préparation du lot final que s'il satisfait aux exigences suivantes.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Un lot final ne peut être libéré que s'il satisfait à l'essai d'osmolalité et aux exigences spécifiées ci-après sous Identification, Essai et Activité.
Si l'essai d'absence de toxine coquelucheuse résiduelle, l'essai d'irréversibilité de l'anatoxine coquelucheuse, l'essai de teneur en conservateur antimicrobien et les titrages d'activité des composants diphtérique, tétanique et coquelucheux ont été réalisés avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

Si la teneur en formaldéhyde libre a été déterminée sur les antigènes purifiés en vrac ou sur le vrac final et s'il a été démontré que la teneur du lot final ne dépassera pas 0,2 g/L, l'essai du formaldéhyde libre peut ne pas être effectué sur le lot final.

Si un titrage d'activité *in vivo* du composant hépatite B est effectué avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, il peut ne pas être effectué sur le lot final.

**Osmolalité** (*2.2.35*). L'osmolalité du vaccin se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

## IDENTIFICATION

A. L'anatoxine diphtérique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Dissolvez dans le vaccin à examiner une quantité suffisante de *citrate de sodium R* pour obtenir une solution à 100 g/L. Maintenez à 37 °C pendant environ 16 h et centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Le surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité.

B. L'anatoxine tétanique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec une antitoxine tétanique appropriée en donnant un précipité.

C. Les composants coquelucheux sont identifiés par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec des immunosérums spécifiques des composants coquelucheux du vaccin.

D. La détermination de l'activité ou, le cas échéant, le profil électrophorétique sert aussi à identifier le composant hépatite B du vaccin.

## ESSAI

**Absence de toxine coquelucheuse résiduelle et irréversibilité de l'anatoxine coquelucheuse**. *Cet essai n'est pas nécessaire pour les produits obtenus par modification génétique.* Utilisez 3 groupes ne comptant pas moins de 5 souris sensibles à l'histamine. Injectez au premier groupe, par voie intrapéritonéale, l'équivalent de 2 fois la dose humaine unitaire du vaccin conservé à une température de 2-8 °C. Injectez au deuxième groupe, par voie intrapéritonéale, l'équivalent de 2 fois la dose humaine unitaire du vaccin incubé à une température de 37 °C pendant 4 semaines. Injectez le diluant, par voie intrapéritonéale, au troisième groupe de souris. Après 5 jours, injectez à chaque souris, par voie intrapéritonéale, 2 mg d'histamine base dans un volume maximal de 0,5 mL et placez les animaux en observation pendant 24 h. L'essai n'est pas valable si 1 ou plusieurs souris témoins meurent suite à l'épreuve à l'histamine. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux du premier ou du deuxième groupe ne meurt suite à l'épreuve à l'histamine. Si 1 souris meurt dans le premier et/ou le deuxième groupe, l'essai peut être répété avec le même nombre ou avec un plus grand nombre de souris, en combinant les résultats des essais valables ; le vaccin satisfait à l'essai si, dans les 2 groupes recevant le vaccin, pas plus de 5 pour cent du nombre total de souris ne meurent suite à l'épreuve à l'histamine.

La sensibilité à l'histamine de la lignée de souris utilisée est vérifiée à intervalles appropriés par la méthode suivante : injectez, par voie intraveineuse, des dilutions au 1/3 d'une préparation de référence de la toxine coquelucheuse dans de la solution saline tamponnée phosphate contenant 2 g/L de gélatine, et effectuez une épreuve à l'histamine comme indiqué ci-dessus. La lignée est acceptable si plus de 50 pour cent des animaux sont sensibilisés par 50 ng de toxine coquelucheuse et si aucun des animaux témoins traités avec le diluant seul, puis soumis à l'épreuve à l'histamine ne présente de signes de sensibilisation.

La *toxine coquelucheuse PBR* convient comme toxine coquelucheuse de référence.

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Déterminez, s'il y a lieu, la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à la valeur minimale efficace préalablement établie, ni supérieure à 115 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

**Pyrogènes** (*2.6.8*). Le vaccin satisfait à l'essai des pyrogènes. Injectez à chaque lapin l'équivalent de 1 dose humaine.

ACTIVITÉ

**Composant diphtérique**. Evaluez l'activité du composant diphtérique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin diphtérique adsorbé (*2.7.6*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité mesurée n'est pas inférieure à l'activité minimale indiquée sur l'étiquette.

Sauf exception justifiée et autorisée, l'activité minimale indiquée sur l'étiquette est de 30 UI par dose humaine unitaire.

**Composant tétanique**. Evaluez l'activité du composant tétanique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin tétanique adsorbé (*2.7.8*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité mesurée n'est pas inférieure à 40 UI par dose humaine unitaire.

**Composant coquelucheux**. Le vaccin satisfait au titrage d'activité du vaccin coquelucheux (acellulaire) (*2.7.16*).

**Composant hépatite B**. Le vaccin satisfait au titrage d'activité du vaccin de l'hépatite B (*2.7.15*).

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nombre minimal d'Unités Internationales d'anatoxine diphtérique et d'anatoxine tétanique par dose humaine unitaire,
– le nom et la quantité de composants coquelucheux par dose humaine unitaire,
– la quantité de HBsAg par dose humaine unitaire,
– le type de cellules utilisé pour la production du composant hépatite B,
– dans les cas appropriés, que le vaccin est destiné à la vaccination primaire des enfants et ne convient pas nécessairement à la vaccination des adultes, ni aux rappels ultérieurs,
– le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
– que le vaccin doit être agité avant l'emploi,
– que le vaccin ne doit pas être congelé,
– dans les cas appropriés, que le vaccin contient une protéine apparentée à la toxine coquelucheuse, produite par modification génétique.

Vaccins

**01/2008:1934**
**corrigé 6.0**

# VACCIN DIPHTÉRIQUE, TÉTANIQUE, COQUELUCHEUX (ACELLULAIRE, MULTICOMPOSÉ) ET POLIOMYÉLITIQUE (INACTIVÉ), ADSORBÉ

## Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis sine cellulis ex elementis praeparatum et poliomyelitidis inactivatum adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin diphtérique, tétanique, coquelucheux (acellulaire, multicomposé) et poliomyélitique (inactivé) adsorbé est un vaccin combiné composé d'anatoxine diphtérique, d'anatoxine tétanique, de composants antigéniques de *Bordetella pertussis* purifiés séparément, de souches appropriées des virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3, cultivés en cultures cellulaires appropriées et inactivés par une méthode validée et d'un adsorbant minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté.

Les anatoxines sont obtenues par action du formaldéhyde sur les toxines résultant respectivement de la croissance de *Corynebacterium diphtheriae* et *Clostridium tetani*.

Le vaccin contient soit l'anatoxine coquelucheuse, soit une protéine apparentée à la toxine coquelucheuse mais exempte de propriétés toxiques, produite par l'expression d'une forme génétiquement modifiée du gène correspondant. L'anatoxine coquelucheuse est préparée à partir de la toxine par une méthode qui la rend inoffensive mais qui maintient des propriétés immunogènes adéquates et évite la réversibilité.
Le vaccin peut également contenir de l'hémagglutinine filamenteuse et de la pertactine (protéine de 69 kDa de la membrane externe) ainsi que d'autres composants définis de *B. pertussis*, par exemple les antigènes fimbria-2 et fimbria-3, ces 2 antigènes pouvant être copurifiés. La composition et les caractéristiques antigéniques reposent sur la démonstration de l'induction d'une protection et de l'absence de réactions non attendues dans le groupe cible auquel est destiné le vaccin.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit être établi que le procédé de production utilisé donne de façon reproductible, des vaccins comparables à celui dont l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées.

**Toxicité spécifique des composants diphtérique et tétanique**. Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai suivant, s'il lui était appliqué : utilisez 5 cobayes en bonne santé, pesant 250-350 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux par voie sous-cutanée une quantité équivalant à 5 fois la dose humaine unitaire indiquée sur l'étiquette. Si, dans les 42 jours qui suivent l'injection, un des animaux présente des signes ou meurt de toxémie diphtérique ou du tétanos, le vaccin ne satisfait pas à l'essai. Si plus de 1 animal meurt de causes non spécifiques, répétez l'essai une seule fois ; si plus de 1 animal meurt dans le second essai, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

Une détermination de la teneur en endotoxines bactériennes (*2.6.14*) sur l'anatoxine diphtérique purifiée, de l'anatoxine tétanique purifiée, des composants coquelucheux purifiés et les récoltes monovalentes de virus poliomyélitique purifiées et inactivées est effectuée afin de contrôler la procédure de purification et limiter la teneur en endotoxines du vaccin final. Dans le cas de chaque composant, la teneur en endotoxines bactériennes est inférieure à la limite approuvée pour le vaccin individuel et, en tout cas, les teneurs sont telles que le vaccin final contient moins de 100 UI par dose humaine unitaire.

*Vaccin(s) de référence*. Sous réserve qu'ils permettent d'effectuer des titrages d'activité valables, les vaccins monocomposants de référence peuvent être utilisés pour les déterminations d'activité du vaccin combiné. Si leur utilisation n'est pas possible, du fait d'interactions entre les composants du vaccin combiné ou de différences de composition entre le vaccin de référence monocomposant et le vaccin à examiner, un lot du vaccin combiné dont l'efficacité a été démontrée lors d'essais cliniques ou un lot représentatif est utilisé comme vaccin de référence. Le lot représentatif doit être préparé par un procédé strictement identique à celui utilisé pour le lot soumis aux essais cliniques. Le vaccin de référence peut être stabilisé par une méthode dont l'absence d'effet sur la procédure de détermination de l'activité a été démontrée.

*PRODUCTION DES COMPOSANTS*

La production des composants est conforme aux exigences des monographies *Vaccin diphtérique adsorbé (0443)*, *Vaccin tétanique adsorbé (0452)*, *Vaccin coquelucheux (adsorbé, multicomposé, acellulaire) (1356)* et *Vaccin poliomyélitique inactivé (0214)*.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé par adsorption, séparée ou concomitante, sur un support minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté de quantités appropriées d'anatoxine diphtérique purifiée, d'anatoxine tétanique purifiée et de composants coquelucheux acellulaires

purifiés, puis addition de quantités appropriées de récoltes monovalentes purifiées des virus poliomyélitiques de type 1, 2 et 3 ou d'une quantité appropriée de mélange trivalent de ces récoltes monovalentes purifiées. Des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent être ajoutés.

Un vrac final ne peut être utilisé pour la préparation du lot final que s'il satisfait aux exigences suivantes.

**Sérum-albumine bovine**. Déterminée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) sur les composants poliomyélitiques après la récolte du virus et avant l'addition de l'adsorbant pour la préparation du vrac final, la quantité de sérum-albumine bovine est telle que la teneur dans le lot final ne sera pas supérieure à 50 ng par dose humaine unitaire.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Un lot final ne peut être libéré que s'il satisfait à l'essai d'osmolalité à chacune des exigences spécifiées ci-après sous Identification, Essai et Activité.

Si l'essai d'absence de toxine coquelucheuse résiduelle et irréversibilité de l'anatoxine coquelucheuse, l'essai de teneur en conservateur antimicrobien et les titrages d'activité des composants diphtérique, tétanique et coquelucheux ont été réalisés avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent être omis sur le lot final.

Si la teneur en formaldéhyde libre a été déterminée sur les antigènes purifiés en vrac ou sur le vrac final et s'il a été démontré que la teneur dans le lot final ne dépassera pas 0,2 g/L, l'essai du formaldéhyde libre peut ne pas être effectué sur le lot final.

Si la détermination de la teneur en antigène D a été effectuée avec des résultats satisfaisants pendant la préparation du vrac final avant l'addition de l'adsorbant, elle peut être omise sur le lot final.

Si le titrage d'activité *in vivo* du composant poliomyélitique a été effectué avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, il peut être omis sur le lot final.

Le titrage d'activité *in vivo* du composant poliomyélitique peut ne pas être effectué s'il a été démontré sur un produit donné et pour chaque type de poliovirus, que les critères d'acceptation de la détermination de la teneur en antigène D sont tels qu'ils fournissent les mêmes résultats que le titrage d'activité *in vivo* en termes d'acceptation ou de rejet d'un lot. Cette démonstration doit comprendre des essais sur des lots à activité altérée, produits de manière expérimentale si nécessaire via un traitement par la chaleur par exemple ou d'autres moyens permettant de diminuer l'activité immunogène. En cas de modification significative du procédé de production des antigènes ou de leur formulation, l'impact sur les titrages d'activité *in vivo* et *in vitro* devra être évalué, et le besoin de revalidation devra être considéré.

**Osmolalité** (*2.2.35*). L'osmolalité du vaccin se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

## IDENTIFICATION

A. L'anatoxine diphtérique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Dissolvez dans le vaccin à examiner une quantité suffisante de *citrate de sodium R* pour obtenir une solution à 100 g/L. Maintenez à 37 °C pendant environ 16 h et centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Le surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité.

B. L'anatoxine tétanique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec une antitoxine tétanique appropriée en donnant un précipité.

C. Les composants coquelucheux sont identifiés par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec des immunosérums spécifiques des composants coquelucheux du vaccin.

D. Il est démontré, par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) telle que la détermination de l'antigène D par immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA), que le vaccin contient les virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3.

## ESSAI

**Absence de toxine coquelucheuse résiduelle et irréversibilité de l'anatoxine coquelucheuse**. *Cet essai n'est pas nécessaire pour les produits obtenus par modification génétique.* Utilisez 3 groupes ne comptant pas moins de 5 souris sensibles à l'histamine. Injectez au premier groupe, par voie intrapéritonéale, l'équivalent de 2 fois la dose humaine unitaire du vaccin conservé à une température de 2-8 °C. Injectez au deuxième groupe, par voie intrapéritonéale, l'équivalent de 2 fois la dose humaine unitaire du vaccin incubé à une température de 37 °C pendant 4 semaines. Injectez le diluant, par voie intrapéritonéale, au troisième groupe de souris. Après 5 jours, injectez à chaque souris, par voie intrapéritonéale, 2 mg d'histamine base dans un volume maximal de 0,5 mL et placez les animaux en observation pendant 24 h. L'essai n'est pas valable si 1 ou plusieurs souris témoins meurent suite à l'épreuve à l'histamine. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux du premier ou du deuxième groupe ne meurt suite à l'épreuve à l'histamine. Si 1 souris meurt dans le premier et/ou le deuxième groupe, l'essai peut être répété avec le même nombre ou avec un plus grand nombre de souris, en combinant les résultats des essais valables ; le vaccin satisfait à l'essai si, dans les 2 groupes recevant le vaccin, pas plus de 5 pour cent du nombre total de souris ne meurent suite à l'épreuve à l'histamine.

La sensibilité à l'histamine de la lignée de souris utilisée est vérifiée à intervalles appropriés par la méthode suivante : injectez, par voie intraveineuse, des dilutions au 1/3 d'une préparation de référence de la toxine coquelucheuse dans de la solution saline tamponnée phosphate contenant 2 g/L de gélatine, et effectuez une épreuve à l'histamine comme indiqué ci-dessus. La lignée est acceptable si plus de 50 pour cent des animaux sont sensibilisés par 50 ng de toxine coquelucheuse et si aucun des animaux témoins traités avec le diluant seul, puis soumis à l'épreuve à l'histamine ne présente de signes de sensibilisation.

La *toxine coquelucheuse PBR* convient comme toxine coquelucheuse de référence.

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à la valeur minimale efficace préalablement établie, ni supérieure à 115 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

ACTIVITÉ

**Composant diphtérique**. Evaluez l'activité du composant diphtérique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin diphtérique adsorbé (*2.7.6*).

La limite inférieure de confiance (*P* = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à l'activité minimale indiquée sur l'étiquette.

Sauf exception justifiée et autorisée, l'activité minimale indiquée sur l'étiquette est de 30 UI par dose humaine unitaire.

**Composant tétanique**. Evaluez l'activité du composant tétanique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin tétanique adsorbé (*2.7.8*).

La limite inférieure de confiance (*P* = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 40 UI par dose humaine unitaire.

**Composant coquelucheux**. Le vaccin satisfait au titrage d'activité du vaccin coquelucheux acellulaire (*2.7.16*).

**Composant poliomyélitique**

*Teneur en antigène D*. Afin de contrôler la reproductibilité de la production, déterminez la teneur en antigène D pour les virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3 après désorption par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), en utilisant une préparation de référence étalonnée en Unités Pharmacopée Européenne d'antigène D. Pour chaque type, la teneur mesurée, exprimée par rapport à la teneur en antigène D indiquée sur l'étiquette, se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré. Le *vaccin poliomyélitique inactivé PBR*, étalonné en Unités Pharmacopée Européenne, est destiné à la détermination de la teneur en antigène D. L'Unité Pharmacopée Européenne et l'Unité Internationale sont équivalentes.

*Essai in vivo*. Le vaccin satisfait au titrage d'activité *in vivo* du vaccin poliomyélitique inactivé (*2.7.20*).

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- le nombre minimal d'Unités Internationales d'anatoxine diphtérique et d'anatoxine tétanique par dose humaine unitaire,
- le nom et la quantité des composants coquelucheux par dose humaine unitaire,
- les types de virus poliomyélitique présents dans le vaccin,
- la quantité nominale du virus poliomyélitique de chaque type (1, 2 et 3), exprimée en Unités Pharmacopée Européenne d'antigène D, par dose humaine unitaire,
- le substrat cellulaire utilisé pour la production du composant poliomyélitique,
- dans les cas appropriés, que le vaccin est destiné à la vaccination primaire des enfants et ne convient pas nécessairement à la vaccination des adultes, ni aux rappels ultérieurs,
- le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
- que le vaccin doit être agité avant l'emploi,
- que le vaccin ne doit pas être congelé,
- dans les cas appropriés, que le vaccin contient une protéine apparentée à la toxine coquelucheuse, produite par modification génétique.



**01/2008:2329**

# VACCIN DIPHTÉRIQUE, TÉTANIQUE, COQUELUCHEUX (ACELLULAIRE, MULTICOMPOSÉ) ET POLIOMYÉLITIQUE (INACTIVÉ), ADSORBÉ, À TENEUR RÉDUITE EN ANTIGÈNE(S)

## Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis sine cellulis ex elementis praeparatum et poliomyelitidis inactivatum, antigeni-o(-is) minutum, adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin diphtérique, tétanique, coquelucheux (acellulaire, multicomposé) et poliomyélitique (inactivé), adsorbé, à teneur réduite en antigène(s), est un vaccin combiné composé d'anatoxine diphtérique, d'anatoxine tétanique, de composants antigéniques de *Bordetella pertussis* purifiés séparément, de souches appropriées des virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3, cultivés en cultures cellulaires appropriées et inactivés par une méthode validée et d'un adsorbant minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté.

Les anatoxines sont obtenues par action du formaldéhyde sur les toxines résultant respectivement de la croissance de *Corynebacterium diphtheriae* et *Clostridium tetani*.

La teneur en anatoxine diphtérique par dose humaine unitaire est réduite, comparée aux vaccins généralement utilisés pour une primovaccination ; la teneur en anatoxine tétanique et en composants coquelucheux peut également être réduite.

Le vaccin contient soit l'anatoxine coquelucheuse, soit une protéine apparentée à la toxine coquelucheuse mais exempte de propriétés toxiques, produite par l'expression d'une forme génétiquement modifiée du gène correspondant. L'anatoxine coquelucheuse est préparée à partir de la toxine par une méthode qui la rend inoffensive mais qui maintient des propriétés immunogènes adéquates et évite la réversibilité. Le vaccin peut également contenir de l'hémagglutinine filamenteuse et de la pertactine (protéine de 69 kDa de la membrane externe) ainsi que d'autres composants définis de *B. pertussis*, par exemple les antigènes fimbria-2 et fimbria-3, ces 2 antigènes pouvant être copurifiés. La composition et les caractéristiques antigéniques reposent sur la démonstration de l'induction d'une protection et de l'absence de réactions non attendues dans le groupe cible auquel est destiné le vaccin.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit être établi que le procédé de production utilisé donne de façon reproductible, des vaccins comparables à celui dont l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées.

*Vaccin(s) de référence*. Sous réserve qu'ils permettent d'effectuer des titrages d'activité valables, les vaccins monocomposants de référence peuvent être utilisés pour les déterminations d'activité du vaccin combiné. Si leur utilisation n'est pas possible, du fait d'interactions entre les composants du vaccin combiné ou de différences de composition entre le vaccin de référence monocomposant et le vaccin à examiner, un lot du vaccin combiné dont l'efficacité a été démontrée lors d'essais cliniques ou un lot représentatif est utilisé comme vaccin de référence. Le lot représentatif doit être préparé par un procédé strictement identique à celui utilisé pour le lot soumis aux essais cliniques. Le vaccin de référence peut être stabilisé par une méthode dont l'absence d'effet sur la procédure de détermination de l'activité a été démontrée.

**Toxicité spécifique des composants diphtérique et tétanique**. Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai suivant, s'il lui était appliqué : utilisez 5 cobayes en bonne santé, pesant 250-350 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux par voie sous-cutanée une quantité équivalant à 5 fois la dose humaine unitaire indiquée sur l'étiquette. Si, dans les 42 jours qui suivent l'injection, un des animaux présente des signes ou meurt de toxémie diphtérique ou du tétanos, le vaccin ne satisfait pas à l'essai. Si plus d'un animal meurt de causes non spécifiques, répétez l'essai une seule fois ; si plus d'un animal meurt dans le second essai, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

Une détermination de la teneur en endotoxines bactériennes (*2.6.14*) sur l'anatoxine diphtérique purifiée, l'anatoxine tétanique purifiée, les composants coquelucheux purifiés et les récoltes monovalentes de virus poliomyélitique purifiées et inactivées est effectuée afin de contrôler la procédure de purification et de limiter la teneur en endotoxines du vaccin final. Dans le cas de chaque composant, la teneur en endotoxines bactériennes est inférieure à la limite approuvée pour le vaccin individuel et, en tout cas, les teneurs sont telles que le vaccin final contient moins de 100 UI par dose humaine unitaire.

*PRODUCTION DES COMPOSANTS*

La production des composants est conforme aux exigences des monographies *Vaccin diphtérique adsorbé (0443), Vaccin tétanique adsorbé (0452), Vaccin coquelucheux (adsorbé, multicomposé, acellulaire) (1356)* et *Vaccin poliomyélitique inactivé (0214)*.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé par adsorption séparée ou concomitante de quantités appropriées d'anatoxine diphtérique purifiée, d'anatoxine tétanique purifiée et de composants coquelucheux acellulaires purifiés sur un support minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté, puis addition de quantités appropriées de récoltes monovalentes purifiées des virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3 ou d'une quantité appropriée de mélange trivalent de ces récoltes monovalentes purifiées. Des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent être ajoutés.

Un vrac final ne peut être utilisé pour la préparation du lot final que s'il satisfait aux exigences suivantes.

**Sérum-albumine bovine**. Déterminée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) sur les composants poliomyélitiques après la récolte du virus et avant l'addition de l'adsorbant pour la préparation du vrac final, la quantité de sérum-albumine bovine est telle que la teneur dans le lot final ne sera pas supérieure à 50 ng par dose humaine unitaire.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable. Les récipients sont fermés de façon à prévenir toute contamination.

Un lot final ne peut être libéré que s'il satisfait à l'essai d'osmolalité et à chacune des exigences spécifiées ci-après sous Identification, Essai et Activité.

Si l'essai d'absence de toxine coquelucheuse résiduelle et irréversibilité de l'anatoxine coquelucheuse, l'essai de teneur en conservateur antimicrobien et les titrages d'activité des composants diphtérique, tétanique et coquelucheux ont été réalisés avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent être omis sur le lot final.

Si la teneur en formaldéhyde libre a été déterminée sur les antigènes purifiés en vrac ou sur le vrac final et s'il a été démontré que la teneur dans le lot final ne dépassera pas 0,2 g/L, l'essai du formaldéhyde libre peut ne pas être effectué sur le lot final.

Si la détermination de la teneur en antigène D ne peut pas être effectuée sur le lot final, elle est effectuée au cours de la préparation du vrac final, avant l'addition de l'absorbant.

Si le titrage d'activité *in vivo* du composant poliomyélitique a été effectué avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, il peut être omis sur le lot final.

Le titrage d'activité *in vivo* du composant poliomyélitique peut ne pas être effectué s'il a été démontré sur un vaccin donné et pour chaque type de poliovirus que les critères d'acceptation de la détermination de la teneur en antigène D sont tels qu'ils fournissent les mêmes résultats que le titrage d'activité *in vivo* en termes d'acceptation ou de rejet d'un lot. Cette démonstration doit comprendre des essais sur des lots à activité altérée, produits de manière expérimentale si nécessaire, via un traitement par la chaleur par exemple ou d'autres moyens permettant de diminuer l'activité immunogène. En cas de modification significative du procédé de production des antigènes ou de leur formulation, l'impact sur les titrages d'activité *in vivo* et *in vitro* devra être évalué, et le besoin de revalidation devra être considéré.

**Osmolalité** (*2.2.35*). L'osmolalité du vaccin se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

IDENTIFICATION

A. L'anatoxine diphtérique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Dissolvez dans le vaccin à examiner une quantité suffisante de *citrate de sodium R* pour obtenir une solution à 100 g/L. Maintenez à 37 °C pendant environ 16 h et centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Le surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité. Si un résultat satisfaisant n'est pas obtenu avec un vaccin adsorbé sur de l'hydroxyde d'aluminium, effectuez l'essai de la manière suivante. Centrifugez 15 mL du vaccin à examiner et mettez le culot en suspension dans 5 mL d'un mélange récemment préparé de 1 volume d'une solution d'*édétate de sodium R* à 56 g/L et de 49 volumes d'une solution de *phosphate disodique R* à 90 g/L. Maintenez à 37 °C pendant au moins 6 h, puis centrifugez. Le surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité.

B. L'anatoxine tétanique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec une antitoxine tétanique appropriée en donnant un précipité.

C. Les composants coquelucheux sont identifiés par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec des immunosérums spécifiques des composants coquelucheux du vaccin.

D. Il est démontré, par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) telle que la détermination de l'antigène D par immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA), que le vaccin contient les virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3.

ESSAI

**Absence de toxine coquelucheuse résiduelle et irréversibilité de l'anatoxine coquelucheuse**. *Cet essai n'est pas nécessaire pour les produits obtenus par modification génétique.* Utilisez 3 groupes ne comptant pas moins de 5 souris sensibles à l'histamine. Injectez au premier groupe, par voie intrapéritonéale, l'équivalent de 2 fois la dose humaine

unitaire du vaccin conservé à 2-8 °C. Injectez au deuxième groupe, par voie intrapéritonéale, l'équivalent de 2 fois la dose humaine unitaire du vaccin incubé à 37 °C pendant 4 semaines. Injectez le diluant, par voie intrapéritonéale, au troisième groupe de souris. Après 5 jours, injectez à chaque souris, par voie intrapéritonéale, 2 mg d'histamine base dans un volume maximal de 0,5 mL et placez les animaux en observation pendant 24 h. L'essai n'est pas valable si une ou plusieurs souris témoins meurent suite à l'épreuve à l'histamine. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux du premier ou du deuxième groupe ne meurt suite à l'épreuve à l'histamine. Si une souris meurt dans le premier et/ou le deuxième groupe, l'essai peut être répété avec le même nombre ou avec un plus grand nombre de souris, en combinant les résultats des essais valables ; le vaccin satisfait à l'essai si, dans les 2 groupes recevant le vaccin, pas plus de 5 pour cent du nombre total de souris ne meurent suite à l'épreuve à l'histamine.

La sensibilité à l'histamine de la lignée de souris utilisée est vérifiée à intervalles appropriés par la méthode suivante : injectez, par voie intraveineuse, des dilutions au 1/3 d'une préparation de référence de la toxine coquelucheuse dans de la solution saline tamponnée phosphate contenant 2 g/L de gélatine, et effectuez une épreuve à l'histamine comme indiqué ci-dessus. La lignée est acceptable si plus de 50 pour cent des animaux sont sensibilisés par 50 ng de toxine coquelucheuse et si aucun des animaux témoins traités avec le diluant seul, puis soumis à l'épreuve à l'histamine ne présente de signes de sensibilisation.

La *toxine coquelucheuse PBR* convient comme toxine coquelucheuse de référence.

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à la valeur minimale efficace préalablement établie, ni supérieure à 115 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

ACTIVITÉ

**Composant diphtérique**. Evaluez l'activité du composant diphtérique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin diphtérique adsorbé (*2.7.6*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 2 UI par dose humaine unitaire.

**Composant tétanique**. Evaluez l'activité du composant tétanique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin tétanique adsorbé (*2.7.8*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 20 UI par dose humaine unitaire.

**Composant coquelucheux**. Le vaccin satisfait au titrage d'activité du vaccin coquelucheux acellulaire (*2.7.16*).

**Composant poliomyélitique**

*Teneur en antigène D.* Afin de contrôler la reproductibilité de la production, déterminez la teneur en antigène D pour les virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3 après désorption par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), en utilisant une préparation de référence étalonnée en Unités Pharmacopée Européenne d'antigène D. Pour chaque type, la teneur mesurée, exprimée par rapport à la teneur en antigène D indiquée sur l'étiquette, se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré. Le *vaccin poliomyélitique inactivé PBR*, étalonné en Unités Pharmacopée Européenne, est destiné à la détermination de la teneur en antigène D. L'Unité Pharmacopée Européenne et l'Unité Internationale sont équivalentes.

*Essai in vivo.* Le vaccin satisfait au titrage d'activité *in vivo* du vaccin poliomyélitique inactivé (*2.7.20*).

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nombre minimal d'Unités Internationales d'anatoxine diphtérique et d'anatoxine tétanique par dose humaine unitaire,
– le nom et la quantité des composants coquelucheux par dose humaine unitaire,
– dans les cas appropriés, que le vaccin contient une protéine apparentée à la toxine coquelucheuse, produite par modification génétique,
– les types de virus poliomyélitique présents dans le vaccin,
– la quantité nominale du virus poliomyélitique de chaque type (1, 2 et 3), exprimée en Unités Pharmacopée Européenne d'antigène D, par dose humaine unitaire,
– le substrat cellulaire utilisé pour la production du composant poliomyélitique,
– le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
– que le vaccin doit être agité avant l'emploi,
– que le vaccin ne doit pas être congelé.

**01/2009:2065**

# VACCIN DIPHTÉRIQUE, TÉTANIQUE, COQUELUCHEUX (ACELLULAIRE, MULTICOMPOSÉ), POLIOMYÉLITIQUE (INACTIVÉ) ET CONJUGUÉ DE L'HAEMOPHILUS TYPE b, ADSORBÉ

## Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis sine cellulis ex elementis praeparatum, poliomyelitidis inactivatum et haemophili stirpi b coniugatum adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin diphtérique, tétanique, coquelucheux (acellulaire, multicomposé), poliomyélitique (inactivé) et conjugué de l'haemophilus type b, adsorbé, est un vaccin combiné composé d'anatoxine diphtérique, d'anatoxine tétanique, de composants antigéniques de *Bordetella pertussis*, purifiés séparément, de souches appropriées de virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3, cultivés en cultures cellulaires appropriées et inactivées par une méthode validée, de phosphate de polyribosylribitol (PRP) couplé par liaison covalente à une protéine vectrice et d'un adsorbant minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté. Le produit se présente soit sous forme de formulation pentavalente liquide dans un même récipient, soit sous forme de formulation tétravalente avec le composant haemophilus cryodesséché dans un récipient séparé dont le contenu est mélangé aux autres composants immédiatement avant l'utilisation.

Les anatoxines sont obtenues par action du formaldéhyde sur les toxines résultant respectivement de la croissance de *Corynebacterium diphtheriae* et de *Clostridium tetani*.

Le vaccin contient soit l'anatoxine coquelucheuse, soit une protéine apparentée à la toxine coquelucheuse mais dépourvue de propriétés toxiques, obtenue par l'expression d'une forme génétiquement modifiée du gène correspondant. L'anatoxine coquelucheuse est obtenue à partir de la toxine coquelucheuse par une méthode qui la rend inoffensive mais qui maintient des propriétés immunogènes adéquates et évite la réversibilité. Le composant coquelucheux acellulaire peut également contenir de l'hémagglutinine filamenteuse et de la pertactine (protéine de 69 kDa de la membrane externe) ainsi que d'autres composants définis de *B. pertussis*, par exemple les antigènes fimbria-2 et fimbria-3 ; ces 2 antigènes peuvent être copurifiés. La composition et les caractéristiques antigéniques reposent

sur la démonstration de l'induction d'une protection et de l'absence de réaction non attendue dans le groupe cible auquel est destiné le vaccin.

Le PRP est un copolymère linéaire constitué d'un enchaînement d'unités 3-β-D-ribofuranosyl-(1→1)-ribitol-5-phosphate [$(C_{10}H_{19}O_{12}P)_n$], de taille moléculaire définie, obtenu à partir d'une souche appropriée d'*Haemophilus influenzae* type b. La protéine vectrice conjuguée au PRP est capable d'induire une réponse immunitaire des lymphocytes B, dépendante des lymphocytes T, vis-à-vis du polyoside.

## PRODUCTION

### *DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit être établi que le procédé de production utilisé donne de façon reproductible des vaccins comparables à celui dont l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées.

**Toxicité spécifique des composants diphtérique et tétanique**. Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai suivant, s'il lui était appliqué : utilisez 5 cobayes en bonne santé, pesant 250-350 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux par voie sous-cutanée une quantité équivalant à 5 fois la dose humaine unitaire indiquée sur l'étiquette. Si, dans les 42 jours qui suivent l'injection, un des animaux présente des signes ou meurt de toxémie diphtérique ou du tétanos, le vaccin ne satisfait pas à l'essai. Si plus de 1 animal meurt de causes non spécifiques, répétez l'essai une seule fois ; si plus de 1 animal meurt dans le second essai, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*). Une détermination de la teneur en endotoxines bactériennes de l'anatoxine diphtérique purifiée, de l'anatoxine tétanique purifiée, des composants coquelucheux purifiés, des récoltes monovalentes purifiées de virus poliomyélitiques et du conjugué PRP en vrac est effectuée afin de contrôler la procédure de purification et limiter la teneur en endotoxines bactériennes du vaccin final. Pour chaque composant, la teneur en endotoxines bactériennes est inférieure à la limite approuvée par l'Autorité compétente pour le vaccin considéré.

**Etudes de développement et études destinées à démontrer la régularité du procédé de production**. Pendant les études de développement et chaque fois qu'il est nécessaire de revalider le procédé de production, il doit être démontré par un essai chez l'animal que le vaccin est capable d'induire une réponse immunitaire des lymphocytes B, dépendante des lymphocytes T, vis-à-vis du PRP.

Lorsque le composant haemophilus est présenté dans un récipient séparé, et pendant les études destinées à démontrer la régularité du procédé de production, les titrages d'activité des composants diphtérique, tétanique, coquelucheux et poliomyélitique sont effectués sur un nombre approprié de lots du vaccin reconstitué selon le mode d'emploi. Par la suite, les titrages d'activité peuvent être effectués sans mélange avec le composant haemophilus.

*Vaccin(s) de référence*. Sous réserve qu'ils permettent d'effectuer des titrages d'activité valables, les vaccins monocomposants de référence peuvent être utilisés pour les déterminations d'activité du vaccin combiné. Si leur utilisation n'est pas possible, du fait d'interactions entre les composants du vaccin combiné ou de différences de composition entre le vaccin de référence monocomposant et le vaccin à examiner, un lot du vaccin combiné dont l'efficacité a été démontrée lors d'essais cliniques ou un lot représentatif est utilisé comme vaccin de référence. Le lot représentatif doit être préparé par un procédé strictement identique à celui utilisé pour le lot soumis aux essais cliniques. Le vaccin de référence peut être stabilisé par une méthode dont l'absence d'effet sur la procédure de détermination de l'activité a été démontrée.

### *PRODUCTION DES COMPOSANTS*

La production des composants est conforme aux exigences des monographies *Vaccin diphtérique adsorbé (0443), Vaccin tétanique adsorbé (0452), Vaccin coquelucheux (adsorbé, multicomposé, acellulaire) (1356), Vaccin poliomyélitique inactivé (0214)* et *Vaccin conjugué de l'haemophilus type b (1219)*.

### *VRACS FINALS*

Le vrac final tétravalent des composants diphtérique, tétanique, coquelucheux et poliomyélitique est préparé par adsorption séparée ou concomitante de quantités appropriées d'anatoxine diphtérique purifiée, d'anatoxine tétanique purifiée et de composants coquelucheux purifiés sur un support minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté, puis addition de quantités appropriées de récoltes monovalentes purifiées de virus poliomyélitiques de type 1, 2 et 3 ou d'une quantité appropriée de mélange trivalent de ces récoltes monovalentes purifiées. Des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent être ajoutés.

Si le vaccin est présenté avec les 5 composants dans le même récipient, le vrac final est préparé par ajout d'une quantité appropriée du conjugué haemophilus en vrac au vrac tétravalent. Lorsque le composant haemophilus est présenté dans un récipient séparé, le vrac final est préparé par dilution du conjugué en vrac avec des diluants appropriés pour la cryodessiccation. Un stabilisant peut être rajouté.

Des vracs finals ne peuvent être utilisés pour la préparation du lot final que s'ils satisfont aux exigences suivantes.

**Sérum-albumine bovine**. Déterminée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) sur les composants poliomyélitiques pendant la préparation du vrac final avant l'addition de l'adsorbant, la quantité de sérum-albumine bovine est telle que la teneur dans le lot final ne sera pas supérieure à 50 ng par dose humaine unitaire.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

### *LOT FINAL*

Lorsque le composant haemophilus est présenté dans un récipient séparé, le vrac final de ce composant est cryodesséché.

Un lot final ne peut être libéré que s'il satisfait à l'essai d'osmolalité et aux exigences spécifiées ci-après sous Identification, Essai et Activité.

Si l'essai d'absence de toxine coquelucheuse résiduelle et d'irréversibilité de l'anatoxine coquelucheuse, l'essai de teneur en conservateur antimicrobien et le titrage d'activité ont été réalisés avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

Si la teneur en formaldéhyde libre a été déterminée soit sur les antigènes purifiés en vrac et sur les récoltes monovalentes purifiées ou le mélange trivalent de virus poliomyélitiques, soit sur le vrac final et s'il a été démontré que la teneur du lot final ne dépassera pas 0,2 g/L, l'essai du formaldéhyde libre peut ne pas être effectué sur le lot final.

Si le titrage d'activité *in vivo* du composant poliomyélitique est utilisé, et s'il a été effectué avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, il peut ne pas être effectué sur le lot final.
Le titrage d'activité *in vivo* du composant poliomyélitique peut ne pas être effectué s'il a été démontré sur un produit donné et pour chaque type de poliovirus, que les critères d'acceptation de la détermination de la teneur en antigène D sont tels qu'ils fournissent les mêmes résultats que le titrage d'activité *in vivo* en termes d'acceptation ou de rejet d'un lot. Cette démonstration doit comprendre des essais sur des lots à activité altérée, produits de manière expérimentale si nécessaire via un traitement par la chaleur par exemple ou

d'autres moyens permettant de diminuer l'activité immunogène. En cas de modification significative du procédé de production des antigènes ou de leur formulation, l'impact sur les titrages d'activité *in vivo* et *in vitro* devra être évalué, et le besoin de revalidation devra être considéré.

**Osmolalité** (*2.2.35*). L'osmolalité du vaccin, reconstitué le cas échéant, se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**PRP libre**. Lorsque le composant haemophilus est présenté sous forme de formulation liquide, la présence des autres composants peut interférer dans le titrage et il peut ne pas être possible de séparer le PRP de l'adjuvant. La présence de PRP libre peut être déterminée sur le conjugué en vrac avant l'addition des autres composants ou sur la fraction non adsorbée de la combinaison finale.

Si le composant haemophilus est présenté dans un récipient séparé, plusieurs techniques sont utilisables pour séparer le PRP libre du conjugué, comme par exemple la précipitation, la filtration sur gel, la chromatographie d'exclusion, d'échange d'anions ou hydrophobe, l'ultrafiltration et l'ultracentrigugation. Le PRP libre peut alors être quantifié par diverses techniques, comme une chromatographie d'échange d'anions de haute performance couplée à une détection par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD) ou un immunodosage avec des anticorps anti-PRP. La teneur en PRP libre n'est pas supérieure à celle approuvée pour le produit considéré.

## IDENTIFICATION

*Les identifications A, B, C et D sont effectuées sur le récipient contenant les composants diphtérique, tétanique, coquelucheux et poliomyélitique. L'identification E est effectuée soit sur le récipient contenant les 5 composants, soit sur le récipient contenant le composant haemophilus seul.*

A. L'anatoxine diphtérique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Dissolvez dans le vaccin à examiner une quantité suffisante de *citrate de sodium R* pour obtenir une solution à 100 g/L. Maintenez à 37 °C pendant environ 16 h et centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Le surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité.

B. L'anatoxine tétanique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec une antitoxine tétanique appropriée en donnant un précipité.

C. Les composants coquelucheux sont identifiés par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec des immunosérums spécifiques des composants coquelucheux du vaccin.

D. Il est démontré, par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) telle que la détermination de l'antigène D par immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA), que le vaccin contient les virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3.

E. Le composant haemophilus est identifié par une méthode immunochimique (*2.7.1*) appropriée pour le PRP.

## ESSAI

*Lorsque le composant haemophilus est présenté dans un récipient séparé, les essais Absence de toxine coquelucheuse résiduelle et d'irréversibilité de l'anatoxine coquelucheuse, Aluminium, Formaldéhyde libre, Conservateur antimicrobien et Stérilité sont effectués sur le récipient contenant les composants diphtérique, tétanique, coquelucheux et poliomyélitique ; les essais PRP, Eau, Stérilité et Pyrogènes sont effectués sur le récipient contenant le composant haemophilus seul.*

*Lorsque le composant haemophilus est présenté dans un récipient séparé, certains essais peuvent être effectués sur le produit cryodesséché plutôt que sur le conjugué en vrac, car la cryodessiccation peut affecter le composant à examiner.*

**Absence de toxine coquelucheuse résiduelle et irréversibilité de l'anatoxine coquelucheuse**. *Cet essai n'est pas nécessaire pour le produit obtenu par modification génétique.* Utilisez 3 groupes ne comptant pas moins de 5 souris sensibles à l'histamine. Injectez au 1^er^ groupe, par voie intrapéritonéale, l'équivalent de 2 fois la dose humaine unitaire du vaccin conservé à une température de 2-8 °C. Injectez au 2^e^ groupe, par voie intrapéritonéale, l'équivalent de 2 fois la dose humaine unitaire du vaccin incubé à une température de 37 °C pendant 4 semaines. Injectez le diluant, par voie intrapéritonéale, au 3^e^ groupe de souris. Après 5 jours, injectez à chaque souris, par voie intrapéritonéale, 2 mg d'histamine base dans un volume maximal de 0,5 mL et placez les animaux en observation pendant 24 h. L'essai n'est pas valable si 1 ou plusieurs souris témoins meurent suite à l'épreuve à l'histamine. Le vaccin satisfait à l'essai si, dans les 2 groupes recevant le vaccin, aucune souris ne meurt suite à l'épreuve à l'histamine. Si 1 souris meurt dans le 1^er^ et/ou le 2^e^ groupe, l'essai peut être répété avec le même nombre ou avec un plus grand nombre de souris, en combinant les résultats des essais valables ; le vaccin satisfait à l'essai si, dans les 2 groupes recevant le vaccin, pas plus de 5 pour cent du nombre total de souris ne meurent suite à l'épreuve à l'histamine.

La sensibilité à l'histamine de la lignée de souris utilisée est vérifiée à intervalles appropriés par la méthode suivante : injectez, par voie intraveineuse, des dilutions au tiers d'une préparation de référence de la toxine coquelucheuse dans de la solution saline tamponnée phosphate contenant 2 g/L de gélatine, et effectuez une épreuve à l'histamine comme indiqué ci-dessus. La lignée est acceptable si plus de 50 pour cent des animaux sont sensibilisés par 50 ng de toxine coquelucheuse et si aucun des animaux témoins traités avec le diluant seul, puis soumis à l'épreuve à l'histamine ne présente de signe de sensibilisation.

La *toxine coquelucheuse PBR* convient comme toxine coquelucheuse de référence.

**PRP** : au minimum 80 pour cent de la quantité de PRP indiquée sur l'étiquette. La teneur en PRP est déterminée soit par dosage du ribose (*2.5.31*) ou du phosphore (*2.5.18*), soit par dosage immunochimique (*2.7.1*), soit par chromatographie liquide (*2.2.29*) à échange d'anions avec détection ampérométrique à pulsations.

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à la valeur minimale efficace préalablement établie, ni supérieure à 115 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

**Eau** (*2.5.12*) : au maximum 3,0 pour cent pour le composant haemophilus cryodesséché.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

**Pyrogènes** (*2.6.8*). Le vaccin satisfait à l'essai des pyrogènes. Injectez à chaque lapin, par kilogramme de masse corporelle, une quantité de vaccin équivalant à : 1 µg de PRP si la protéine vectrice est l'anatoxine diphtérique ou la protéine diphtérique CRM 197 ; 0,1 µg de PRP si la protéine vectrice est l'anatoxine tétanique ; 0,025 µg de PRP si la protéine vectrice est l'OMP.

ACTIVITÉ

**Composant diphtérique**. Evaluez l'activité du composant diphtérique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin diphtérique adsorbé (*2.7.6*).

Sauf exception justifiée et autorisée, la limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 30 UI par dose humaine unitaire.

**Composant tétanique**. Evaluez l'activité du composant tétanique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin tétanique adsorbé (*2.7.8*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 40 UI par dose humaine unitaire.

**Composant coquelucheux**. Le vaccin satisfait au titrage d'activité du vaccin coquelucheux (acellulaire) (*2.7.16*).

**Composant poliomyélitique**

*Teneur en antigène D.* Afin de contrôler la reproductibilité de la production, déterminez la teneur en antigène D pour les virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3 après désorption par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), en utilisant une préparation de référence étalonnée en Unités Pharmacopée Européenne d'antigène D. Pour chaque type, la teneur mesurée, exprimée par rapport à la teneur en antigène D indiquée sur l'étiquette, se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré. Le *vaccin poliomyélitique inactivé PBR*, étalonné en Unités Pharmacopée Européenne, est destiné à la détermination de la teneur en antigène D. L'Unité Pharmacopée Européenne et l'Unité Internationale sont équivalentes.

*Essai in vivo.* Le vaccin satisfait au titrage d'activité *in vivo* du vaccin poliomyélitique inactivé (*2.7.20*).

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- le nombre minimal d'Unités Internationales d'anatoxine diphtérique et d'anatoxine tétanique par dose humaine unitaire,
- le nom et la quantité des composants coquelucheux par dose humaine unitaire,
- la quantité nominale du virus poliomyélitique de chaque type (1, 2 et 3), exprimée en Unités Pharmacopée Européenne d'antigène D, par dose humaine unitaire,
- le substrat cellulaire utilisé pour la production du composant poliomyélitique,
- la quantité de PRP, en microgrammes, par dose humaine unitaire,
- la nature de la protéine vectrice et la quantité nominale par dose humaine unitaire,
- dans les cas appropriés, que le vaccin est destiné à la vaccination primaire des enfants et ne convient pas nécessairement à la vaccination des adultes, ni aux rappels ultérieurs,
- le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
- que le vaccin doit être agité avant l'emploi,
- que le vaccin ne doit pas être congelé,
- dans les cas appropriés, que le vaccin contient une protéine apparentée à la toxine coquelucheuse, produite par modification génétique.

**01/2008:2061**

# VACCIN DIPHTÉRIQUE, TÉTANIQUE, COQUELUCHEUX ET POLIOMYÉLITIQUE (INACTIVÉ), ADSORBÉ

## Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis et poliomyelitidis inactivatum adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin diphtérique, tétanique, coquelucheux et poliomyélitique (inactivé), adsorbé, est un vaccin combiné composé d'anatoxine diphtérique, d'anatoxine tétanique, d'une suspension inactivée de *Bordetella pertussis* et de souches appropriées des virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3, cultivés en cultures cellulaires appropriées et inactivés par une méthode validée, et d'un adsorbant minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté.

Les anatoxines sont obtenues par action du formaldéhyde sur les toxines résultant respectivement de la croissance de *Corynebacterium diphtheriae* et *Clostridium tetani*.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit être établi que le procédé de production utilisé donne de façon reproductible des vaccins comparables à celui dont l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées.

*Vaccin(s) de référence.* Sous réserve qu'ils permettent d'effectuer des titrages d'activité valables, les vaccins monocomposants de référence peuvent être utilisés pour les déterminations d'activité du vaccin combiné. Si leur utilisation n'est pas possible, du fait d'interactions entre les composants du vaccin combiné ou de différences de composition entre le vaccin de référence monocomposant et le vaccin à examiner, un lot du vaccin combiné dont l'efficacité a été démontrée lors d'essais cliniques ou un autre lot représentatif est utilisé comme vaccin de référence. Le lot représentatif doit être préparé par un procédé strictement identique à celui utilisé pour le lot soumis aux essais cliniques. Le vaccin de référence peut être stabilisé par une méthode dont l'absence d'effet sur la procédure de détermination de l'activité a été démontrée.

**Toxicité spécifique des composants diphtérique et tétanique**. Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai suivant, s'il lui était appliqué : utilisez 5 cobayes en bonne santé, pesant 250-350 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux par voie sous-cutanée une quantité équivalant à 5 fois la dose humaine unitaire indiquée sur l'étiquette. Si, dans les 42 jours qui suivent l'injection, un des animaux présente des signes ou meurt de toxémie diphtérique ou du tétanos, le vaccin ne satisfait pas à l'essai. Si plus de 1 animal meurt de causes non spécifiques, répétez l'essai une seule fois ; si plus de 1 animal meurt dans le second essai, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

*PRODUCTION DES COMPOSANTS*

La production des composants est conforme aux exigences des monographies *Vaccin diphtérique adsorbé (0443), Vaccin tétanique adsorbé (0452), Vaccin coquelucheux (adsorbé) (0161)* et *Vaccin poliomyélitique inactivé (0214).*

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé par adsorption séparée ou concomitante de quantités appropriées d'anatoxine diphtérique purifiée et d'anatoxine tétanique purifiée sur un support minéral tel que le phosphate d'aluminium hydraté ou l'hydroxyde d'aluminium, puis addition de quantités appropriées de suspension inactivée de *B. pertussis* et de quantités appropriées de récoltes monovalentes purifiées des virus poliomyélitiques de type 1,

Vaccins

2 et 3 ou d'une quantité appropriée de mélange trivalent de ces récoltes monovalentes purifiées. Des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent être ajoutés.

Un vrac final ne peut être utilisé pour la préparation du lot final que s'il satisfait aux exigences suivantes.

**Sérum-albumine bovine**. Déterminée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) sur les composants poliomyélitiques pendant la préparation du vrac final avant l'addition de l'adsorbant, la quantité de sérum-albumine bovine est telle que la teneur dans le lot final ne sera pas supérieure à 50 ng par dose humaine unitaire.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Un lot final ne peut être libéré que s'il satisfait à l'essai d'osmolalité et aux exigences spécifiées ci-après sous Identification, Essai et Activité.

Si les essais de toxicité spécifique du composant coquelucheux et de teneur en conservateur antimicrobien, et les titrages d'activité des composants diphtérique, tétanique et coquelucheux ont été réalisés avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

Si la teneur en formaldéhyde libre a été déterminée soit sur les antigènes purifiés en vrac, sur la suspension inactivée de *B. pertussis* et sur les récoltes monovalentes ou le mélange trivalent de virus polyomyélitiques, soit sur le vrac final, et s'il a été démontré que la teneur dans le lot final ne dépassera pas 0,2 g/L, l'essai du formaldéhyde libre peut ne pas être effectué sur le lot final.

Si le titrage d'activité *in vivo* du composant poliomyélitique a été effectué avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, il peut ne pas être effectué sur le lot final.

Le titrage d'activité *in vivo* du composant poliomyélitique peut ne pas être effectué s'il a été démontré sur un produit donné et pour chaque type de poliovirus, que les critères d'acceptation de la détermination de la teneur en antigène D sont tels qu'ils fournissent les mêmes résultats que le titrage d'activité *in vivo* en termes d'acceptation ou de rejet d'un lot. Cette démonstration doit comprendre des essais sur des lots à activité altérée, produits de manière expérimentale si nécessaire via un traitement par la chaleur par exemple ou d'autres moyens permettant de diminuer l'activité immunogène. En cas de modification significative du procédé de production des antigènes ou de leur formulation, l'impact sur les titrages d'activité *in vivo* et *in vitro* devra être évalué, et le besoin de revalidation devra être considéré.

**Osmolalité** (*2.2.35*). L'osmolalité du vaccin se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

IDENTIFICATION

A. L'anatoxine diphtérique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Dissolvez dans le vaccin à examiner une quantité suffisante de *citrate de sodium R* pour obtenir une solution à 100 g/L. Maintenez à 37 °C pendant environ 16 h et centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Le surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité.

B. L'anatoxine tétanique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec une antitoxine tétanique appropriée en donnant un précipité.

C. Le culot de centrifugation obtenu dans l'identification A peut être utilisé. D'autres méthodes appropriées peuvent être employées pour séparer les bactéries de l'adsorbant. Identifiez le vaccin coquelucheux adsorbé soit par agglutination des bactéries, remises en suspension à partir du culot de centrifugation, à l'aide des immunosérums spécifiques de *B. pertussis*, soit par le titrage du composant coquelucheux décrit sous Activité.

D. Il est démontré, par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) telle que la détermination de l'antigène D par immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA), que le vaccin contient les virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3.

ESSAI

**Toxicité spécifique du composant coquelucheux**. Utilisez au moins 5 souris en bonne santé, pesant 14-16 g pour le vaccin et pour la solution saline de contrôle. Les souris sont de même sexe ou mâles et femelles répartis également entre les groupes. Les animaux doivent avoir accès à la nourriture et à l'eau pendant au moins 2 h avant l'injection et durant l'essai. Injectez à chaque souris du groupe à vacciner, par voie intrapéritonéale et sous un volume de 0,5 mL, une quantité de vaccin équivalant à au moins la moitié du volume de la dose humaine unitaire. Injectez à chaque souris du groupe témoin 0,5 mL d'une solution stérile de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, contenant de préférence la même quantité de conservateur antimicrobien que celle injectée avec le vaccin. Pesez les souris immédiatement avant l'injection, puis 72 h et 7 jours après l'injection. Le vaccin satisfait à l'essai, si (a) après 72 h, la masse totale du groupe de souris vaccinées n'est pas inférieure à ce qu'elle était avant l'injection, (b) après 7 jours, le gain pondéral moyen par souris vaccinée n'est pas inférieur à 60 pour cent de celui par souris témoin et (c) au maximum 5 pour cent du nombre total de souris vaccinées meurent durant l'essai. L'essai peut être répété, et les résultats des essais combinés.

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à la valeur minimale efficace préalablement établie, ni supérieure à 115 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

ACTIVITÉ

**Composant diphtérique**. Evaluez l'activité du composant diphtérique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin diphtérique adsorbé (*2.7.6*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 30 UI par dose humaine unitaire.

**Composant tétanique**. Evaluez l'activité du composant tétanique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin tétanique adsorbé (*2.7.8*).

Si l'essai est réalisé sur cobayes, la limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 40 UI par dose humaine unitaire ; si l'essai est réalisé sur souris, la limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 60 UI par dose humaine unitaire.

**Composant coquelucheux**. Effectuez le titrage du vaccin coquelucheux (*2.7.7*).

L'activité estimée n'est pas inférieure à 4 UI par dose humaine unitaire et la limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 2 UI par dose humaine unitaire.

**Composant poliomyélitique**

*Teneur en antigène D.* Afin de contrôler la reproductibilité de la production, déterminez la teneur en antigène D pour les virus

Vaccins

poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3 après désorption par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), en utilisant une préparation de référence étalonnée en Unités Pharmacopée Européenne d'antigène D. Pour chaque type, la teneur mesurée, exprimée par rapport à la teneur en antigène D indiquée sur l'étiquette, se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré. Le *vaccin poliomyélitique inactivé PBR*, étalonné en Unités Pharmacopée Européenne, est destiné à la détermination de la teneur en antigène D. L'Unité Pharmacopée Européenne et l'Unité Internationale sont équivalentes.

*Essai in vivo*. Le vaccin satisfait au titrage d'activité *in vivo* du vaccin poliomyélitique inactivé (*2.7.20*).

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nombre minimal d'Unités Internationales d'anatoxine diphtérique et d'anatoxine tétanique par dose humaine unitaire,
– le nombre minimal d'Unités Internationales de vaccin coquelucheux par dose humaine unitaire,
– la quantité nominale du virus poliomyélitique de chaque type (1, 2 et 3), exprimée en Unités Pharmacopée Européenne d'antigène D, par dose humaine unitaire,
– le substrat cellulaire utilisé pour la production du composant poliomyélitique,
– dans les cas appropriés, que le vaccin est destiné à la vaccination primaire des enfants et ne convient pas nécessairement à la vaccination des adultes, ni aux rappels ultérieurs,
– le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
– que le vaccin doit être agité avant l'emploi,
– que le vaccin ne doit pas être congelé.

**01/2008:2066**

# VACCIN DIPHTÉRIQUE, TÉTANIQUE, COQUELUCHEUX, POLIOMYÉLITIQUE (INACTIVÉ) ET CONJUGUÉ DE L'HAEMOPHILUS TYPE b, ADSORBÉ

## Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis, poliomyelitidis inactivatum et haemophili stirpi b coniugatum adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin diphtérique, tétanique, coquelucheux, poliomyélitique (inactivé) et conjugué de l'haemophilus type b, adsorbé, est un vaccin combiné composé d'anatoxine diphtérique, d'anatoxine tétanique, d'une suspension inactivée de *Bordetella pertussis*, de souches appropriées de virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3, cultivés en cultures cellulaires appropriées et inactivées par une méthode validée, de phosphate de polyribosylribitol (PRP) couplé par liaison covalente à une protéine vectrice et d'un adsorbant minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté. Le produit se présente avec le composant haemophilus dans un récipient séparé, dont le contenu est mélangé aux autres composants immédiatement avant l'utilisation.

Les anatoxines sont obtenues par action du formaldéhyde sur les toxines résultant respectivement de la croissance de *Corynebacterium diphtheriae* et de *Clostridium tetani*.

Le PRP est un copolymère linéaire constitué d'un enchaînement d'unités 3-β-D-ribofuranosyl-(1→1)-ribitol-5-phosphate [$(C_{10}H_{19}O_{12}P)_n$], de taille moléculaire définie, obtenu à partir d'une souche appropriée d'*Haemophilus influenzae* type b. La protéine vectrice conjuguée au polyoside est capable d'induire une réponse immunitaire des lymphocytes B, dépendante des lymphocytes T, vis-à-vis du polyoside.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit être établi que le procédé de production utilisé donne de façon reproductible des vaccins comparables à celui dont l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées.

Pendant les études de développement et chaque fois qu'il est nécessaire de revalider le procédé de production, il doit être démontré par un essai chez l'animal que le vaccin est capable d'induire une réponse immunitaire des lymphocytes B, dépendante des lymphocytes T, vis-à-vis du PRP.

Pendant les études destinées à démontrer la régularité du procédé de production, les titrages d'activité des composants diphtérique, tétanique, coquelucheux et poliomyélitique sont effectués sur un nombre approprié de lots du vaccin reconstitué selon le mode d'emploi. Par la suite, les titrages d'activité peuvent être effectués sans mélange avec le composant haemophilus.

*Vaccin(s) de référence*. Sous réserve qu'ils permettent d'effectuer des titrages d'activité valables, les vaccins monocomposants de référence peuvent être utilisés pour les déterminations d'activité du vaccin combiné. Si leur utilisation n'est pas possible, du fait d'interactions entre les composants du vaccin combiné ou de différences de composition entre le vaccin de référence monocomposant et le vaccin à examiner, un lot du vaccin combiné dont l'efficacité a été démontrée lors d'essais cliniques ou un lot représentatif est utilisé comme vaccin de référence. Le lot représentatif doit être préparé par un procédé strictement identique à celui utilisé pour le lot soumis aux essais cliniques. Le vaccin de référence peut être stabilisé par une méthode dont l'absence d'effet sur la procédure de détermination de l'activité a été démontrée.

**Toxicité spécifique des composants diphtérique et tétanique**. Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai suivant, s'il lui était appliqué : utilisez 5 cobayes en bonne santé, pesant 250-350 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux par voie sous-cutanée une quantité équivalant à 5 fois la dose humaine unitaire indiquée sur l'étiquette. Si, dans les 42 jours qui suivent l'injection, un des animaux présente des signes ou meurt de toxémie diphtérique ou du tétanos, le vaccin ne satisfait pas à l'essai. Si plus de 1 animal meurt de causes non spécifiques, répétez l'essai une seule fois ; si plus de 1 animal meurt dans le second essai, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

*PRODUCTION DES COMPOSANTS*

La production des composants est conforme aux exigences des monographies *Vaccin diphtérique adsorbé (0443)*, *Vaccin tétanique adsorbé (0452)*, *Vaccin coquelucheux (adsorbé) (0161)*, *Vaccin poliomyélitique inactivé (0214)* et *Vaccin conjugué de l'haemophilus type b (1219)*.

*VRACS FINALS*

Le vrac final des composants diphtérique, tétanique, coquelucheux et poliomyélitique est préparé par adsorption séparée ou concomitante de quantités appropriées d'anatoxine diphtérique purifiée et d'anatoxine tétanique purifiée, sur un support minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté, puis addition de quantités appropriées de suspension inactivée de *B. pertussis* et de récoltes monovalentes purifiées de virus poliomyélitiques de type 1, 2 et 3 ou d'une quantité appropriée de mélange trivalent de ces récoltes monovalentes purifiées. Des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent être ajoutés.

Le vrac final du composant haemophilus est préparé par dilution, avec un diluant approprié, du conjugué en vrac à la concentration finale. Un stabilisant peut être rajouté.

Des vracs finals ne peuvent être utilisés pour la préparation du lot final que s'ils satisfont aux exigences suivantes.

**Sérum-albumine bovine**. Déterminée par une méthode immunochinique appropriée (*2.7.1*) sur les composants poliomyélitiques pendant la préparation du vrac final avant l'addition de l'adsorbant, la quantité de sérum-albumine bovine est telle que la teneur dans le lot final ne sera pas supérieure à 50 ng par dose humaine unitaire.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final du composant haemophilus est cryodesséché.

Un lot final ne peut être libéré que s'il satisfait à l'essai d'osmolalité et aux exigences spécifiées ci-après sous Identification, Essai et Activité.

Si les essais de toxicité spécifique du composant coquelucheux et de teneur en conservateur antimicrobien et les titrages d'activité des composants diphtérique, tétanique et coquelucheux ont été réalisés avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

Si la teneur en formaldéhyde libre a été déterminée soit sur les antigènes purifiés en vrac, sur la suspension inactivée de *B. pertussis* et sur les récoltes monovalentes purifiées ou le mélange trivalent de virus poliomyélitiques, soit sur le vrac final, et s'il a été démontré que la teneur du lot final ne dépassera pas 0,2 g/L, l'essai du formaldéhyde libre peut ne pas être effectué sur le lot final.

Si le titrage d'activité *in vivo* du composant poliomyélitique a été effectué avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, il peut être omis sur le lot final.

Le titrage d'activité *in vivo* du composant poliomyélitique peut ne pas être effectué s'il a été démontré sur un produit donné et pour chaque type de poliovirus, que les critères d'acceptation de la détermination de la teneur en antigène D sont tels qu'ils fournissent les mêmes résultats que le titrage d'activité *in vivo* en termes d'acceptation ou de rejet d'un lot. Cette démonstration doit comprendre des essais sur des lots à activité altérée, produits de manière expérimentale si nécessaire via un traitement par la chaleur par exemple ou d'autres moyens permettant de diminuer l'activité immunogène. En cas de modification significative du procédé de production des antigènes ou de leur formulation, l'impact sur les titrages d'activité *in vivo* et *in vitro* devra être évalué, et le besoin de revalidation devra être considéré.

**Osmolalité** (*2.2.35*). L'osmolalité du vaccin, reconstitué le cas échéant, se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**PRP libre**. La détermination est effectuée sur le composant haemophilus après élimination du conjugué, par exemple au moyen de chromatographie d'échange d'anions, d'exclusion ou hydrophobe, par ultrafiltration ou d'autres procédés validés. La teneur en PRP libre n'est pas supérieure à celle approuvée pour le produit considéré.

IDENTIFICATION

*Les identifications A, B, C et D sont effectuées sur le récipient contenant les composants diphtérique, tétanique, coquelucheux et poliomyélitique. L'identification E est effectuée sur le récipient contenant le composant haemophilus.*

A. L'anatoxine diphtérique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Dissolvez dans le vaccin à examiner une quantité suffisante de *citrate de sodium R* pour obtenir une solution à 100 g/L. Maintenez à 37 °C pendant environ 16 h et centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Le surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité.

B. L'anatoxine tétanique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec une antitoxine tétanique appropriée en donnant un précipité.

C. Le culot de centrifugation obtenu dans l'identification A peut être utilisé. D'autres méthodes appropriées peuvent être employées pour séparer les bactéries de l'adsorbant. Identifiez le vaccin coquelucheux adsorbé soit par agglutination des bactéries, remises en suspension à partir du culot de centrifugation, à l'aide des immunosérums spécifiques de *B. pertussis*, soit par le titrage du composant coquelucheux décrit sous Activité.

D. Il est démontré, par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) telle que la détermination de l'antigène D par immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA), que le vaccin contient les virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3.

E. Le composant haemophilus est identifié par une méthode immunochimique (*2.7.1*) appropriée pour le PRP.

ESSAI

*Les essais Toxicité spécifique du composant coquelucheux, Aluminium, Formaldéhyde libre, Conservateur antimicrobien et Stérilité sont effectués sur le récipient contenant les composants diphtérique, tétanique, coquelucheux et poliomyélitique ; les essais PRP, Eau, Stérilité et Pyrogènes sont effectués sur le récipient contenant le composant haemophilus.*

*Certains essais pour le composant haemophilus peuvent être effectués sur le produit cryodesséché plutôt que sur le conjugué en vrac, car la cryodessiccation peut affecter le composant à examiner.*

**Toxicité spécifique du composant coquelucheux**. Utilisez au moins 5 souris en bonne santé, pesant 14-16 g, pour le vaccin et pour la solution saline de contrôle. Les souris sont de même sexe ou mâles et femelles répartis également entre les groupes. Les animaux doivent avoir accès à la nourriture et à l'eau pendant au moins 2 h avant l'injection et durant l'essai. Injectez à chaque souris du groupe à vacciner, par voie intrapéritonéale et sous un volume de 0,5 mL, une quantité de vaccin équivalant à au moins la moitié du volume de la dose humaine unitaire. Injectez à chaque souris du groupe témoin 0,5 mL d'une solution stérile de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, contenant de préférence la même quantité de conservateur antimicrobien que celle injectée avec le vaccin. Pesez les souris immédiatement avant l'injection, puis 72 h et 7 jours après l'injection. Le vaccin satisfait à l'essai, si (a) après 72 h, la masse totale du groupe de souris vaccinées n'est pas inférieure à ce qu'elle était avant l'injection, (b) après 7 jours, le gain pondéral moyen par souris vaccinée n'est pas inférieur à 60 pour cent de celui par souris témoin et (c) au maximum 5 pour cent du nombre total de souris vaccinées meurent durant l'essai. L'essai peut être répété, et les résultats des essais combinés.

**PRP** : au minimum 80 pour cent de la quantité de PRP indiquée sur l'étiquette. La teneur en PRP est déterminée soit par dosage du ribose (*2.5.31*) ou du phosphore (*2.5.18*), soit par dosage immunochimique (*2.7.1*), soit par chromatographie liquide (*2.2.29*) à échange d'anions avec détection ampérométrique à pulsations.

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à la valeur minimale efficace préalablement établie, ni supérieure à 115 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

Vaccins

**Eau** (*2.5.12*) : au maximum 3,0 pour cent pour le composant haemophilus.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

**Pyrogènes** (*2.6.8*). Le vaccin satisfait à l'essai des pyrogènes. Injectez à chaque lapin, par kilogramme de masse corporelle, une quantité de vaccin équivalant à : 1 µg de PRP si la protéine vectrice est l'anatoxine diphtérique ou la protéine diphtérique CRM 197 ; 0,1 µg de PRP si la protéine vectrice est l'anatoxine tétanique ; 0,025 µg de PRP si la protéine vectrice est l'OMP.

ACTIVITÉ

**Composant diphtérique**. Evaluez l'activité du composant diphtérique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin diphtérique adsorbé (*2.7.6*).

La limite inférieure de confiance (*P* = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 30 UI par dose humaine unitaire.

**Composant tétanique**. Evaluez l'activité du composant tétanique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin tétanique adsorbé (*2.7.8*).

Si l'essai est réalisé sur cobayes, la limite inférieure de confiance (*P* = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 40 UI par dose humaine unitaire ; si l'essai est réalisé sur souris, la limite inférieure de confiance (*P* = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 60 UI par dose humaine unitaire.

**Composant coquelucheux**. Effectuez le titrage d'activité du vaccin coquelucheux (*2.7.7*).

L'activité estimée n'est pas inférieure à 4 UI par dose humaine unitaire et la limite inférieure de confiance (*P* = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 2 UI par dose humaine unitaire.

**Composant poliomyélitique**

*Teneur en antigène D*. Afin de contrôler la reproductibilité de la production, déterminez la teneur en antigène D pour les virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3 après désorption par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), en utilisant une préparation de référence étalonnée en Unités Pharmacopée Européenne d'antigène D. Pour chaque type, la teneur mesurée, exprimée par rapport à la teneur en antigène D indiquée sur l'étiquette, se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré. Le *vaccin poliomyélitique inactivé PBR*, étalonné en Unités Pharmacopée Européenne, est destiné à la détermination de la teneur en antigène D. L'Unité Pharmacopée Européenne et l'Unité Internationale sont équivalentes.

*Essai in vivo*. Le vaccin satisfait au titrage d'activité *in vivo* du vaccin poliomyélitique inactivé (*2.7.20*).

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nombre minimal d'Unités Internationales d'anatoxine diphtérique et d'anatoxine tétanique par dose humaine unitaire,
– le nombre minimal d'Unités Internationales de vaccin coquelucheux par dose humaine unitaire,
– la quantité nominale du virus poliomyélitique de chaque type (1, 2 et 3), exprimée en Unités Pharmacopée Européenne d'antigène D, par dose humaine unitaire,
– le substrat cellulaire utilisé pour la production du composant poliomyélitique,
– la quantité de PRP, en microgrammes, par dose humaine unitaire,
– la nature de la protéine vectrice et la quantité nominale par dose humaine unitaire,
– dans les cas appropriés, que le vaccin est destiné à la vaccination primaire des enfants et ne convient pas nécessairement à la vaccination des adultes, ni aux rappels ultérieurs,
– le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
– que le vaccin doit être agité avant l'emploi,
– que le vaccin ne doit pas être congelé.

**01/2008:1931**
**corrigé 6.0**

# VACCIN DIPHTÉRIQUE, TÉTANIQUE ET COQUELUCHEUX (ACELLULAIRE, MULTICOMPOSÉ), ADSORBÉ

## Vaccinum diphtheriae, tetani et pertussis sine cellulis ex elementis praeparatum adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin diphtérique, tétanique et coquelucheux (acellulaire, multicomposé), adsorbé est un vaccin combiné composé d'anatoxine diphtérique, d'anatoxine tétanique, de composants antigéniques, de *Bordetella pertussis* purifiés séparément et d'un adsorbant minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté.

Les anatoxines sont obtenues par action du formaldéhyde sur les toxines résultant respectivement de la croissance de *Corynebacterium diphtheriae* et *Clostridium tetani*.

Le vaccin contient soit l'anatoxine coquelucheuse soit une protéine apparentée à la toxine coquelucheuse mais dépourvue de propriétés toxiques, obtenue par l'expression d'une forme génétiquement modifiée du gène correspondant. L'anatoxine coquelucheuse est obtenue à partir de la toxine par une méthode qui la rend inoffensive mais qui maintient des propriétés immunogènes adéquates et évite la réversibilité. Le vaccin peut également contenir de l'hémagglutinine filamenteuse et de la pertactine (protéine de 69 kDa de la membrane externe) ainsi que d'autres composants définis de *B. pertussis*, par exemple les antigènes fimbria-2 et fimbria-3, ces 2 antigènes pouvant être copurifiés. La composition et les caractéristiques antigéniques reposent sur la démonstration de l'induction d'une protection et de l'absence de réactions non attendues dans le groupe cible auquel est destiné le vaccin.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit être établi que le procédé de production utilisé donne, de façon reproductible, des vaccins comparables à celui dont l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées.

**Toxicité spécifique des composants diphtérique et tétanique**. Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai suivant, s'il lui était appliqué : utilisez 5 cobayes en bonne santé, pesant 250-350 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux par voie sous-cutanée une quantité équivalant à 5 fois la dose humaine unitaire indiquée sur l'étiquette. Si, dans les 42 jours qui suivent l'injection, un des animaux présente des signes ou meurt de toxémie diphtérique ou du tétanos, le vaccin ne satisfait pas à l'essai. Si plus de 1 animal meurt de causes non spécifiques, répétez l'essai une seule fois ; si plus de 1 animal meurt dans le second essai, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

Une détermination de la teneur en endotoxines bactériennes (*2.6.14*) sur l'anatoxine diphtérique purifiée, l'anatoxine tétanique purifiée et les composants coquelucheux purifiés est effectuée afin de contrôler la procédure de purification et de limiter la teneur en endotoxines du vaccin final. Pour chaque composant, la teneur en endotoxines bactériennes est inférieure à la limite approuvée pour le vaccin individuel et, en tout cas, les teneurs sont telles que le vaccin final contient moins de 100 UI par dose humaine unitaire.

*Vaccin(s) de référence*. Sous réserve qu'ils permettent d'effectuer des titrages d'activité valables, les vaccins monocomposants de référence peuvent être utilisés pour les déterminations d'activité du vaccin combiné. Si leur utilisation n'est pas possible, du fait d'interactions entre les composants du vaccin combiné ou de différences de composition entre le

vaccin de référence monocomposant et le vaccin à examiner, un lot du vaccin combiné dont l'efficacité a été démontrée lors d'essais cliniques ou un lot représentatif est utilisé comme vaccin de référence. Le lot représentatif doit être préparé par un procédé strictement identique à celui utilisé pour le lot soumis aux essais cliniques. Le vaccin de référence peut être stabilisé par une méthode dont l'absence d'effet sur la procédure de détermination de l'activité a été démontrée.

*PRODUCTION DES COMPOSANTS*

La production des composants est conforme aux exigences des monographies *Vaccin diphtérique adsorbé (0443)*, *Vaccin tétanique adsorbé (0452)*, et *Vaccin coquelucheux (adsorbé, multicomposé, acellulaire) (1356)*.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé, par adsorption séparée ou concomitante, de quantités appropriées d'anatoxine diphtérique purifiée, d'anatoxine tétanique purifiée et de composants coquelucheux purifiés, sur un support minéral tel que de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté. Des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent être ajoutés.

Un vrac final ne peut être utilisé pour la préparation du lot final que s'il satisfait aux exigences suivantes.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la valeur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Un lot final ne peut être libéré que s'il satisfait à l'essai d'osmolalité et aux exigences spécifiées ci-après sous Identification, Essai et Activité.

Si l'essai d'absence de toxine coquelucheuse résiduelle, l'essai d'irréversibilité de l'anatoxine coquelucheuse, l'essai du formaldéhyde libre, l'essai de teneur en conservateur antimicrobien et le titrage d'activité ont été réalisés avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

Si la teneur en formaldéhyde libre a été déterminée sur les antigènes purifiés en vrac ou sur le vrac final et s'il a été démontré que la teneur dans le lot final ne dépassera pas 0,2 g/L, l'essai du formaldéhyde libre peut ne pas être effectué sur le lot final.

**Osmolalité** (*2.2.35*). L'osmolalité du vaccin se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

## IDENTIFICATION

A. L'anatoxine diphtérique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Dissolvez dans le vaccin à examiner une quantité suffisante de *citrate de sodium R* pour obtenir une solution à 100 g/L. Maintenez à 37 °C pendant environ 16 h et centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Le surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité.

B. L'anatoxine tétanique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec une antitoxine tétanique appropriée en donnant un précipité.

C. Les composants coquelucheux sont identifiés par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec des immunosérums spécifiques des composants coquelucheux du vaccin.

## ESSAI

**Absence de toxine coquelucheuse résiduelle et irréversibilité de l'anatoxine coquelucheuse**. *Cet essai n'est pas nécessaire pour les produits obtenus par modification génétique.* Utilisez 3 groupes ne comptant pas moins de 5 souris sensibles à l'histamine. Injectez au premier groupe, par voie intrapéritonéale, l'équivalent de 2 fois la dose humaine unitaire du vaccin conservé à une température de 2-8 °C. Injectez au deuxième groupe, par voie intrapéritonéale, l'équivalent de 2 fois la dose humaine unitaire du vaccin incubé à une température de 37 °C pendant 4 semaines. Injectez le diluant, par voie intrapéritonéale, au troisième groupe de souris. Après 5 jours, injectez à chaque souris, par voie intrapéritonéale, 2 mg d'histamine base dans un volume maximal de 0,5 ml et placez les animaux en observation pendant 24 h. L'essai n'est pas valable si 1 ou plusieurs souris témoins meurent suite à l'épreuve à l'histamine. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux du premier ou du deuxième groupe ne meurt suite à l'épreuve à l'histamine. Si 1 souris meurt dans le premier et/ou le deuxième groupe, l'essai peut être répété avec le même nombre ou avec un plus grand nombre de souris, en combinant les résultats des essais valables ; le vaccin satisfait à l'essai si, dans les 2 groupes recevant le vaccin, pas plus de 5 pour cent du nombre total de souris ne meurent suite à l'épreuve à l'histamine.

La sensibilité à l'histamine de la lignée de souris utilisée est vérifiée à intervalles appropriés par la méthode suivante : injectez, par voie intraveineuse, des dilutions au 1/3 d'une préparation de référence de la toxine coquelucheuse dans de la solution saline tamponnée phosphate contenant 2 g/L de gélatine, et effectuez une épreuve à l'histamine comme indiqué ci-dessus. La lignée est acceptable si plus de 50 pour cent des animaux sont sensibilisés par 50 ng de toxine coquelucheuse et si aucun des animaux témoins traités avec le diluant seul, puis soumis à l'épreuve à l'histamine ne présente de signes de sensibilisation.

La *toxine coquelucheuse PBR* convient comme toxine coquelucheuse de référence.

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Déterminez, s'il y a lieu, la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à la valeur minimale efficace préalablement établie, ni supérieure à 115 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

## ACTIVITÉ

**Composant diphtérique**. Evaluez l'activité du composant diphtérique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin diphtérique adsorbé (*2.7.6*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité mesurée n'est pas inférieure à l'activité minimale indiquée sur l'étiquette.

Sauf exception justifiée et autorisée, l'activité minimale indiquée sur l'étiquette est de 30 UI par dose humaine unitaire.

**Composant tétanique**. Evaluez l'activité du composant tétanique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin tétanique adsorbé (*2.7.8*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité mesurée n'est pas inférieure à 40 UI par dose humaine unitaire.

**Composant coquelucheux**. Le vaccin satisfait au titrage d'activité du vaccin coquelucheux (acellulaire) (*2.7.16*).

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nombre minimal d'Unités Internationales d'anatoxine diphtérique et d'anatoxine tétanique par dose humaine unitaire,

– le nom et la quantité de composants coquelucheux par dose humaine unitaire,
– dans les cas appropriés, que le vaccin est destiné à la vaccination primaire des enfants et ne convient pas nécessairement à la vaccination des adultes, ni aux rappels ultérieurs,
– le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
– que le vaccin doit être agité avant emploi,
– que le vaccin ne doit pas être congelé,
– dans les cas appropriés, que le vaccin contient une protéine apparentée à la toxine coquelucheuse, produite par modification génétique.

**01/2008:0445**

# VACCIN DIPHTÉRIQUE, TÉTANIQUE ET COQUELUCHEUX ADSORBÉ

## Vaccinum diphtheriae, tetani et pertussis adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin diphtérique, tétanique et coquelucheux adsorbé est une préparation d'anatoxine diphtérique et d'anatoxine tétanique avec un adsorbant minéral, à laquelle une suspension de *Bordetella pertussis* inactivé a été ajoutée. Les anatoxines sont obtenues par l'action du formaldéhyde sur les toxines résultant de la croissance de *Corynebacterium diphtheriae* et *Clostridium tetani*, respectivement.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

**Toxicité spécifique des composants diphtérique et tétanique**. Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai suivant, s'il lui était appliqué : utilisez 5 cobayes en bonne santé, pesant 250-350 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux par voie sous-cutanée une quantité équivalant à 5 fois la dose humaine unitaire indiquée sur l'étiquette. Si, dans les 42 jours qui suivent l'injection, un des animaux présente des signes ou meurt de toxémie diphtérique ou du tétanos, le vaccin ne satisfait pas à l'essai. Si plus de 1 animal meurt de causes non spécifiques, répétez l'essai une seule fois ; si plus de 1 animal meurt dans le second essai, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

*ANATOXINES DIPHTÉRIQUE ET TÉTANIQUE PURIFIÉES, SUSPENSION DE B. PERTUSSIS INACTIVÉ*

Les anatoxines diphtérique et tétanique purifiées et la suspension de *B. pertussis* inactivé sont préparées comme décrit dans les monographies *Vaccin diphtérique adsorbé (0443)*, *Vaccin tétanique adsorbé (0452)* et *Vaccin coquelucheux adsorbé (0161)* et satisfont aux spécifications qui y sont prescrites.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé par adsorption de quantités appropriées d'anatoxine diphtérique et d'anatoxine tétanique purifiées sur un support minéral tel que du phosphate d'aluminium hydraté ou de l'hydroxyde d'aluminium et addition subséquente d'une quantité appropriée d'une suspension de *B. pertussis* inactivé ; le mélange obtenu est approximativement isotonique au sang. La concentration de *B. pertussis* du vrac final ne doit pas dépasser celle correspondant à une opacité de 20 UI par dose humaine unitaire. Si 2 souches, ou davantage, de *B. pertussis* sont utilisées, la proportion de chacune des souches, exprimées en unités d'opacité, doit être similaire dans les lots successifs de vrac final. Des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent être ajoutés. L'activité antigénique du vaccin est altérée par certains conservateurs antimicrobiens, notamment ceux du type phénolique, qui ne doivent pas être ajoutés au vaccin.

Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable. Les récipients sont fermés de façon à prévenir toute contamination.

Seul un lot final qui est conforme à chacun des essais décrits sous Identification, Essai et Activité peut être libéré. Si les essais de toxicité spécifique du composant coquelucheux, de conservateur antimicrobien et la détermination de l'activité ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

Si la teneur en formaldéhyde libre a été déterminée sur les antigènes purifiés en vrac ou sur le vrac final et s'il a été démontré que la teneur dans le lot final ne dépassera pas 0,2 g/L, l'essai du formaldéhyde libre peut ne pas être effectué sur le lot final.

IDENTIFICATION

A. L'anatoxine diphtérique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Dissolvez dans le vaccin diphtérique, tétanique et coquelucheux adsorbé une quantité suffisante de *citrate de sodium R* pour obtenir une solution à 100 g/L. Faites incuber à 37 °C pendant environ 16 h et centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide ; gardez le culot de centrifugation pour l'identification C. Le surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité.

B. L'anatoxine tétanique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec une antitoxine tétanique appropriée en donnant un précipité.

C. Dissolvez dans le vaccin coquelucheux adsorbé une quantité suffisante de *citrate de sodium R* pour obtenir une solution à 100 g/L. Faites incuber à 37 °C pendant environ 16 h et centrifugez pour sédimenter les bactéries. D'autres méthodes appropriées peuvent être employées pour séparer les bactéries de l'adsorbant. Identifiez le vaccin coquelucheux adsorbé soit par agglutination des bactéries, remises en suspension à partir du culot de centrifugation, à l'aide des immunosérums spécifiques de *B. pertussis*, soit par l'essai décrit sous Activité.

ESSAI

**Toxicité spécifique du composant coquelucheux**. Utilisez au moins 5 souris en bonne santé, pesant 14-16 g pour le vaccin et pour la solution saline de contrôle. Les souris doivent être de même sexe ou mâles et femelles répartis également entre les groupes. Les animaux doivent avoir accès à la nourriture et à l'eau pendant 2 h au moins avant l'injection et durant l'essai. Injectez à chaque souris du groupe à vacciner, par voie intrapéritonéale et sous un volume de 0,5 mL, une quantité de vaccin équivalant à au moins la moitié de la dose humaine unitaire. Injectez à chaque souris du groupe des témoins 0,5 mL d'une solution stérile de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, contenant de préférence la même quantité de conservateur antimicrobien que celle injectée avec le vaccin. Pesez les souris immédiatement avant l'injection, puis 72 h et 7 jours après l'injection. Le vaccin satisfait à l'essai, si (a) après 72 h, la masse totale du groupe de souris vaccinées n'est pas inférieure à ce qu'elle était avant l'injection, (b) après 7 jours, le gain pondéral moyen par souris vaccinée n'est pas inférieur à 60 pour cent

Vaccins

de celui par souris témoin et (c) au maximum 5 pour cent du nombre total de souris vaccinées meurent durant l'essai. L'essai peut être répété et les résultats des essais combinés.

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à la teneur minimale qui s'est avérée efficace et elle n'est pas supérieure à 115 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin à examiner satisfait à l'essai de stérilité.

ACTIVITÉ

**Composant diphtérique**. Evaluez l'activité du composant diphtérique par un des titrages prescrits (*2.7.6*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 30 UI par dose humaine unitaire.

**Composant tétanique**. Evaluez l'activité du composant tétanique par un des titrages prescrits (*2.7.8*).

Si l'essai est effectué sur cobayes, le vaccin satisfait à l'essai si la limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 40 UI par dose humaine unitaire. Cependant, si l'essai est effectué sur souris, la limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 60 UI par dose humaine unitaire.

**Composant coquelucheux**. Effectuez le titrage du vaccin coquelucheux (*2.7.7*).

L'activité estimée n'est pas inférieure à 4 UI par dose humaine unitaire et la limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 2 UI par dose humaine unitaire.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nombre minimal d'Unités Internationales de chaque composant par dose humaine unitaire,
– dans les cas appropriés, que le vaccin est destiné à la vaccination primaire des enfants et pas nécessairement à la vaccination des adultes, ni aux rappels ultérieurs,
– le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
– que le vaccin doit être agité avant l'emploi,
– que le vaccin ne doit pas être congelé.



**01/2008:2062**

# VACCIN DIPHTÉRIQUE, TÉTANIQUE ET DE L'HÉPATITE B (ADNr), ADSORBÉ

## Vaccinum diphtheriae, tetani et hepatitidis B (ADNr) adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin diphtérique, tétanique et de l'hépatite B (ADNr), adsorbé est un vaccin combiné composé d'anatoxine diphtérique, d'anatoxine tétanique, de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) et d'un adsorbant minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté.

Les anatoxines sont obtenues par l'action du formaldéhyde sur les toxines résultant respectivement de la croissance de *Corynebacterium diphtheriae* et *Clostridium tetani*.

Le HBsAg est une protéine constitutive du virus de l'hépatite B. Il est obtenu par la méthode dite de l'ADN recombinant.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit être établi que le procédé de production utilisé donne de façon reproductible des vaccins comparables à celui dont l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées.

Une détermination de la teneur en endotoxines bactériennes (*2.6.14*) de l'anatoxine diphtérique purifiée et de l'anatoxine tétanique purifiée est effectuée afin de contrôler la procédure de purification et limiter la teneur en endotoxines du vaccin final. Dans le cas de chaque composant, la teneur en endotoxines bactériennes est inférieure à la limite approuvée pour le vaccin individuel et, en tout cas, les teneurs sont telles que le vaccin final contient moins de 100 UI par dose humaine unitaire.

*Vaccin(s) de référence*. Sous réserve qu'ils permettent d'effectuer des titrages d'activité valables, des vaccins monocomposants de référence peuvent être utilisés pour les déterminations d'activité du vaccin combiné. Si leur utilisation n'est pas possible, du fait d'interactions entre les composants du vaccin combiné ou de différences de composition entre le vaccin de référence monocomposant et le vaccin à examiner, un lot du vaccin combiné dont l'efficacité a été démontrée lors d'essais cliniques ou un autre lot représentatif est utilisé comme vaccin de référence. Le lot représentatif doit être préparé par un procédé strictement identique à celui utilisé pour le lot soumis aux essais cliniques. Le vaccin de référence peut être stabilisé par une méthode dont l'absence d'effet sur la procédure de détermination de l'activité a été démontrée.

**Toxicité spécifique des composants diphtérique et tétanique**. Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai suivant, s'il lui était appliqué : utilisez 5 cobayes en bonne santé, pesant 250-350 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux par voie sous-cutanée une quantité équivalant à 5 fois la dose humaine unitaire indiquée sur l'étiquette. Si, dans les 42 jours qui suivent l'injection, un des animaux présente des signes ou meurt de toxémie diphtérique ou du tétanos, le vaccin ne satisfait pas à l'essai. Si plus de 1 animal meurt de causes non spécifiques, répétez l'essai une seule fois ; si plus de 1 animal meurt dans le second essai, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

*PRODUCTION DES COMPOSANTS*

La production des composants est conforme aux exigences des monographies *Vaccin diphtérique adsorbé (0443)*, *Vaccin tétanique adsorbé (0452)* et *Vaccin de l'hépatite B (ADNr) (1056)*.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé par adsorption de quantités appropriées d'anatoxine diphtérique purifiée, d'anatoxine tétanique purifiée et de HBsAg, séparément ou ensemble, sur un support minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté. Des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent être ajoutés.
Un vrac final ne peut être utilisé pour la préparation du lot final que s'il satisfait aux exigences suivantes.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Un lot final ne peut être libéré que s'il satisfait à l'essai d'osmolalité et aux exigences spécifiées ci-après sous Identification, Essai et Activité.
Si l'essai de teneur en conservateur antimicrobien et les titrages d'activité des composants diphtérique et tétanique ont été réalisés avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

Si la teneur en formaldéhyde libre a été déterminée sur les antigènes purifiés en vrac ou sur le vrac final et s'il a été démontré que la teneur du lot final ne dépassera pas 0,2 g/L, l'essai du formaldéhyde libre peut ne pas être effectué sur le lot final.

Si un titrage d'activité *in vivo* du composant hépatite B est effectué avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, il peut ne pas être effectué sur le lot final.

**Osmolalité** (*2.2.35*). L'osmolalité du vaccin se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

IDENTIFICATION

A. L'anatoxine diphtérique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Dissolvez dans le vaccin à examiner une quantité suffisante de *citrate de sodium R* pour obtenir une solution à 100 g/L. Maintenez à 37 °C pendant environ 16 h et centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Le surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité.

B. L'anatoxine tétanique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec une antitoxine tétanique appropriée en donnant un précipité.

C. La détermination de l'activité ou, le cas échéant, le profil électrophorétique sert aussi à identifier le composant hépatite B du vaccin.

ESSAI

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à la valeur minimale efficace préalablement établie, ni supérieure à 115 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

**Pyrogènes** (*2.6.8*). Le vaccin satisfait à l'essai des pyrogènes. Injectez à chaque lapin l'équivalent de 1 dose humaine.

ACTIVITÉ

**Composant diphtérique**. Evaluez l'activité du composant diphtérique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin diphtérique adsorbé (*2.7.6*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 30 UI par dose humaine unitaire.

**Composant tétanique**. Evaluez l'activité du composant tétanique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin tétanique adsorbé (*2.7.8*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 40 UI par dose humaine unitaire.

**Composant hépatite B**. Le vaccin satisfait au titrage d'activité du vaccin de l'hépatite B (*2.7.15*).

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nombre minimum d'Unités Internationales d'anatoxine diphtérique et d'anatoxine tétanique par dose humaine unitaire,
– la quantité de HBsAg par dose humaine unitaire,
– le type de cellules utilisé pour la production du composant HBsAg,
– dans les cas appropriés, que le vaccin est destiné à la vaccination primaire des enfants et ne convient pas nécessairement à la vaccination des adultes, ni aux rappels ultérieurs,
– le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
– que le vaccin doit être agité avant l'emploi,
– que le vaccin ne doit pas être congelé.

**01/2008:2328**

# VACCIN DIPHTÉRIQUE, TÉTANIQUE ET POLIOMYÉLITIQUE (INACTIVÉ), ADSORBÉ, À TENEUR RÉDUITE EN ANTIGÈNE(S)

## Vaccinum diphtheriae, tetani et poliomyelitidis inactivatum, antigeni-o(-is) minutum, adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin diphtérique, tétanique et poliomyélitique (inactivé), adsorbé, à teneur réduite en antigène(s), est un vaccin combiné composé d'anatoxine diphtérique, d'anatoxine tétanique, de souches appropriées des virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3, cultivés en cultures cellulaires appropriées et inactivés par une méthode validée et d'un adsorbant minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté.

Les anatoxines sont obtenues par action du formaldéhyde sur les toxines résultant respectivement de la croissance de *Corynebacterium diphtheriae* et *Clostridium tetani*.

La teneur en anatoxine diphtérique par dose humaine unitaire est réduite comparée aux vaccins généralement utilisés pour une primovaccination ; la teneur en anatoxine tétanique peut également être réduite.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit être établi que le procédé de production utilisé donne de façon reproductible, des vaccins comparables à celui dont l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées.

*Vaccin(s) de référence*. Sous réserve qu'ils permettent d'effectuer des titrages d'activité valables, les vaccins monocomposants de référence peuvent être utilisés pour les déterminations d'activité du vaccin combiné. Si leur utilisation n'est pas possible, du fait d'interactions entre les composants du vaccin combiné ou de différences de composition entre le vaccin de référence monocomposant et le vaccin à examiner, un lot du vaccin combiné dont l'efficacité a été démontrée lors d'essais cliniques ou un lot représentatif est utilisé comme vaccin de référence. Le lot représentatif doit être préparé par un procédé strictement identique à celui utilisé pour le lot soumis aux essais cliniques. Le vaccin de référence peut être stabilisé par une méthode dont l'absence d'effet sur la procédure de détermination de l'activité a été démontrée.

**Toxicité spécifique des composants diphtérique et tétanique**. Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai suivant, s'il lui était appliqué : utilisez 5 cobayes en bonne santé, pesant 250-350 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux par voie sous-cutanée une quantité équivalant à 5 fois la dose humaine unitaire indiquée sur l'étiquette. Si, dans les 42 jours qui suivent l'injection, un des animaux présente des signes ou meurt de toxémie diphtérique ou du tétanos, le vaccin ne

Vaccins

satisfait pas à l'essai. Si plus d'un animal meurt de causes non spécifiques, répétez l'essai une seule fois ; si plus d'un animal meurt dans le second essai, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

Une détermination de la teneur en endotoxines bactériennes (*2.6.14*) sur l'anatoxine diphtérique purifiée, l'anatoxine tétanique purifiée et les récoltes monovalentes de virus poliomyélitique purifiées et inactivées est effectuée afin de contrôler la procédure de purification et de limiter la teneur en endotoxines du vaccin final. Dans le cas de chaque composant, la teneur en endotoxines bactériennes est inférieure à la limite approuvée pour le vaccin individuel et, en tout cas, les teneurs sont telles que le vaccin final contient moins de 100 UI par dose humaine unitaire.

*PRODUCTION DES COMPOSANTS*

La production des composants est conforme aux exigences des monographies *Vaccin diphtérique adsorbé (0443)*, *Vaccin tétanique adsorbé (0452)* et *Vaccin poliomyélitique inactivé (0214)*.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé par adsorption séparée ou concomitante de quantités appropriées d'anatoxine diphtérique purifiée et d'anatoxine tétanique purifiée sur un support minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium hydraté, puis addition de quantités appropriées de récoltes monovalentes purifiées des virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3 ou d'une quantité appropriée de mélange trivalent de ces récoltes monovalentes purifiées. Des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent être ajoutés.

Un vrac final ne peut être utilisé pour la préparation du lot final que s'il satisfait aux exigences suivantes.

**Sérum-albumine bovine**. Déterminée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) sur les composants poliomyélitiques après la récolte du virus et avant l'addition de l'adsorbant pour la préparation du vrac final, la quantité de sérum-albumine bovine est telle que la teneur dans le lot final ne sera pas supérieure à 50 ng par dose humaine unitaire.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable. Les récipients sont fermés de façon à prévenir toute contamination.

Un lot final ne peut être libéré que s'il satisfait à l'essai d'osmolalité et à chacune des exigences spécifiées ci-après sous Identification, Essai et Activité.

Si l'essai de conservateur antimicrobien et les titrages d'activité des composants diphtérique et tétanique ont été réalisés avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent être omis sur le lot final.

Si la teneur en formaldéhyde libre a été déterminée sur les antigènes purifiés en vrac ou sur le vrac final et s'il a été démontré que la teneur dans le lot final ne dépassera pas 0,2 g/L, l'essai du formaldéhyde libre peut ne pas être effectué sur le lot final.

Si la détermination de la teneur en antigène D ne peut pas être effectuée sur le lot final, elle est effectuée au cours de la préparation du vrac final, avant l'addition de l'absorbant.

Si le titrage d'activité *in vivo* du composant poliomyélitique a été effectué avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, il peut être omis sur le lot final.

Le titrage d'activité *in vivo* du composant poliomyélitique peut ne pas être effectué s'il a été démontré sur un vaccin donné et pour chaque type de poliovirus que les critères d'acceptation de la détermination de la teneur en antigène D sont tels qu'ils fournissent les mêmes résultats que le titrage d'activité *in vivo* en termes d'acceptation ou de rejet d'un lot. Cette démonstration doit comprendre des essais sur des lots à activité altérée, produits de manière expérimentale si nécessaire, via un traitement par la chaleur par exemple ou d'autres moyens permettant de diminuer l'activité immunogène. En cas de modification significative du procédé de production des antigènes ou de leur formulation, l'impact sur les titrages d'activité *in vivo* et *in vitro* devra être évalué, et le besoin de revalidation devra être considéré.

**Osmolalité** (*2.2.35*). L'osmolalité du vaccin se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

IDENTIFICATION

A. L'anatoxine diphtérique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Dissolvez dans le vaccin à examiner une quantité suffisante de *citrate de sodium R* pour obtenir une solution à 100 g/L. Maintenez à 37 °C pendant environ 16 h et centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Le surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité. Si un résultat satisfaisant n'est pas obtenu avec un vaccin adsorbé sur de l'hydroxyde d'aluminium, effectuez l'essai de la manière suivante. Centrifugez 15 mL du vaccin à examiner et mettez le culot en suspension dans 5 mL d'un mélange récemment préparé de 1 volume d'une solution d'*édétate de sodium R* à 56 g/L et de 49 volumes d'une solution de *phosphate disodique R* à 90 g/L. Maintenez à 37 °C pendant au moins 6 h, puis centrifugez. Le surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité.

B. L'anatoxine tétanique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Le surnageant limpide obtenu dans l'identification A réagit avec une antitoxine tétanique appropriée en donnant un précipité.

C. Il est démontré, par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) telle que la détermination de l'antigène D par immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA), que le vaccin contient les virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3.

ESSAI

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à la valeur minimale efficace préalablement établie, ni supérieure à 115 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

ACTIVITÉ

**Composant diphtérique**. Evaluez l'activité du composant diphtérique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin diphtérique adsorbé (*2.7.6*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 2 UI par dose humaine unitaire.

**Composant tétanique**. Evaluez l'activité du composant tétanique par l'une des méthodes prescrites pour le titrage du vaccin tétanique adsorbé (*2.7.8*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 20 UI par dose humaine unitaire.

**Composant poliomyélitique**

*Teneur en antigène D*. Afin de contrôler la reproductibilité de la production, déterminez la teneur en antigène D pour les virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3 après désorption par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), en utilisant

Vaccins

une préparation de référence étalonnée en Unités Pharmacopée Européenne d'antigène D. Pour chaque type, la teneur mesurée, exprimée par rapport à la teneur en antigène D indiquée sur l'étiquette, se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré. Le *vaccin poliomyélitique inactivé PBR*, étalonné en Unités Pharmacopée Européenne, est destiné à la détermination de la teneur en antigène D. L'Unité Pharmacopée Européenne et l'Unité Internationale sont équivalentes.

*Essai in vivo*. Le vaccin satisfait au titrage d'activité *in vivo* du vaccin poliomyélitique inactivé (*2.7.20*).

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- le nombre minimal d'Unités Internationales d'anatoxine diphtérique et d'anatoxine tétanique par dose humaine unitaire,
- les types de virus poliomyélitique présents dans le vaccin,
- la quantité nominale du virus poliomyélitique de chaque type (1, 2 et 3), exprimée en Unités Pharmacopée Européenne d'antigène D, par dose humaine unitaire,
- le substrat cellulaire utilisé pour la production du composant poliomyélitique,
- le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
- que le vaccin doit être agité avant l'emploi,
- que le vaccin ne doit pas être congelé.

**01/2010:2441**

# VACCIN DU PAPILLOMAVIRUS HUMAIN (ADNr)

## Vaccinum papillomaviri humani (ADNr)

DÉFINITION

Le vaccin du papillomavirus humain (ADNr) est une préparation de particules de type viral (VLP, *virus-like particles*) purifiées composées de la protéine majeure de capside (L1) d'un ou de plusieurs génotypes de papillomavirus humain (PVH). Les antigènes sont obtenus par la méthode dite de l'ADN recombinant. Le vaccin peut contenir un adjuvant approprié.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit être démontré que le vaccin suscite chez l'homme la formation d'anticorps spécifiques neutralisants et que le procédé de production donne, de façon reproductible, des vaccins de qualité comparable à celle du vaccin dont l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées. Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

Le vaccin est obtenu par l'expression des gènes viraux codant pour les protéines de capside dans des cellules de levure ou dans un système d'expression cellule d'insecte/vecteur baculoviral, la purification des VLP qui en résultent et la transformation de ces particules en une préparation immunogène. La conformité et l'innocuité des systèmes d'expression sont approuvées par l'Autorité compétente. La production du vaccin est basée sur un système de lot de semence/banque de cellules. Sauf exception justifiée et autorisée, les virus et cellules utilisées pour la production du vaccin ne doivent pas avoir subi, depuis le lot de semence primaire ou la banque de cellules primaires, un nombre de passages supérieur à celui utilisé pour préparer le vaccin dont les études cliniques ont démontré l'innocuité et l'efficacité.

*Préparation de référence*. Un lot du vaccin dont l'efficacité a été démontrée lors d'essais cliniques, ou un autre lot représentatif, est utilisé comme vaccin de référence. Le vaccin de référence est de préférence stabilisé, par une méthode dont il a été démontré qu'elle n'a aucun effet significatif sur la validité de la détermination de l'activité.

*CARACTÉRISATION*

La caractérisation des VLP est effectuée sur des lots produits lors du développement du vaccin, y compris les lots de validation du procédé. La caractérisation comprend la composition en protéine, en utilisant des techniques appropriées comme, par exemple, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) avec immunotransfert ou la spectrométrie de masse, une cartographie peptidique et/ou une analyse séquentielle terminale d'acides aminés. Les caractéristiques morphologiques des VLP et le degré d'agrégation sont déterminés pour confirmer la présence des épitopes conformationnels essentiels à l'efficacité. La caractérisation des VLP peut être effectuée par microscopie à force atomique et microscopie électronique en transmission, diffusion dynamique de la lumière, cartographie des épitopes et réactivité avec des anticorps monoclonaux neutralisants. Dans les cas appropriés, les teneurs en protéines, lipides, acides nucléiques et hydrates de carbone sont en plus mesurées. Le niveau des protéines résiduelles de la cellule hôte issues de cellules d'insectes doit répondre à des critères d'innocuité acceptables fixés par l'Autorité compétente.

*BANQUES DE CELLULES ET LOTS DE SEMENCE*

*Production dans des cellules de levure recombinantes*. Seules des banques de cellules qui ont été caractérisées de manière satisfaisante pour l'identité, la pureté microbienne, les caractéristiques de croissance et la stabilité peuvent être utilisées pour la production. L'homogénéité génétique est étudiée pour les banques de cellules primaires et de travail. Une description complète des caractéristiques biologiques de la cellule hôte et des vecteurs d'expression est fournie. Les mesures physiologiques ayant servi à promouvoir et contrôler l'expression du gène cloné dans la cellule hôte sont décrites en détails. Ces détails comprennent les marqueurs génétiques de la cellule hôte, la construction, les caractéristiques génétiques et la structure du vecteur d'expression et l'origine et l'identification du gène à cloner. La séquence nucléotidique de l'insert génétique et des segments adjacents du vecteur et la cartographie par enzymes de restriction du vecteur contenant l'insert génétique sont fournies. Des données démontrant la stabilité du système d'expression lors de la conservation de la banque de cellules de travail recombinantes jusqu'à un niveau de passage au moins égal à celui utilisé pour la production sont fournies.

*Production dans un système d'expression cellule d'insecte/baculovirus*

- *Substrat de cellules d'insecte*. Seules des banques de cellules qui ont été caractérisées de manière satisfaisante pour l'identité, la pureté, les caractéristiques de croissance, la stabilité, les agents étrangers et la tumorigénicité peuvent être utilisées pour la production. Cette caractérisation est effectuée aux étapes appropriées de la production, conformément aux chapitres *5.2.3. Substrats cellulaires utilisés pour la production de vaccins pour usage humain* et *2.6.16. Essai des agents étrangers dans les vaccins viraux pour usage humain*. Une attention particulière est portée aux virus transmissibles par des insectes, notamment ceux qui sont potentiellement pathogènes pour les humains (arbovirus, par exemple). Les agents infectieux étrangers des cellules d'insecte peuvent ne pas avoir d'effet cytopathogène. Les essais comprennent donc des techniques d'amplification des acides nucléiques et d'autres techniques comme la microscopie électronique et la coculture.
- *Baculovirus recombinant*. L'utilisation du vecteur à baculovirus recombinant est basée sur un système de lots de semence, avec un nombre défini de passages entre le virus d'origine et les lots de semence primaire et de travail, comme approuvé par les autorités compétentes. Le vecteur d'expression à baculovirus recombinant contient la

Vaccins

séquence codante de l'antigène L1 du PVH. Les segments du vecteur d'expression sont analysés à l'aide de techniques d'amplification des acides nucléiques conjointement avec d'autres essais effectués sur la protéine recombinante purifiée pour garantir la qualité et la reproductibilité des antigènes L1 du PVH exprimés. Le baculovirus recombinant utilisé pour la production de vaccins du PVH est identifié par des données historiques, comme des informations sur l'origine et l'identité du gène à cloner ainsi que sur la construction, les caractéristiques génétiques et la structure du (des) vecteur(s) d'expression baculoviraux. La stabilité génétique du vecteur d'expression est démontrée du niveau de la semence primaire de baculovirus jusqu'au niveau de passage le plus élevé utilisé en production et, de préférence, au-delà de ce niveau.

Les lots de semence de baculovirus recombinant sont préparés en grandes quantités et conservés à des températures favorables à la stabilité.

Seul un lot de semence qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la multiplication du virus.

**Identification**. Les lots de semence primaire et de travail sont identifiés par le type de PVH du gène d'origine inséré par des méthodes appropriées comme les techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*).

**Concentration en virus**. La concentration en virus des lots de semence primaire et de travail est déterminée afin de contrôler la régularité de la production.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Le lot de semence de travail satisfait aux exigences relatives aux lots de semence et aux cellules témoins. Il convient de porter une attention particulière aux *Spiroplasma* spp. et aux virus transmissibles par des insectes, notamment ceux qui sont potentiellement pathogènes pour les humains (arbovirus, par exemple).

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

Toutes les manipulations effectuées sur les banques de cellules et les lots de semence de baculovirus et des cultures cellulaires qui en sont issues sont conduites dans des conditions d'asepsie dans des locaux où ne sont pas manipulées simultanément d'autres cellules.

Dans les cas justifiés et autorisés pour la production d'un système d'expression cellule d'insecte/baculovirus, une culture intermédiaire de virus conservé, qui satisfait aux 5 essais suivants, peut être utilisée pour la multiplication du virus.

**Identification**. Chaque culture intermédiaire de virus conservé est identifiée selon le type de PVH par un titrage immunologique à l'aide d'anticorps spécifiques ou par un essai d'identité moléculaire comme ceux utilisant les techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*).

**Contamination bactérienne et fongique**. Chaque culture intermédiaire de virus conservé satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

**Concentration en virus**. La concentration en virus de chaque culture intermédiaire de baculovirus conservé est déterminée par une méthode appropriée, comme un titrage par la méthode des plages ou des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*), afin de s'assurer de la régularité de la production.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Chaque culture intermédiaire de virus conservé satisfait aux essais des agents étrangers.

**Cellules témoins**. Les cellules témoins de la culture cellulaire de production dont dérive chaque virus intermédiaire conservé satisfont à un essai d'identification et à l'essai des agents étrangers (*2.6.16*).

*Production sur des cellules de levure recombinantes.* L'identité, la pureté microbienne, la rétention du plasmide et la régularité du rendement sont déterminées à des stades appropriés de la production.

*Production dans un système d'expression cellule d'insecte/baculovirus.* Des cultures de cellules d'insecte sont infectées par le baculovirus recombinant à une multiplicité d'infection définie, selon la décision de l'Autorité compétente. Plusieurs récoltes individuelles peuvent être mélangées avant les essais. Il n'est pas ajouté d'antibiotiques au moment de la récolte, ni à aucune étape ultérieure de la fabrication.

*RÉCOLTES UNIQUES*

Seule une récolte unique ou un mélange de récoltes uniques satisfaisant aux essais ci-après peuvent être utilisés pour la préparation de l'antigène monovalent purifié.

**Identification**. Chaque récolte unique est identifiée comme le type approprié de PVH par un titrage immunologique ou par un titrage basé sur la biologie moléculaire (hybridation ou PCR, par exemple).

**Contamination bactérienne et fongique**. Dans le cas d'une production dans un système d'expression cellule d'insecte/baculovirus, la récolte unique satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*). En cas de production sur cellules de levure, la récolte unique fait l'objet d'un essai de pureté de la culture par ensemencement d'un milieu approprié pour garantir la seule multiplication de l'organisme hôte.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Dans le cas d'une production dans un système d'expression cellule d'insecte/baculovirus, la récolte unique satisfait à l'essai des agents étrangers. Comme mentionné précédemment pour les banques de cellules et les lots de semence, il convient de porter une attention particulière aux virus transmissibles par les insectes.

**Cellules témoins**. Dans le cas d'une production dans un système d'expression cellule d'insecte/baculovirus, les cellules témoins satisfont à un essai d'identification et à l'essai des agents étrangers (*2.6.16*). Comme mentionné précédemment pour les banques de cellules et les lots de semence, il convient de porter une attention particulière aux virus transmissibles par les insectes.

*ANTIGÈNE MONOVALENT PURIFIÉ*

Les récoltes sont purifiées selon des méthodes validées. Si un substrat d'un système d'expression cellule d'insecte/baculovirus est utilisé, le procédé de production est validé pour sa capacité à supprimer (par élimination et/ou inactivation) les virus étrangers et les baculovirus recombinants.
Seul un antigène monovalent purifié qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la préparation du vrac final.
En accord avec l'Autorité compétente, un ou plusieurs essais mentionnés ci-après peuvent ne pas être effectués s'ils le sont sur l'antigène monovalent adsorbé.

**Protéines totales**. La teneur en protéines totales est déterminée par une méthode validée. La teneur se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Teneur en antigène et identification**. La quantité et la spécificité de chaque type d'antigène sont déterminées par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), par exemple un dosage radioimmunologique (RIA), un dosage par immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA), par immunoempreinte (de préférence avec un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope protecteur) ou par un essai de diffusion radiale simple. Le rapport antigène/protéines peut être déterminé et se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Pureté antigénique**. La pureté de chaque antigène monovalent purifié est déterminée par une méthode appropriée, comme une électrophorèse SDS-PAGE avec quantification par densitométrie, en utilisant une limite de détection de 1 pour cent des impuretés ou mieux par rapport aux protéines totales. Une préparation de référence est utilisée pour valider chaque essai. La pureté de la protéine est calculée par le rapport pour cent entre les bandes correspondant à la protéine L1 et les

Vaccins

bandes correspondant aux protéines totales. Pour les génotypes inclus dans le vaccin, la valeur calculée pour la pureté se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Pourcentage de monomère L1 intact**. Le titrage de la pureté antigénique permet également d'évaluer l'intégrité du monomère L1. Le pourcentage de monomère L1 intact est le rapport pour cent entre le monomère L1 intact et les protéines totales.

**Dimensions et structure des VLP**. Les dimensions et la structure des VLP sont établies et contrôlées par une méthode appropriée, comme la diffusion dynamique de la lumière. Les dimensions se situent dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Composition**. Dans les cas appropriés, les teneurs en protéines, lipides, acides nucléiques et hydrates de carbone sont déterminées.

**ADN résiduel de la cellule hôte et du vecteur** : au maximum 10 ng d'ADN dans la quantité d'antigène purifié équivalant à une dose humaine unitaire de vaccin, déterminé par des méthodes sensibles, pour chaque antigène monovalent purifié.

**Protéines résiduelles de la cellule hôte**. Des essais concernant les protéines résiduelles de la cellule hôte sont effectués. La teneur se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Produits chimiques utilisés pour la fragmentation et la purification**. Des essais concernant les substances chimiques utilisées pour la purification et d'autres étapes de la production sont effectués, les limites étant approuvées pour le produit considéré.

**Stérilité** (*2.6.1*). Chaque antigène monovalent purifié satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

*ANTIGÈNE MONOVALENT ADSORBÉ*

Les antigènes monovalents purifiés peuvent être adsorbés sur un support minéral, comme un sel d'aluminium.
Seul un antigène monovalent adsorbé qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la préparation du vrac final.

**Stérilité** (*2.6.1*). Chaque antigène monovalent adsorbé satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*). Chaque antigène monovalent adsorbé est soumis à un essai des endotoxines bactériennes. La teneur se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Teneur en antigène et identification**. Chaque type d'antigène est identifié par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), par exemple un dosage radioimmunologique (RIA), un dosage par immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA), par immunoempreinte (de préférence avec un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope protecteur) ou par un essai de diffusion radiale simple. Le rapport antigène/protéines est déterminé.

**Concentration en support minéral**. Dans les cas appropriés, la teneur en support minéral est déterminée pour chaque antigène monovalent adsorbé. La teneur se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé directement à partir de chaque type d'antigène monovalent purifié de PVH ou de chaque type d'antigène monovalent purifié adsorbé de PVH. Un conservateur antimicrobien et un adjuvant comme le lipide 3-*O*-désacyl-4′-monophosphoryle A peuvent être ajoutés.
Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la préparation du lot final.

**Conservateur antimicrobien**. Déterminez, s'il y a lieu, la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Seul un lot final qui satisfait à chacun des essais décrits sous Identification, Essai et Activité peut être libéré. Si l'essai de teneur en conservateur antimicrobien (dans les cas appropriés) a été réalisé avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, il peut ne pas être effectué sur le lot final. Si un titrage d'activité *in vivo* a été réalisé avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, il peut ne pas être effectué sur le lot final.

**Adjuvants**. Si le vaccin contient un adjuvant, sa teneur est déterminée et il est démontré qu'elle est dans les limites acceptables par rapport à la teneur attendue. La teneur en lipide 3-*O*-désacyl-4′-monophosphoryle A peut être déterminée par une méthode appropriée comme, par exemple, la chromatographie en phase gazeuse.

**Degré d'adsorption**. Le degré d'adsorption de chaque antigène et, dans les cas appropriés, du lipide 3-*O*-désacyl-4′-monophosphoryle A est évalué.

## IDENTIFICATION

Il est démontré, par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), que le vaccin contient les différents types d'antigène PVH. Le titrage d'activité *in vitro* peut également servir à identifier le vaccin.

## ESSAI

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté sont utilisés comme adsorbants.

**Conservateur antimicrobien**. Déterminez, dans les cas appropriés, la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. Cette teneur n'est pas inférieure à la valeur établie comme seuil d'efficacité ni supérieure à 115 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : au maximum 5 UI par dose humaine unitaire. Si l'adjuvant empêche la détermination des endotoxines, effectuez un essai approprié en cours de production.

## DOSAGE

Le titrage d'activité est effectué par un essai *in vivo* ou un essai *in vitro* dont les critères d'acceptation ont été établis par des études de corrélation avec un essai *in vivo*.

**Essai *in vivo***. Un titrage d'activité *in vivo* approprié consiste en une injection d'au minimum 3 dilutions du vaccin à examiner et d'une préparation de référence du vaccin, en utilisant pour chaque dilution un groupe de souris femelles d'une souche appropriée et en nombre approprié. Le vaccin est dilué dans une solution de *chlorure de sodium R* contenant l'adjuvant à base d'aluminium utilisé pour la production du vaccin. Les souris sont âgées de 6-8 semaines au moment de l'injection, et il est injecté à chacune un volume de 0,5 mL. Un échantillon de sérum de préimmunisation est prélevé avant l'inoculation, et un échantillon final de sérum est prélevé à un moment défini, entre les 21[e] et 28[e] jours. Effectuez sur chaque sérum individuel un dosage des anticorps neutralisants spécifiques dirigés contre chaque type de PVH, par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

L'essai n'est valable que si :

– pour le vaccin à examiner comme pour le vaccin de référence, la $DE_{50}$ se situe entre la plus petite et la plus grande des doses administrées aux animaux,
– l'analyse statistique ne révèle aucune déviation de la linéarité ni du parallélisme,
– les limites de confiance ($P$ = 0,95) se situent dans les limites approuvées pour le produit considéré.

Vaccins

**Essai *in vitro***. Effectuez une détermination immunochimique (*2.7.1*) de la teneur en antigène de chaque génotype. Un dosage par immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA) ou un dosage radioimmunologique (RIA) utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques aux épitopes de la protéine L1 qui produisent un effet protecteur, se sont avérés appropriés. L'essai comporte un nombre approprié de dilutions du vaccin à examiner et de la préparation de référence du fabricant, et les données sont analysées selon un modèle approprié. Pour chaque type, la teneur en antigène se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- la quantité de protéines L1 et le génotype du PVH contenu dans le vaccin,
- le substrat cellulaire utilisé pour la production du vaccin,
- le nom et la quantité de l'adjuvant utilisé,
- que le vaccin ne doit pas être congelé.

**01/2008:0869**

# VACCIN GRIPPAL INACTIVÉ (ANTIGÈNE DE SURFACE)

## Vaccinum influenzae inactivatum ex corticis antigeniis praeparatum

DÉFINITION

Le vaccin grippal inactivé (antigène de surface) est une suspension stérile, d'une ou de plusieurs souches de virus grippal des types A et B, ou d'un mélange de souches des 2 types cultivés individuellement dans des oeufs embryonnés de poules, inactivés et traités de façon à obtenir une préparation constituée principalement d'antigènes hémagglutinine et neuraminidase sans altérer les propriétés antigéniques de ces antigènes. La teneur déclarée en antigène hémagglutinine pour chaque souche est de 15 µg par dose, sauf si des données cliniques démontrent qu'une autre quantité peut être utilisée. Le vaccin peut contenir un adjuvant.

PRODUCTION

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

*CHOIX DE LA SOUCHE VACCINALE*

L'Organisation Mondiale de la Santé procède à une étude annuelle de la situation épidémiologique mondiale et, si nécessaire, recommande les souches correspondant à cette situation épidémiologique.

De telles souches sont utilisées conformément à la réglementation des Etats signataires de la Convention relative à l'Elaboration d'une Pharmacopée Européenne. Il est maintenant de pratique commune d'utiliser des souches réassorties qui donnent une forte production d'antigènes de surface appropriés. L'origine et l'historique des passages des souches virales devront être approuvées par l'Autorité compétente.

*SUBSTRAT POUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS*

La semence de virus grippal destinée à être utilisée dans la production du vaccin est cultivée dans des oeufs embryonnés provenant d'élevages de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*) ou dans des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*), par exemple des fibroblastes d'embryons de poulet ou des cellules rénales de poussin provenant d'élevages de poulets EOPS (*5.2.2*). Pour la production, le virus de chaque souche est cultivé dans la cavité allantoïdienne d'oeufs embryonnés de poules provenant d'élevages reconnus sains.

*LOT DE SEMENCE*

La production du vaccin est basée sur un système de lot de semence. Les lots de semence de travail ne doivent pas avoir subi plus de 15 passages à partir du virus réassorti approuvé ou de l'isolat de virus approuvé. Le vaccin final représente un passage à partir du lot de semence de travail. Les antigènes hémagglutinine et neuraminidase de chaque lot de semence sont identifiés comme ceux du virus grippal de la souche appropriée par des méthodes convenables.

Seul un lot de semence de travail qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du mélange de récoltes monovalent.

**Contamination bactérienne et fongique**. Effectuez l'essai de stérilité (*2.6.1*), en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Mycoplasmes** (*2.6.7*). Effectuez l'essai des mycoplasmes en utilisant 10 mL.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

Un agent antimicrobien peut être ajouté à l'inoculum. Après incubation à température contrôlée, les liquides allantoïdiens sont recueillis et réunis pour former le mélange de récoltes monovalent. Un agent antimicrobien peut être ajouté au moment de la récolte. Ni la pénicilline, ni la streptomycine ne sont utilisées à aucun stade de la production.

*MÉLANGE DE RÉCOLTES MONOVALENT*

Afin de limiter la possibilité de contamination, l'inactivation est commencée dès que possible après la préparation. Le virus est inactivé par une méthode qui s'est avérée d'une efficacité constante sur 3 lots consécutifs entre les mains du fabricant. Il devra également être démontré que le procédé d'inactivation est capable d'inactiver le virus grippal sans détruire son pouvoir antigène ; le procédé ne devrait causer qu'une altération minimale des antigènes hémagglutinine et neuraminidase. Le procédé d'inactivation devra aussi être capable d'inactiver les virus de la leucose aviaire et les mycoplasmes. Si le mélange de virus est conservé après inactivation, il sera maintenu à une température de 5 ± 3 °C. Si une solution de formaldéhyde est utilisée, la concentration ne doit dépasser à aucun moment de l'inactivation 0,2 g/L de $CH_2O$ ; si la bêtapropiolactone est utilisée, la concentration ne doit dépasser à aucun moment de l'inactivation 0,1 pour cent *V/V*.

Le mélange de récoltes monovalent est concentré et purifié par centrifugation à grande vitesse ou toute autre méthode appropriée avant ou après l'inactivation. Les particules virales sont fragmentées par des procédés approuvés pour obtenir les sous-unités constitutives du virus, puis purifiées afin que le produit obtenu soit principalement de l'hémagglutinine et de la neuraminidase.

Seul un mélange de récoltes monovalent qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du vrac final.

**Antigène hémagglutinine**. Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par un essai d'immunodiffusion (*2.7.1*). L'essai se fera à 20-25 °C par comparaison avec une préparation d'antigène d'hémagglutinine de référence[(1)] ou une préparation d'antigène étalonnée par rapport à elle.

**Antigène neuraminidase**. La présence et le type de l'antigène neuraminidase sont confirmés par des essais appropriés, enzymatiques ou immunologiques ; l'essai sera effectué sur les 3 premiers mélanges de récoltes monovalents obtenus à partir de chaque lot de semence de travail.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Virus infectieux résiduel**. Effectuez l'essai tel qu'il est décrit sous Essai.

(1) Les antigènes hémagglutinine de référence sont disponibles auprès du NIBSC, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Grande-Bretagne.

**Pureté**. La pureté du mélange de récoltes monovalent est déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou par toute autre technique appropriée. Le mélange de récoltes monovalent est constitué principalement d'hémagglutinine et de neuraminidase.

**Substances chimiques utilisées pour fragmenter et purifier le virus**. Des essais pour les substances chimiques utilisées pour fragmenter et purifier le virus sont effectués sur le mélange de récoltes monovalent, les limites étant approuvées par l'Autorité compétente.

*VRAC FINAL*

Des quantités appropriées des mélanges de récoltes monovalents sont réunies pour former le vrac final. Un adjuvant peut être ajouté.

Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique convenable. La teneur n'est ni inférieure à 85 pour cent, ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable. Les récipients sont fermés de façon à prévenir toute contamination.

Seul un lot final qui satisfait à chacun des essais décrits ci-après sous Essai et Dosage peut être libéré.

Si l'essai du virus infectieux résiduel a été effectué avec des résultats satisfaisants sur chaque produit monovalent en vrac et si les essais de formaldéhyde libre, d'ovalbumine et de protéines totales ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

Si les teneurs en ovalbumine et en formaldéhyde ne peuvent être déterminées sur le lot final en raison de l'interférence avec l'adjuvant, elles sont déterminées sur le mélange de récoltes monovalent avec des limites d'acceptation permettant d'assurer que les limites pour le lot final ne seront pas dépassées.

Si le vaccin contient un adjuvant, des essais appropriés pour l'identification et tout autre critère de qualité approprié sont effectués sur le lot final. Ces essais peuvent inclure des analyses chimiques et physiques, une détermination de la granulométrie des particules et une détermination du nombre de particules par unité de volume.

## IDENTIFICATION

La détermination de la teneur en antigène hémagglutinine sert également à confirmer la spécificité antigénique du produit.

## ESSAI

**Virus infectieux résiduel**. Inoculez dans la cavité allantoïdienne de chacun de 10 oeufs embryonnés 0,2 mL de vaccin ; faites incuber à 33-37 °C pendant 3 jours. L'essai n'est valable que si les embryons d'au moins 8 oeufs sur 10 survivent. Recueillez dans chaque embryon survivant 0,5 mL de liquide allantoïdien et mélangez les liquides. Inoculez 0,2 mL de liquide recueilli dans un autre groupe de 10 oeufs embryonnés et faites incuber à 33-37 °C pendant 3 jours. L'essai n'est valable que si les embryons d'au moins 8 oeufs sur 10 survivent. Recueillez dans chaque embryon environ 0,1 mL de liquide allantoïdien et effectuez sur chaque liquide individuel une recherche de virus vivant par un essai d'hémagglutination. S'il se produit une hémagglutination lors de l'essai, effectuez à partir du liquide concerné un passage sur oeufs supplémentaire et un essai d'hémagglutination ; aucune hémagglutination ne se produit.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique convenable. La teneur n'est ni inférieure à la teneur minimale qui a été démontrée efficace, ni supérieure à 115 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L, dans les cas appropriés.

**Ovalbumine**. La teneur en ovalbumine n'est pas supérieure à celle indiquée sur l'étiquette et dans tous les cas n'est pas supérieure à 1 µg par dose humaine, déterminée par une méthode immunochimique (*2.7.1*) appropriée, en utilisant une préparation de référence d'ovalbumine appropriée.

**Protéines totales**. La teneur en protéines totales n'est pas supérieure à 40 µg de protéines totales, autres que l'hémagglutinine, par souche de virus et par dose humaine ni à plus de 120 µg de protéines totales, autres que l'hémagglutinine, par dose humaine.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 100 UI par dose humaine.

## ACTIVITÉ

Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par un essai d'immunodiffusion (*2.7.1*). Effectuez l'essai à 20-25 °C par comparaison avec une préparation d'antigène d'hémagglutinine de référence*(1)* ou une préparation d'antigène étalonnée par rapport à elle. Les limites de confiance ($P$ = 0,95) ne sont pas inférieures à 80 pour cent ni supérieures à 125 pour cent de la teneur estimée en antigène hemagglutinine. Pour chaque souche, la limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) n'est pas inférieure à 80 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- que le vaccin a été préparé sur oeufs,
- la souche ou les souches de virus grippal utilisées dans la préparation du vaccin,
- la méthode d'inactivation,
- la teneur en hémagglutinine en microgrammes par souche de virus et par dose,
- la teneur maximale en ovalbumine,
- la saison durant laquelle le vaccin est destiné à la protection,
- dans les cas appropriés, le nom et la quantité d'adjuvant utilisé.



**04/2009:2149**

# VACCIN GRIPPAL INACTIVÉ (ANTIGÈNE DE SURFACE, PRÉPARÉ SUR CULTURES CELLULAIRES)

## Vaccinum influenzae inactivatum ex cellulis corticisque antigeniis praeparatum

## DÉFINITION

Le vaccin grippal inactivé (antigène de surface, préparé sur cultures cellulaires) est une suspension stérile, aqueuse, d'une ou de plusieurs souches de virus grippal des types A et B, ou d'un mélange de souches des 2 types cultivés individuellement sur des cultures cellulaires, inactivés et traités de façon à obtenir une préparation constituée principalement d'antigènes hémagglutinine et neuraminidase, sans altérer les propriétés antigéniques adéquates de ces antigènes. La teneur déclarée en antigène hémagglutinine pour chaque souche présente dans le vaccin est de 15 µg par dose, sauf si des données cliniques démontrent qu'une autre quantité peut être utilisée. Le vaccin se présente sous la forme d'un liquide limpide ou légèrement opalescent. Le vaccin peut contenir un adjuvant. Cette monographie s'applique à des vaccins produits sur lignées cellulaires diploïdes ou continues obtenues à partir de mammifères.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

La production du vaccin est basée sur un système de lot de semence virale et un système de banque cellulaire. Il doit être démontré que le procédé de production utilisé donne de façon constante des vaccins satisfaisant aux exigences de pouvoir immunogène, d'innocuité et de stabilité.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer une réduction appropriée de la teneur en protéines résiduelles issues de la cellule hôte. Avec l'accord de l'Autorité compétente et pour chaque produit spécifique, les contrôles de routine de la teneur en protéines résiduelles issues de la cellule hôte peuvent être omis sur la base des résultats des études de validation du produit. Des indications complémentaires sur les principes de telles études de validation sont données par exemple dans la monographie *Produits obtenus par la méthode dite de l'ADN recombinant (0784)* en particulier dans les sections « Validation du processus de production - Extraction et purification » et « Régularité de la production - Protéines issues de la cellule hôte ».

*CHOIX DE LA SOUCHE VACCINALE*

L'Organisation Mondiale de la Santé procède à une étude annuelle de la situation épidémiologique mondiale et, si nécessaire, recommande les souches correspondant à cette situation épidémiologique.

Ces souches sont utilisées conformément à la réglementation des Etats signataires de la Convention relative à l'Elaboration d'une Pharmacopée Européenne. Il est maintenant de pratique courante d'utiliser des souches réassorties qui donnent une forte production d'antigènes de surface appropriés. L'origine et l'historique des passages des souches virales devront être approuvées par l'Autorité compétente.

*SUBSTRAT POUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS*

Le virus grippal destiné à la préparation des lots de semence est cultivé dans des oeufs embryonnés provenant d'élevages de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*) ou dans des cultures cellulaires appropriées (*5.2.3*), par exemple des fibroblastes d'embryons de poulet ou des cellules rénales de poussin provenant d'élevages de poulets EOPS (*5.2.2*), ou sur une lignée cellulaire diploïde ou continue. Le passage final pour l'établissement du lot de semence de travail est préparé sur la lignée cellulaire utilisée pour la production de routine. Pour cette production, le virus de chaque souche est cultivé sur une lignée cellulaire diploïde ou continue (*5.2.3*).

*LOT DE SEMENCE*

La production du vaccin est basée sur un système de lot de semence. Chacune des souches de virus grippal utilisées sera identifiée par des données historiques comprenant des informations sur son origine et sa manipulation ultérieure. Les lots de semence de travail ne doivent pas avoir subi plus de 15 passages à partir du virus réassorti approuvé ou de l'isolat de virus approuvé. Le vaccin final représente 1 passage à partir du lot de semence de travail.

Seul un lot de semence qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la multiplication du virus.

**Identification**. Les antigènes hémagglutinine et neuraminidase de chaque lot de semence primaire et de travail sont identifiés par des méthodes convenables comme étant ceux du virus grippal de la souche appropriée.

**Concentration en virus**. La concentration en virus de chaque lot de semence de travail est déterminée. Dans les cas appropriés, la concentration en virus de chaque lot de semence primaire est déterminée.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Les lots de semence de travail satisfont aux exigences définies pour les lots de semence. Il est admis que, du fait des modifications saisonnières d'une ou de plusieurs souches de vaccin grippal, la recherche, dans le respect des délais, d'agents étrangers sur les semences de virus conformément au chapitre général *2.6.16* peut poser problème (durée des essais *in vivo*, disponibilité en temps voulu d'immunosérums neutralisants spécifiques, par exemple). En accord avec l'Autorité compétente et en tenant compte de l'évaluation du risque, des dosages rapides (PCR multiplex, par exemple) peuvent être utilisés comme alternatives au chapitre général *2.6.16* après validation appropriée.

L'évaluation du risque et la validation comprennent des considérations plus générales sur les contaminants potentiels des isolats de virus, la sensibilité du substrat cellulaire vis-à-vis de ces virus et la capacité du procédé de production à éliminer ou inactiver les virus ; la validation doit également inclure des données comparatives sur les contrôles des lots de semence selon le chapitre général *2.6.16* et selon les méthodes de dosage rapide proposées. Il doit être démontré, par une validation analytique appropriée, que chaque essai appliqué par PCR ou par une autre technique d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) est approprié pour l'usage envisagé. L'évaluation du risque est réexaminée en cas d'informations nouvelles sur les contaminants viraux potentiels et la justification du choix du panel d'agents étrangers recherchés par PCR est fournie à l'Autorité compétente dans le cadre de la mise à jour annuelle. Cette mise à jour comprend également des aspects spécifiques à la souche vaccinale, comme des effets inhibiteurs spécifiques de la PCR.

Si un agent est décelé sur une semence de virus et qu'il est établi que les cellules de mammifère utilisées pour la production sont sensibles à cet agent, la semence de virus n'est pas utilisée pour la production du vaccin.

Si un agent est décelé sur une semence de virus et que les cellules de mammifère n'y sont pas sensibles, effectuez la validation du procédé de production pour démontrer l'élimination ou l'inactivation de l'agent. Si l'élimination ou l'inactivation ne peuvent être établies, la récolte monovalente inactivée est contrôlée pour démontrer l'absence de tout contaminant identifié sur la semence de virus.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE UNIQUE*

Toutes les manipulations effectuées sur la banque de cellules et les cultures cellulaires dérivées sont conduites dans des conditions d'asepsie, dans un local où d'autres cellules ne sont pas manipulées en même temps. Un sérum animal approuvé (à l'exclusion du sérum humain) peut être utilisé dans les milieux de culture cellulaire. L'absence d'agents étrangers dans le sérum et la trypsine utilisés pour la préparation des suspensions cellulaires ou des milieux est vérifiée. Les milieux de culture cellulaire peuvent contenir un indicateur de pH, tel que le rouge de phénol, et des antibiotiques à la concentration correspondant au seuil minimal d'efficacité. Un volume d'au moins 500 mL des cultures cellulaires utilisées pour la production du vaccin est réservé comme culture de cellules non infectées (cellules témoins).

Seule une récolte unique qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée pour la préparation du vaccin.

**Identification**. La détermination de la teneur en antigène sert également à identifier la récolte unique.

**Contamination bactérienne et fongique**. Effectuez l'essai de stérilité (*2.6.1*) en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Mycoplasmes** (*2.6.7*). Effectuez l'essai des mycoplasmes en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Cellules témoins**. Les cellules témoins de la culture cellulaire de production satisfont à un essai d'identification et aux exigences concernant les agents étrangers (*2.6.16*).

**Antigène hémagglutinine**. Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

*RÉCOLTE MONOVALENTE INACTIVÉE ET PURIFIÉE*

La récolte, qui peut être un mélange de plusieurs récoltes uniques de la même souche, est inactivée et purifiée par des méthodes validées. La récolte monovalente est concentrée et purifiée par centrifugation à grande vitesse ou toute autre méthode appropriée avant ou après l'inactivation. Le virus est inactivé par une méthode qui s'est avérée d'une efficacité constante sur 3 lots consécutifs chez le fabricant. Il devra également être démontré que le procédé d'inactivation est capable d'inactiver le virus grippal sans détruire son pouvoir antigène ; le procédé est choisi de manière à causer une altération minimale des antigènes hémagglutinine et neuraminidase.
Les particules virales sont fragmentées par des procédés approuvés pour obtenir les sous-unités constitutives du virus, puis purifiées afin que le produit obtenu soit principalement de l'hémagglutinine et de la neuraminidase.

Si la production est effectuée au moyen de lignées cellulaires continues, il doit avoir été validé que le procédé de purification employé réduit régulièrement l'ADN issu de la cellule hôte à des teneurs appropriées.

Seule une récolte monovalente inactivée purifiée qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée pour la préparation du vrac final.

**Antigène hémagglutinine**. Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

**Rapport entre la teneur en antigène et la teneur en protéines totales**. Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par un essai d'immunodiffusion approprié, et la teneur en protéines totales par une méthode validée. Le rapport entre la teneur en antigène hémagglutinine et la teneur en protéines totales doit se situer dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Antigène neuraminidase**. La présence et le type d'antigène neuraminidase sont confirmés par des essais appropriés, enzymatiques ou immunologiques ; l'essai est effectué sur les 3 premiers mélanges de récoltes monovalents obtenus à partir de chaque lot de semence de travail.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Virus infectieux résiduel**. Effectuez l'essai tel qu'il est décrit sous Essai.

**Pureté**. La pureté de la récolte monovalente est déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou par toute autre technique appropriée. La récolte monovalente est principalement constituée d'hémagglutinine et de neuraminidase.

**Substances chimiques utilisées pour fragmenter et purifier le virus**. Des essais pour les substances chimiques utilisées pour fragmenter et purifier le virus sont effectués sur la récolte monovalente, sauf si la validation du procédé a démontré leur élimination totale. La teneur ne doit pas dépasser celle approuvée par l'Autorité compétente pour le produit considéré.

*VRAC FINAL*

Des quantités appropriées des mélanges de récoltes monovalentes inactivées et purifiées sont réunies pour former le vrac final. Un adjuvant peut être ajouté.
Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**ADN résiduel de la cellule hôte**. Si le virus est multiplié sur une lignée cellulaire continue, la teneur en ADN résiduel de la cellule hôte, déterminée par une méthode appropriée, n'est pas supérieure à 10 ng dans l'équivalent d'une dose humaine unitaire.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement en récipients stériles à fermeture inviolable. Les récipients sont fermés de façon à prévenir toute contamination.
Seul un lot final qui satisfait à chacun des essais décrits ci-après sous Essai et Dosage peut être libéré. Si l'essai du virus infectieux résiduel a été effectué avec des résultats satisfaisants sur chaque produit monovalent inactivé et purifié en vrac et si les essais du formaldéhyde libre, de la sérum-albumine bovine et des protéines totales ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

Si le vaccin contient un adjuvant, des essais appropriés pour l'identification et tout autre critère de qualité approprié sont effectués sur le lot final. Ces essais peuvent comprendre des analyses chimiques et physiques, une détermination de la granulométrie des particules et une détermination du nombre de particules par unité de volume.

## IDENTIFICATION

La détermination de la teneur en antigène hémagglutinine sous Dosage sert également à confirmer la spécificité antigénique du produit.

## ESSAI

**Virus infectieux résiduel**. Procédez à un essai d'amplification en virus grippal infectieux résiduel. Inoculez au moins 0,2 mL de vaccin à des cultures cellulaires du même type que celles utilisées pour la production du vaccin ; faites incuber pendant au moins 4 jours à 37 °C. Inoculez au moins 0,2 mL du milieu de culture cellulaire récolté à une nouvelle culture cellulaire semi-confluente et faites incuber comme précédemment. A la fin de la période d'incubation, effectuez une recherche de virus vivant par un essai d'hémagglutination. S'il se produit une hémagglutination lors de l'essai, effectuez à partir du liquide concerné un passage supplémentaire sur cultures cellulaires et un essai d'hémagglutination ; aucune hémagglutination ne se produit.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à la teneur minimale qui a été démontrée efficace et elle n'est pas supérieure à 115 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L, dans les cas appropriés.

**Sérum-albumine bovine** : au maximum 50 ng par dose humaine, déterminé par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

**Protéines totales** : au maximum 40 µg de protéines, autres que l'hémagglutinine, par souche de virus et par dose humaine.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 25 UI par dose humaine.

## ACTIVITÉ

Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par un essai d'immunodiffusion (*2.7.1*). Effectuez l'essai à 20-25 °C par comparaison avec une préparation d'antigène hémagglutinine de référence[(2)] ou une préparation d'antigène étalonnée par rapport à elle. Les limites de confiance ($P$ = 0,95) ne sont pas inférieures à 80 pour cent ni supérieures à 125 pour cent de

(2) Les antigènes hémagglutinine de référence sont disponibles auprès du National Institute for Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Grande-Bretagne.

Vaccins

la valeur estimée. Pour chaque souche, la limite inférieure de confiance (*P* = 0,95) n'est pas inférieure à 80 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– l'origine biologique de la culture cellulaire qui a servi à la préparation du vaccin,
– la souche ou les souches de virus grippal utilisées dans la préparation du vaccin,
– la méthode d'inactivation,
– la teneur en antigène hémagglutinine en microgrammes par souche de virus et par dose,
– la saison durant laquelle le vaccin est destiné à la protection,
– dans les cas appropriés, le nom et la quantité d'adjuvant utilisé.

**01/2008:2053**

# VACCIN GRIPPAL INACTIVÉ (ANTIGÈNE DE SURFACE, VIROSOMAL)

## Vaccinum influenzae inactivatum ex corticis antigeniis praeparatum virosomale

DÉFINITION

Le vaccin grippal inactivé (antigène de surface, virosomal) est une suspension stérile, aqueuse, d'une ou de plusieurs souches de virus grippal des types A ou B, ou d'un mélange de souches des 2 types cultivés individuellement dans des oeufs embryonnés de poules, inactivés et traités de façon à obtenir une préparation constituée principalement d'antigènes hémagglutinine et neuraminidase reconstitués en virosomes, sans altérer les propriétés antigéniques de ces antigènes. La teneur déclarée en antigène hémagglutinine pour chaque souche présente dans le vaccin est de 15 µg par dose, sauf si des données cliniques démontrent qu'une autre quantité peut être utilisée.

Le vaccin se présente sous la forme d'un liquide légèrement opalescent.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

*CHOIX DE LA SOUCHE VACCINALE*

L'Organisation Mondiale de la Santé procède à une étude annuelle de la situation épidémiologique mondiale et, si nécessaire, recommande les souches correspondant à cette situation épidémiologique.

De telles souches sont utilisées conformément à la réglementation des Etats signataires de la Convention relative à l'Elaboration d'une Pharmacopée Européenne. Il est maintenant de pratique commune d'utiliser des souches réassorties qui donnent une forte production d'antigènes de surface appropriés. L'origine et l'historique des passages des souches virales devront être approuvées par l'Autorité compétente.

*SUBSTRAT POUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS*

La semence de virus grippal destinée à être utilisée dans la production du vaccin est cultivée dans des oeufs embryonnés provenant d'élevages de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*) ou dans des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*), par exemple des fibroblastes d'embryons de poulet ou des cellules rénales de poussin provenant d'élevages de poulets EOPS (*5.2.2*). Pour la production, le virus de chaque souche est cultivé dans la cavité allantoïdienne d'oeufs embryonnés de poules provenant d'élevages reconnus sains.

*LOT DE SEMENCE*

La production du vaccin est basée sur un système de lot de semence. Les lots de semence de travail ne doivent pas avoir subi plus de 15 passages à partir du virus réassorti approuvé ou de l'isolat de virus approuvé. Le vaccin final représente 1 passage à partir du lot de semence de travail. Les antigènes hémagglutinine et neuraminidase de chaque lot de semence sont identifiés comme ceux du virus grippal de la souche appropriée par des méthodes appropriées.

Seul un lot de semence de travail qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du mélange de récoltes monovalent.

**Contamination bactérienne et fongique**. Effectuez l'essai de stérilité (*2.6.1*), en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Mycoplasmes** (*2.6.7*). Effectuez l'essai des mycoplasmes en utilisant 10 mL.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

Un agent antimicrobien peut être ajouté à l'inoculum. Après incubation à température contrôlée, les liquides allantoïdiens sont recueillis et réunis pour former le mélange de récoltes monovalent. Un agent antimicrobien peut être ajouté au moment de la récolte.

*MÉLANGE DE RÉCOLTES MONOVALENT*

Afin de limiter la possibilité de contamination, l'inactivation est commencée dès que possible après la préparation. Le virus est inactivé par une méthode qui s'est avérée d'une efficacité constante sur 3 lots consécutifs chez le fabricant. Il devra également être démontré que le procédé d'inactivation est capable d'inactiver le virus grippal sans détruire son pouvoir antigène ; le procédé est choisi de manière à causer une altération minimale des antigènes hémagglutinine et neuraminidase. Le procédé d'inactivation devra aussi être capable d'inactiver les virus de la leucose aviaire et les mycoplasmes. Si le mélange de récoltes monovalent est conservé après inactivation, il sera maintenu à une température de 5 ± 3 °C. Si une solution de formaldéhyde est utilisée, la concentration ne doit dépasser 0,2 g/L de $CH_2O$ à aucun moment de l'inactivation ; si la bêtapropiolactone est utilisée, la concentration ne doit dépasser 0,1 pour cent *V/V* à aucun moment de l'inactivation.

Le mélange de récoltes monovalent est concentré et purifié par centrifugation à grande vitesse ou toute autre méthode appropriée avant ou après l'inactivation.

Seul un mélange de récoltes monovalent qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation des virosomes.

Si l'essai de l'antigène hémagglutinine, l'essai de l'antigène neuraminidase et l'essai du virus infectieux résiduel ont été réalisés avec des résultats satisfaisants sur la préparation de virosomes monovalents, ils peuvent être omis sur le mélange de récoltes monovalent lorsque le procédé de fabrication est continu entre le mélange de récoltes monovalent et la préparation de virosomes monovalents.

**Antigène hémagglutinine**. Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par un essai d'immunodiffusion (*2.7.1*). L'essai est effectué à 20-25 °C par comparaison avec une préparation d'antigène hémagglutinine de référence[(3)] ou une préparation d'antigène étalonnée par rapport à elle.

**Antigène neuraminidase**. La présence et le type d'antigène neuraminidase sont confirmés par des méthodes enzymatiques ou immunologiques appropriées ; l'essai est effectué sur les 3 premiers mélanges de récoltes monovalents obtenus à partir de chaque lot de semence de travail.

(3) Les antigènes hémagglutinine de référence sont disponibles auprès du National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Grande-Bretagne.

**Virus infectieux résiduel**. Effectuez l'essai tel qu'il est décrit sous Essai.

*PRÉPARATION DES VIROSOMES MONOVALENTS*

Les particules virales sont fragmentées selon des procédures approuvées pour obtenir les sous-unités constitutives du virus, puis purifiées afin que le vrac final obtenu soit principalement des antigènes hémagglutinine et neuraminidase. Des phospholipides supplémentaires peuvent être ajoutés et des virosomes peuvent être formés par retrait du détergent par chromatographie d'adsorption ou par une autre technique appropriée. Plusieurs préparations de virosomes monovalents peuvent être mélangées.
Seule une préparation de virosomes monovalents qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du vrac final.

**Antigène hémagglutinine**. Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par un essai d'immunodiffusion (*2.7.1*). L'essai est effectué à 20-25 °C par comparaison avec une préparation d'antigène hémagglutinine de référence[(3)] ou une préparation d'antigène étalonnée par rapport à elle.

**Antigène neuraminidase**. La présence et le type d'antigène neuraminidase sont confirmés par des méthodes enzymatiques ou immunologiques appropriées ; l'essai est effectué sur les 3 premières préparations de virosomes issues de chaque lot de semence de travail.

**Virus infectieux résiduel**. Effectuez l'essai décrit sous Essai. Si cet essai a été réalisé avec des résultats satisfaisants sur le mélange de récoltes monovalent, il peut être omis sur la préparation de virosomes monovalents.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité, en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Pureté**. La pureté d'une préparation de virosomes monovalents est déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (*2.2.31*) ou par toute autre méthode appropriée. Le mélange de virosomes est constitué principalement des antigènes hémagglutinine et neuraminidase.

**Produits chimiques utilisés pour la fragmentation et la purification**. Des essais concernant les substances chimiques utilisées pour fragmenter et purifier le virus sont effectués sur la préparation de virosomes monovalents, les limites étant approuvées par l'Autorité compétente.

**Phospholipides**. Déterminez la teneur en phospholipides et leur identité par une méthode immunochimique ou physicochimique appropriée.

**Rapport hémagglutinine/phospholipides**. Le rapport hémagglutinine/phospholipides se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Taille des virosomes**. Le diamètre moyen des virosomes, déterminé par une méthode appropriée telle que la spectroscopie par corrélation de photons, n'est pas inférieur à 100 nm ni supérieur à 300 nm. L'indice de polydispersité n'est pas supérieur à 0,4.

*VRAC FINAL*

Des quantités appropriées de préparations de virosomes monovalents sont mélangées pour former le vrac final.
Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. La teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable. Les récipients sont fermés de façon à prévenir toute contamination.

Seul un lot final qui satisfait à chacun des essais décrits sous Essai et Dosage peut être libéré. Si l'essai du virus infectieux résiduel a été effectué avec des résultats satisfaisants sur chaque mélange de récoltes monovalent ou, dans les cas appropriés, sur la préparation de virosomes monovalents, et si les essais des phospholipides, du rapport hémagglutinine/phospholipides, du formaldéhyde libre, de l'ovalbumine et des protéines totales ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

## IDENTIFICATION

Le dosage sert également à confirmer la spécificité antigénique du produit.

## ESSAI

**Virus infectieux résiduel**. Utilisez 10 oeufs embryonnés. Inoculez 0,2 mL de vaccin dans la cavité allantoïdienne de chacun d'eux ; faites incuber à 33-37 °C pendant 3 jours. L'essai n'est valable que si les embryons d'au moins 8 oeufs sur 10 survivent. Recueillez dans chaque embryon survivant 0,5 mL de liquide allantoïdien et mélangez les liquides. Inoculez 0,2 mL du mélange de liquides dans un autre groupe de 10 oeufs embryonnés et faites incuber à 33-37 °C pendant 3 jours. L'essai n'est valable que si les embryons d'au moins 8 oeufs sur 10 survivent. Recueillez dans chaque embryon survivant environ 0,1 mL de liquide allantoïdien et effectuez sur chaque liquide recueilli une recherche de virus vivant par un essai d'hémagglutination. S'il se produit une hémagglutination lors de l'essai, effectuez à partir du liquide concerné un passage sur oeufs supplémentaire et un essai d'hémagglutination ; aucune hémagglutination ne se produit.

**pH** (*2.2.3*) : 6,5 à 7,8.

**Phospholipides**. Déterminez la teneur en phospholipides et leur identité par une méthode immunochimique ou physicochimique appropriée.

**Rapport hémagglutinine/phospholipides**. Le rapport hémagglutinine/phospholipides se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. La teneur n'est pas inférieure à la teneur minimale qui a été démontrée efficace et elle n'est pas supérieure à 115 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L, dans les cas appropriés.

**Ovalbumine**. La teneur en ovalbumine n'est pas supérieure à celle indiquée sur l'étiquette et dans tous les cas n'est pas supérieure à 1 µg par dose humaine, déterminée par une méthode immunochimique (*2.7.1*) appropriée, en utilisant une préparation de référence d'ovalbumine appropriée.

**Protéines totales**. La teneur en protéines autres que l'hémagglutinine n'est pas supérieure à 40 µg de protéines par souche de virus et par dose humaine, ni supérieure à un total de 120 µg de protéines par dose humaine.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

**Taille des virosomes**. Le diamètre moyen des virosomes, déterminé par une méthode appropriée telle que la spectroscopie par corrélation de photons, n'est pas inférieur à 100 nm ni supérieur à 300 nm. L'indice de polydispersité n'est pas supérieur à 0,4.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 100 UI par dose humaine.

## ACTIVITÉ

Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par un essai d'immunodiffusion (*2.7.1*). L'essai est effectué à 20-25 °C par comparaison avec une préparation d'antigène hémagglutinine de référence[(3)] ou une préparation d'antigène étalonnée par

rapport à elle. Les limites de confiance ($P$ = 0,95) ne sont pas inférieures à 80 pour cent ni supérieures à 125 pour cent de la valeur estimée en antigène hémagglutinine. Pour chaque souche, la limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) n'est pas inférieure à 80 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- que le vaccin a été préparé sur oeufs,
- la souche ou les souches de virus grippal utilisées dans la préparation du vaccin,
- la méthode d'inactivation,
- la teneur en hémagglutinine, en microgrammes par souche de virus et par dose,
- la teneur maximale en ovalbumine,
- la saison durant laquelle le vaccin est destiné à la protection.

**01/2008:0159**

# VACCIN GRIPPAL INACTIVÉ À VIRION ENTIER

## Vaccinum influenzae inactivatum ex viris integris praeparatum

DÉFINITION

Le vaccin grippal inactivé à virion entier est une suspension stérile, aqueuse, d'une ou de plusieurs souches de virus grippal des types A et B, ou d'un mélange de souches des 2 types cultivés individuellement dans des oeufs embryonnés de poules et inactivés de façon à conserver leurs propriétés antigéniques. La teneur déclarée en antigène hémagglutinine pour chaque souche est de 15 µg par dose, sauf si des données cliniques démontrent qu'une autre quantité peut être utilisée.

Le vaccin se présente sous la forme d'un liquide légèrement opalescent.

PRODUCTION

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

*CHOIX DE LA SOUCHE VACCINALE*

L'Organisation Mondiale de la Santé procède à une étude annuelle de la situation épidémiologique mondiale et, si nécessaire, recommande les souches correspondant à cette situation épidémiologique.

De telles souches sont utilisées conformément à la réglementation des Etats signataires de la Convention relative à l'Elaboration d'une Pharmacopée Européenne. Il est maintenant de pratique commune d'utiliser des souches réassorties qui donnent une forte production d'antigènes de surface appropriés. L'origine et l'historique des passages des souches virales devront être approuvées par l'Autorité compétente.

*SUBSTRAT POUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS*

La semence de virus grippal destinée à être utilisée dans la production du vaccin est cultivée dans des oeufs embryonnés provenant d'élevages de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*) ou dans des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*), par exemple des fibroblastes d'embryons de poulet ou des cellules rénales de poussin provenant d'élevages de poulets EOPS (*5.2.2*). Pour la production, le virus de chaque souche est cultivé dans la cavité allantoïdienne d'oeufs embryonnés de poules provenant d'élevages reconnus sains.

*LOT DE SEMENCE*

La production du vaccin est basée sur un système de lot de semence. Les lots de semence de travail ne doivent pas avoir subi plus de 15 passages à partir du virus réassorti approuvé ou de l'isolat de virus approuvé. Le vaccin final représente 1 passage à partir du lot de semence de travail. Les antigènes hémagglutinine et neuraminidase de chaque lot de semence sont identifiés comme ceux du virus grippal de la souche appropriée par des méthodes convenables.

Seul un lot de semence de travail qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du mélange de récoltes monovalent.

**Contamination bactérienne et fongique**. Effectuez l'essai de stérilité (*2.6.1*), en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Mycoplasmes** (*2.6.7*). Effectuez l'essai des mycoplasmes en utilisant 10 mL.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

Un agent antimicrobien peut être ajouté à l'inoculum. Après incubation à température contrôlée, les liquides allantoïdiens sont recueillis et réunis pour former le mélange de récoltes monovalent. Un agent antimicrobien peut être ajouté au moment de la récolte. Ni la pénicilline, ni la streptomycine ne sont utilisées à aucun stade de la production.

*MÉLANGE DE RÉCOLTES MONOVALENT*

Afin de limiter la possibilité de contamination, l'inactivation est commencée dès que possible après la préparation. Le virus est inactivé par une méthode qui s'est avérée d'une efficacité constante sur 3 lots consécutifs entre les mains du fabricant. Il devra également être démontré que le procédé d'inactivation est capable d'inactiver le virus grippal sans détruire son pouvoir antigène ; le procédé ne devrait causer qu'une altération minimale des antigènes hémagglutinine et neuraminidase. Le procédé d'inactivation devra aussi être capable d'inactiver les virus de la leucose aviaire et les mycoplasmes. Si le mélange de virus est conservé après inactivation, il est maintenu à 5 ± 3 °C. Si une solution de formaldéhyde est utilisée, la concentration ne doit dépasser à aucun moment de l'inactivation 0,2 g/L de $CH_2O$ ; si la bêtapropiolactone est utilisée, la concentration ne doit dépasser à aucun moment de l'inactivation 0,1 pour cent *V/V*.

Avant ou après l'inactivation, le mélange de récoltes monovalent est concentré et purifié par centrifugation à grande vitesse ou toute autre méthode appropriée.

Seul un mélange de récoltes monovalent qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du vrac final.

**Antigène hémagglutinine**. Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par un essai d'immunodiffusion (*2.7.1*). L'essai se fera à 20-25 °C par comparaison avec une préparation d'antigène d'hémagglutinine de référence[(4)] ou une préparation d'antigène étalonnée par rapport à elle.

**Antigène neuraminidase**. La présence et le type de l'antigène neuraminidase sont confirmés par des essais appropriés, enzymatiques ou immunologiques ; l'essai sera effectué sur les 3 premiers mélanges de récoltes monovalents obtenus à partir de chaque lot de semence de travail.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Virus infectieux résiduel**. Effectuez l'essai tel qu'il est décrit sous Essai.

*VRAC FINAL*

Des quantités appropriées des mélanges de récoltes monovalents sont réunies pour former le vrac final.

Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

(4) Les antigènes hémagglutinine de référence sont disponibles auprès du NIBSC, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Grande-Bretagne.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique convenable. La teneur n'est ni inférieure à 85 pour cent, ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable. Les récipients sont fermés de façon à prévenir toute contamination.

Seul un lot final qui satisfait à chacun des essais décrits ci-après sous Essai et Dosage peut être libéré. Si l'essai du virus infectieux résiduel a été effectué avec des résultats satisfaisants sur chaque mélange de récoltes monovalent et si les essais de formaldéhyde libre, d'ovalbumine et de protéines totales ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

IDENTIFICATION

La détermination de la teneur en antigène hémagglutinine sert également à confirmer la spécificité antigénique du produit.

ESSAI

**Virus infectieux résiduel**. Utilisez 10 oeufs enbryonnés. Inoculez dans la cavité allantoïdienne de chacun d'eux 0,2 mL de vaccin ; faites incuber à 33-37 °C pendant 3 jours. L'essai n'est valable que si les embryons d'au moins 8 oeufs sur 10 survivent. Recueillez dans chaque embryon survivant 0,5 mL de liquide allantoïdien et mélangez les liquides. Inoculez 0,2 mL de liquide recueilli dans un autre groupe de 10 oeufs embryonnés et faites incuber à 33-37 °C pendant 3 jours. L'essai n'est valable que si les embryons d'au moins 8 oeufs sur 10 survivent. Recueillez dans chaque embryon environ 0,1 mL de liquide allantoïdien et effectuez sur chaque liquide individuel une recherche de virus vivant par un essai d'hémagglutination. S'il se produit une hémagglutination lors de l'essai, effectuez à partir du liquide concerné un passage sur oeufs supplémentaire et un essai d'hémagglutination ; aucune hémagglutination ne se produit.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique convenable. La teneur n'est pas inférieure à la teneur minimale qui a été démontrée efficace et elle n'est pas supérieure à 115 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L, dans les cas appropriés.

**Ovalbumine**. La teneur en ovalbumine n'est pas supérieure à celle indiquée sur l'étiquette et dans tous les cas n'est pas supérieure à 1 µg par dose humaine, déterminée par une méthode immunochimique (*2.7.1*) appropriée, en utilisant une préparation de référence d'ovalbumine appropriée.

**Protéines totales**. La teneur en protéines totales n'est pas supérieure à 6 fois la teneur totale du vaccin en hémagglutinine, déterminée comme décrit sous Dosage, mais en tout cas, elle n'est pas supérieure à 100 µg de protéines par souche de virus et par dose humaine ni à plus de 300 µg de protéines totales par dose humaine.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 100 UI par dose humaine.

ACTIVITÉ

Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par un essai d'immunodiffusion (*2.7.1*). Effectuez l'essai à 20-25 °C par comparaison avec une préparation d'antigène d'hémagglutinine de référence[(4)] ou une préparation d'antigène étalonnée par rapport à elle. Les limites de confiance ($P$ = 0,95) ne sont pas inférieures à 80 pour cent ni supérieures à 125 pour cent de la teneur estimée en antigène hémagglutinine. Pour chaque souche, la limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) n'est pas inférieure à 80 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– que le vaccin a été préparé sur oeufs,
– la souche ou les souches de virus grippal utilisées dans la préparation du vaccin,
– la méthode d'inactivation,
– la teneur en antigène hémagglutinine en microgrammes par souche de virus et par dose,
– la teneur maximale en ovalbumine,
– la saison durant laquelle le vaccin est destiné à la protection.

**04/2009:2308**

# VACCIN GRIPPAL INACTIVÉ À VIRION ENTIER PRÉPARÉ SUR CULTURES CELLULAIRES

## Vaccinum influenzae inactivatum ex cellulis virisque integris praeparatum

DÉFINITION

Le vaccin grippal inactivé à virion entier préparé sur cultures cellulaires est une suspension stérile, aqueuse, d'une ou de plusieurs souches de virus grippal des types A ou B, ou d'un mélange de souches des 2 types cultivés individuellement sur des cultures cellulaires et inactivés de manière à préserver leurs propriétés antigéniques. La teneur déclarée en antigène hémagglutinine pour chaque souche est de 15 µg par dose, sauf si des données cliniques démontrent qu'une autre quantité peut être utilisée. Le vaccin se présente sous la forme d'un liquide légèrement opalescent ou opalescent. Le vaccin peut contenir un adjuvant. Cette monographie s'applique à des vaccins produits sur lignées cellulaires diploïdes ou continues obtenues à partir de mammifères.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

La production du vaccin est basée sur un système de lot de semence virale et un système de banque cellulaire. Il doit être démontré que le procédé de production utilisé donne de façon constante des vaccins satisfaisant aux exigences de pouvoir immunogène, d'innocuité et de stabilité.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer une réduction appropriée de la teneur en protéines résiduelles issues de la cellule hôte. Avec l'accord de l'Autorité compétente et pour chaque produit spécifique, les contrôles de routine de la teneur en protéines résiduelles issues de la cellule hôte peuvent être omis sur la base des résultats des études de validation du produit. Des indications complémentaires sur les principes de telles études de validation sont données par exemple dans la monographie *Produits obtenus par la méthode dite de l'ADN recombinant (0784)* en particulier dans les sections « Validation du processus de production - Extraction et purification » et « Régularité de la production - Protéines issues de la cellule hôte ».

*CHOIX DE LA SOUCHE VACCINALE*

L'Organisation Mondiale de la Santé procède à une étude annuelle de la situation épidémiologique mondiale et, si nécessaire, recommande les souches correspondant à cette situation épidémiologique.

Vaccins

Ces souches sont utilisées conformément à la réglementation des Etats signataires de la Convention relative à l'Elaboration d'une Pharmacopée Européenne. Il est maintenant de pratique courante d'utiliser des souches réassorties qui donnent une forte production d'antigènes de surface appropriés. L'origine et l'historique des passages des souches virales devront être approuvés par l'Autorité compétente.

*SUBSTRAT POUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS*

Le virus grippal destiné à la préparation des lots de semence est cultivé dans des oeufs embryonnés provenant d'élevages de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*) ou dans des cultures cellulaires appropriées (*5.2.3*), par exemple des fibroblastes d'embryons de poulet, des cellules rénales de poussin provenant d'élevages de poulets EOPS (*5.2.2*), ou sur une lignée cellulaire diploïde ou continue. Le passage final pour l'établissement du lot de semence de travail est préparé sur la lignée cellulaire utilisée pour la production de routine. Pour cette production, le virus de chaque souche est cultivé sur une lignée cellulaire diploïde ou continue (*5.2.3*).

*LOT DE SEMENCE*

La production du vaccin est basée sur un système de lot de semence. Chacune des souches de virus grippal utilisées sera identifiée par des données historiques comprenant des informations sur son origine et sa manipulation ultérieure. Les lots de semence de travail ne doivent pas avoir subi plus de 15 passages à partir du virus réassorti approuvé ou de l'isolat de virus approuvé. Le vaccin final représente 1 passage à partir du lot de semence de travail.

Seul un lot de semence de travail qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la multiplication du virus.

**Identification**. Les antigènes hémagglutinine et neuraminidase de chaque lot de semence primaire et de travail sont identifiés par des méthodes convenables comme étant ceux du virus grippal de la souche appropriée.

**Concentration en virus**. La concentration en virus de chaque lot de semence de travail est déterminée. Dans les cas appropriés, la concentration en virus de chaque lot de semence primaire est déterminée.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Les lots de semence de travail satisfont aux exigences définies pour les lots de semence. Il est admis que, du fait des modifications saisonnières d'une ou de plusieurs souches de vaccin grippal, la recherche, dans le respect des délais, d'agents étrangers sur les semences de virus conformément au chapitre général *2.6.16* peut poser problème (durée des essais *in vivo*, disponibilité en temps voulu d'immunosérums neutralisants spécifiques, par exemple). En accord avec l'Autorité compétente et en tenant compte de l'évaluation du risque, des dosages rapides (PCR multiplex, par exemple) peuvent être utilisés comme alternatives au chapitre général *2.6.16* après validation appropriée.

L'évaluation du risque et la validation comprennent des considérations plus générales sur les contaminants potentiels des isolats de virus, la sensibilité du substrat cellulaire vis-à-vis de ces virus et la capacité du procédé de production à éliminer ou inactiver les virus ; la validation doit également inclure des données comparatives sur les contrôles des lots de semence selon le chapitre général *2.6.16* et selon les méthodes de dosage rapide proposées. Il doit être démontré, par une validation analytique appropriée, que chaque essai appliqué par PCR ou par une autre technique d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) est approprié pour l'usage envisagé. L'évaluation du risque est réexaminée en cas d'informations nouvelles sur les contaminants viraux potentiels et la justification du choix du panel d'agents étrangers recherchés par PCR est fournie à l'Autorité compétente dans le cadre de la mise à jour annuelle. Cette mise à jour comprend également des aspects spécifiques à la souche vaccinale, comme des effets inhibiteurs spécifiques de la PCR.

Si un agent est décelé sur une semence de virus et qu'il est établi que les cellules de mammifère utilisées pour la production sont sensibles à cet agent, la semence de virus n'est pas utilisée pour la production du vaccin.

Si un agent est décelé sur une semence de virus et que les cellules de mammifère n'y sont pas sensibles, effectuez la validation du procédé de production pour démontrer l'élimination ou l'inactivation de l'agent. Si l'élimination ou l'inactivation ne peuvent être établies, la récolte monovalente inactivée est contrôlée pour démontrer l'absence de tout contaminant identifié sur la semence de virus.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE UNIQUE*

Toutes les manipulations effectuées sur la banque de cellules et les cultures cellulaires dérivées sont conduites dans des conditions d'asepsie, dans un local où d'autres cellules ne sont pas manipulées en même temps. Un sérum animal approuvé (à l'exclusion de sérum humain) peut être utilisé dans les milieux de culture cellulaire. L'absence d'agents étrangers dans le sérum et la trypsine utilisés pour la préparation des suspensions cellulaires ou des milieux est vérifiée. Les milieux de culture cellulaire peuvent contenir un indicateur de pH, tel que le rouge de phénol, et des antibiotiques à la concentration correspondant au seuil minimal d'efficacité. Une quantité suffisante de cultures cellulaires utilisées pour la production du vaccin est réservée comme culture de cellules non infectées (cellules témoins).

Seule une récolte unique qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée pour la préparation du vaccin.

**Identification**. La détermination de la teneur en antigène sert également à identifier la récolte unique.

**Contamination bactérienne et fongique**. Effectuez l'essai de stérilité (*2.6.1*) en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Mycoplasmes** (*2.6.7*). Effectuez l'essai des mycoplasmes en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Cellules témoins**. Les cellules témoins de la culture cellulaire de production satisfont à un essai d'identification et aux exigences concernant les agents étrangers (*2.6.16*).

**Antigène hémagglutinine**. Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

*RÉCOLTE MONOVALENTE INACTIVÉE ET PURIFIÉE*

La récolte, qui peut être un mélange de plusieurs récoltes uniques de la même souche, est inactivée et purifiée par des méthodes validées. La récolte monovalente est concentrée et purifiée par centrifugation à grande vitesse ou toute autre méthode appropriée avant ou après l'inactivation. Le virus est inactivé par une méthode qui s'est avérée d'une efficacité constante sur 3 lots consécutifs chez le fabricant. Il devra également être démontré que le procédé d'inactivation est capable d'inactiver le virus grippal sans détruire son pouvoir antigène ; le procédé est choisi de manière à causer une altération minimale des antigènes hémagglutinine et neuraminidase.

Si la production est effectuée au moyen de lignées cellulaires continues, il doit avoir été validé que le procédé de purification employé réduit régulièrement l'ADN issu de la cellule hôte à des teneurs appropriées.

Seule une récolte monovalente inactivée purifiée qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée pour la préparation du vrac final.

**Antigène hémagglutinine**. Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

**Rapport entre la teneur en antigène et la teneur en protéines totales**. Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par un essai d'immunodiffusion approprié, et la teneur en protéines totales par une méthode validée. Le rapport entre la teneur en antigène hémagglutinine et la teneur en protéines totales doit se situer dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Antigène neuraminidase**. La présence et le type de l'antigène neuraminidase sont confirmés par des essais appropriés, enzymatiques ou immunologiques ; l'essai est effectué sur les 3 premiers mélanges de récoltes monovalents obtenus à partir de chaque lot de semence de travail.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Virus infectieux résiduel**. Effectuez l'essai tel qu'il est décrit sous Essai.

*VRAC FINAL*

Des quantités appropriées des mélanges de récoltes monovalentes inactivées et purifiées sont réunies pour former le vrac final. Un adjuvant peut être ajouté.

Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**ADN résiduel de la cellule hôte**. Si le virus est multiplié sur une lignée cellulaire continue, la teneur en ADN résiduel de la cellule hôte, déterminée par une méthode appropriée, n'est pas supérieure à 10 ng dans l'équivalent d'une dose humaine unitaire.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable. Les récipients sont fermés de façon à prévenir toute contamination.

Seul un lot final qui satisfait à chacun des essais décrits ci-après sous Essai et Dosage peut être libéré. Si l'essai du virus infectieux résiduel a été effectué avec des résultats satisfaisants sur chaque produit monovalent inactivé et purifié en vrac et si les essais du formaldéhyde libre, de la sérum-albumine bovine et des protéines totales ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

Si le vaccin contient un adjuvant, des essais appropriés pour l'identification et tout autre critère de qualité approprié sont effectués sur le lot final. Ces essais peuvent comprendre des analyses chimiques et physiques, une détermination de la granulométrie des particules et une détermination du nombre de particules par unité de volume.

## IDENTIFICATION

La détermination de la teneur en antigène hémagglutinine sous Dosage sert également à confirmer la spécificité antigénique du produit.

## ESSAI

**Virus infectieux résiduel**. Procédez à un essai d'amplification en virus grippal infectieux résiduel. Inoculez au moins 4 mL de vaccin à des cultures cellulaires du même type que celles utilisées pour la production du vaccin ; faites incuber pendant au moins 7 jours à 32 ± 2 °C. Inoculez au moins 10 mL du milieu de culture cellulaire récolté à une nouvelle culture cellulaire semi-confluente et faites incubez comme précédemment. A la fin de la période d'incubation, effectuez une recherche de virus vivant par un essai d'hémagglutination. S'il se produit une hémagglutination lors de l'essai, effectuez à partir du liquide concerné un passage supplémentaire sur cultures cellulaires et un essai d'hémagglutination ; aucune hémagglutination ne se produit.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à la teneur minimale qui a été démontrée efficace et elle n'est pas supérieure à 115 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L, dans les cas appropriés.

**Sérum-albumine bovine** : au maximum 50 ng par dose humaine, déterminé par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

**Protéines totales**. La teneur en protéines totales n'est pas supérieure à 6 fois la teneur totale du vaccin en hémagglutinine déterminée sous Dosage, et elle n'est en aucun cas supérieure à 100 μg de protéines par souche de virus et par dose humaine.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 25 UI par dose humaine.

## ACTIVITÉ

Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par un essai d'immunodiffusion (*2.7.1*). Effectuez l'essai à 20-25 °C par comparaison avec une préparation d'antigène hémagglutinine de référence[(5)] ou une préparation d'antigène étalonnée par rapport à elle. Les limites de confiance ($P$ = 0,95) ne sont pas inférieures à 80 pour cent ni supérieures à 125 pour cent de la valeur estimée. Pour chaque souche, la limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) n'est pas inférieure à 80 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- l'origine biologique de la culture cellulaire qui a servi à la préparation du vaccin,
- la souche ou les souches de virus grippal utilisées dans la préparation du vaccin,
- la méthode d'inactivation,
- la teneur en antigène hémagglutinine en microgrammes par souche de virus et par dose,
- la saison durant laquelle le vaccin est destiné à la protection,
- dans les cas appropriés, le nom et la quantité d'adjuvant utilisé.

Vaccins

**01/2008:0158**
**corrigé 6.7**

# VACCIN GRIPPAL INACTIVÉ À VIRION FRAGMENTÉ

## Vaccinum influenzae inactivatum ex virorum fragmentis praeparatum

## DÉFINITION

Le vaccin grippal inactivé à virion fragmenté est une suspension stérile, aqueuse, d'une ou de plusieurs souches de virus grippal des types A et B, ou d'un mélange de souches des 2 types cultivés individuellement dans des oeufs embryonnés de poules, inactivés et traités de façon à fragmenter les particules virales sans altérer les propriétés antigéniques de l'hémagglutinine ou de la neuraminidase. La teneur déclarée en hémagglutinine pour chaque souche est de 15 μg par dose, sauf si des données cliniques démontrent qu'une autre quantité peut être utilisée.

Le vaccin se présente sous la forme d'un liquide légèrement opalescent.

(5) Les antigènes hémagglutinine de référence sont disponibles auprès du National Institute for Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Grande-Bretagne.

PRODUCTION

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

*CHOIX DE LA SOUCHE VACCINALE*

L'Organisation Mondiale de la Santé procède à une étude annuelle de la situation épidémiologique mondiale et, si nécessaire, recommande les souches correspondant à cette situation épidémiologique.

De telles souches sont utilisées conformément à la réglementation des Etats signataires de la Convention relative à l'Elaboration d'une Pharmacopée Européenne. Il est maintenant de pratique commune d'utiliser des souches réassorties qui donnent une forte production d'antigènes de surface appropriés. L'origine et l'historique des passages des souches virales devront être approuvées par l'Autorité compétente.

*SUBSTRAT POUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS*

La semence de virus grippal destinée à être utilisée dans la production du vaccin est cultivée dans des oeufs embryonnés provenant d'élevages de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*) ou dans des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*), par exemple des fibroblastes d'embryons de poulet ou des cellules rénales de poussin provenant d'élevages de poulets EOPS (*5.2.2*). Pour la production, le virus de chaque souche est cultivé dans la cavité allantoïdienne d'oeufs embryonnés de poules provenant d'élevages reconnus sains.

*LOT DE SEMENCE*

La production du vaccin est basée sur un système de lot de semence. Les lots de semence de travail ne doivent pas avoir subi plus de 15 passages à partir du virus réassorti approuvé ou de l'isolat de virus approuvé. Le vaccin final représente 1 passage à partir du lot de semence de travail. Les antigènes hémagglutinine et neuraminidase de chaque lot de semence sont identifiés comme ceux du virus grippal de la souche appropriée par des méthodes convenables.

Seul un lot de semence de travail qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du mélange de récoltes monovalent.

**Contamination bactérienne et fongique**. Effectuez l'essai de stérilité (*2.6.1*), en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Mycoplasmes** (*2.6.7*). Effectuez l'essai des mycoplasmes en utilisant 10 mL.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

Un agent antimicrobien peut être ajouté à l'inoculum. Après incubation à température contrôlée, les liquides allantoïdiens sont recueillis et réunis pour former le mélange de récoltes monovalent. Un agent antimicrobien peut être ajouté au moment de la récolte. Ni la pénicilline, ni la streptomycine ne sont utilisées à aucun stade de la production.

*MÉLANGE DE RÉCOLTES MONOVALENT*

Afin de limiter la possibilité de contamination, l'inactivation est commencée dès que possible après la préparation. Le virus est inactivé par une méthode qui s'est avérée d'une efficacité constante sur 3 lots consécutifs entre les mains du fabricant. Il devra également être démontré que le procédé d'inactivation est capable d'inactiver le virus grippal sans détruire son pouvoir antigène ; le procédé ne devrait causer qu'une altération minimale des antigènes hémagglutinine et neuraminidase. Le procédé d'inactivation devra aussi être capable d'inactiver les virus de la leucose aviaire et les mycoplasmes. Si le mélange de virus est conservé après inactivation, il est maintenu à 5 ± 3 °C. Si une solution de formaldéhyde est utilisée, la concentration ne doit dépasser à aucun moment de l'inactivation 0,2 g/L de $CH_2O$ ; si la bêtapropiolactone est utilisée, la concentration ne doit dépasser à aucun moment de l'inactivation 0,1 pour cent *V/V*.

Avant ou après l'inactivation, le mélange de récoltes monovalent est concentré et purifié par centrifugation à grande vitesse ou toute autre méthode appropriée et les particules de virus sont fragmentées par des procédés approuvés pour obtenir les sous-unités constitutives du virus. Pour chaque nouvelle souche, un essai de validation est effectué afin de démontrer qu'il y a presque exclusivement des particules fragmentées.

Seul un mélange de récoltes monovalent qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du vrac final.

**Antigène hémagglutinine**. Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par un essai d'immunodiffusion (*2.7.1*). L'essai se fera à 20-25 °C par comparaison avec une préparation d'antigène d'hémagglutinine de référence[(6)] ou une préparation d'antigène étalonnée par rapport à elle.

Pour certains vaccins, la forme physique des particules d'hémagglutinine rend impossible une détermination par immunodiffusion après inactivation du virus. Pour de tels vaccins, une détermination de l'antigène hémagglutinine est effectuée sur le mélange de récoltes monovalent avant l'inactivation. Le procédé de fabrication est validé afin de démontrer une conservation convenable d'antigène hémagglutinine et un traceur approprié est utilisé pour la formulation, par exemple la teneur en protéines.

**Antigène neuraminidase**. La présence et le type de l'antigène neuraminidase sont confirmés par des essais appropriés, enzymatiques ou immunologiques ; l'essai sera effectué sur les 3 premiers mélanges de récoltes monovalents obtenus à partir de chaque lot de semence de travail.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Virus infectieux résiduel**. Effectuez l'essai tel qu'il est décrit sous Essai.

**Substances chimiques utilisées pour fragmenter le virus**. Des essais pour les substances chimiques utilisées pour fragmenter le virus sont effectués sur le mélange de récoltes monovalent, les limites étant approuvées par l'Autorité compétente.

*VRAC FINAL*

Des quantités appropriées des mélanges de récoltes monovalents sont réunies pour former le vrac final.

Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique convenable. La teneur n'est ni inférieure à 85 pour cent, ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable. Les récipients sont fermés de façon à prévenir toute contamination.

Seul un lot final qui satisfait à chacun des essais décrits ci-après sous Essai et Dosage peut être libéré. Si l'essai du virus infectieux résiduel a été effectué avec des résultats satisfaisants sur chaque mélange de récoltes monovalent et si les essais de formaldéhyde libre, d'ovalbumine et de protéines totales ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

IDENTIFICATION

La détermination de la teneur en antigène hémagglutinine sert également à confirmer la spécificité antigénique du produit.

(6) Les antigènes hémagglutinine de référence sont disponibles auprès du NIBSC, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Grande-Bretagne.

ESSAI

**Virus infectieux résiduel**. Inoculez dans la cavité allantoïdienne de chacun de 10 oeufs embryonnés 0,2 mL de vaccin ; faites incuber à 33-37 °C pendant 3 jours. L'essai n'est valable que si les embryons d'au moins 8 oeufs sur 10 survivent. Recueillez dans chaque embryon survivant 0,5 mL de liquide allantoïdien et mélangez les liquides. Inoculez 0,2 mL de liquide recueilli à un autre groupe de 10 oeufs embryonnés et faites incuber à 33-37 °C pendant 3 jours. L'essai n'est valable que si les embryons d'au moins 8 oeufs sur 10 survivent. Recueillez dans chaque embryon environ 0,1 mL de liquide allantoïdien et effectuez sur chaque liquide individuel une recherche de virus vivant par un essai d'hémagglutination. S'il se produit une hémagglutination lors de l'essai, effectuez à partir du liquide concerné un passage sur oeufs supplémentaire et un essai d'hémagglutination ; aucune hémagglutination ne se produit.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique convenable. La teneur n'est pas inférieure à la teneur minimale qui a été démontrée efficace et elle n'est pas supérieure à 115 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L, dans les cas appropriés.

**Ovalbumine**. La teneur en ovalbumine n'est pas supérieure à celle indiquée sur l'étiquette et dans tous les cas n'est pas supérieure à 1 µg par dose humaine, déterminée par une méthode immunochimique (*2.7.1*) appropriée, en utilisant une préparation de référence d'ovalbumine appropriée.

**Protéines totales**. La teneur en protéines totales n'est pas supérieure à 6 fois la teneur totale du vaccin en hémagglutinine, déterminée comme décrit sous Dosage, mais en tout cas, elle n'est pas supérieure à 100 µg de protéines par souche de virus et par dose humaine ni à plus de 300 µg de protéines totales par dose humaine.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 100 UI par dose humaine.

DOSAGE

Déterminez la teneur en antigène hémagglutinine par un essai d'immunodiffusion (*2.7.1*). Effectuez l'essai à 20-25 °C par comparaison avec une préparation d'antigène d'hémagglutinine de référence[(6)] ou une préparation d'antigène étalonnée par rapport à elle. Les limites de confiance ($P$ = 0,95) ne sont pas inférieures à 80 pour cent ni supérieures à 125 pour cent de la teneur estimée en antigène hémagglutinine. Pour chaque souche, la limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) n'est pas inférieure à 80 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

Pour certains vaccins, la détermination quantitative de l'antigène hémagglutinine par rapport aux préparations de référence disponibles n'est pas possible. Une identification immunologique et une détermination semi-quantitative sont effectuées par des méthodes appropriées.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- que le vaccin a été préparé sur oeufs,
- la souche ou les souches de virus grippal utilisées dans la préparation du vaccin,
- la méthode d'inactivation,
- la teneur en hémagglutinine en microgrammes par souche de virus et par dose,
- la teneur maximale en ovalbumine,
- la saison durant laquelle le vaccin est destiné à la protection.

**01/2008:1375**

# VACCIN INACTIVÉ DE L'ENCÉPHALITE VERNO-ESTIVALE

## Vaccinum encephalitidis ixodibus advectae inactivatum

DÉFINITION

Le vaccin inactivé de l'encéphalite verno-estivale est une préparation liquide d'une souche appropriée du virus de l'encéphalite verno-estivale multiplié en culture de cellules embryonnaires de poulet ou d'autres cultures cellulaires appropriées, et inactivé par une méthode appropriée et validée.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Le vaccin est produit selon un système de lot de semence virale ; il doit être établi que le procédé de production utilisé permet d'obtenir de façon constante des vaccins comparables à celui pour lequel l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées. Sauf exception justifiée et autorisée, le virus contenu dans le vaccin final ne doit pas avoir subi, depuis le lot de semence de travail, un nombre de passages supérieur à celui du virus contenu dans le vaccin utilisé lors des essais cliniques.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

*SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

Le virus est multiplié dans des cellules embryonnaires de poulet préparées à partir d'oeufs provenant d'élevages exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (*5.2.2*) ou dans d'autres cultures cellulaires appropriées (*5.2.3*).

*LOTS DE SEMENCE*

L'identité de la souche du virus de l'encéphalite verno-estivale utilisée est attestée par des données historiques concernant notamment son origine et les manipulations qu'elle a subies. Les lots de semence sont conservés à une température inférieure ou égale à − 60 °C.

Seul un lot de semence qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la multiplication du virus.

**Identification**. Chaque lot de semence est identifié comme contenant la souche vaccinale du virus de l'encéphalite verno-estivale par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), de préférence à l'aide d'anticorps monoclonaux.

**Concentration en virus**. La concentration en virus de chaque lot de semence est déterminée par titrage dans des cultures cellulaires appropriées, afin de surveiller la régularité de la production.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Chaque lot de semence satisfait aux essais des agents étrangers dans les vaccins viraux pour usage humain. Pour la neutralisation du virus vaccinal l'emploi d'anticorps monoclonaux est préférable.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE DU VIRUS*

Si le virus a subi des passages sur cerveau de souris lors de la préparation du lot de semence primaire, au minimum 2 passages du virus à partir duquel a été préparé le lot de semence primaire sont effectués dans des cultures cellulaires avant l'inoculation aux cultures cellulaires de production.

Toutes les manipulations effectuées sur les cultures cellulaires sont conduites dans des conditions d'asepsie, dans un local où ne sont pas manipulées d'autres cellules. L'absence d'agents étrangers dans le sérum et la trypsine utilisés pour la préparation des suspensions cellulaires et dans les milieux est vérifiée. Les milieux de culture peuvent contenir un indicateur de pH tel que le rouge de phénol et des antibiotiques approuvés,

Vaccins

à la plus faible concentration efficace. Au moins 500 mL des cultures cellulaires utilisées pour la production du vaccin sont réservés comme cellules témoins non ensemencées.

Seule une récolte unique qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée dans la préparation de la récolte inactivée.

**Identification**. Chaque récolte unique est identifiée comme contenant le virus de l'encéphalite verno-estivale par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), de préférence à l'aide d'anticorps monoclonaux, ou par neutralisation en cultures cellulaires.

**Contamination bactérienne et fongique**. La récolte unique satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

**Mycoplasmes** (*2.6.7*). La récolte unique satisfait à l'essai des mycoplasmes. Utilisez 1 mL de préparation pour chaque milieu.

**Cellules témoins**. Les cellules témoins de la culture cellulaire de production satisfont aux essais des agents étrangers (*2.6.16*). Si le vaccin est préparé selon un système de banque de cellules, les cellules témoins satisfont à un essai d'identification.

**Concentration en virus**. La concentration en virus de l'encéphalite verno-estivale est déterminée par titrage dans des cultures cellulaires appropriées ; cette détermination permet de surveiller la régularité de la production.

*INACTIVATION*

Afin d'éviter une interférence, les agrégats viraux sont, si nécessaire, éliminés par filtration immédiatement avant l'inactivation. La suspension virale est inactivée par une méthode validée dont il a été démontré qu'elle inactive de manière constante le virus de l'encéphalite verno-estivale sans détruire l'activité antigénique et immunogène ; pendant les études de validation, une courbe d'inactivation représentant la diminution dans le temps de la concentration en virus vivant résiduel avec au moins 3 points est établie. Si le formaldéhyde est employé pour l'inactivation, la présence d'un excès de formaldéhyde libre à la fin de l'inactivation est vérifiée.

Seule une récolte inactivée qui satisfait à l'essai suivant peut être utilisée pour la préparation du vrac final.

**Virus infectieux résiduel**. Inoculez une quantité de la récolte inactivée, équivalant au minimum à 10 doses humaines de vaccin dans le lot final, à des cultures primaires de fibroblastes de poulet, ou à d'autres cellules démontrées au moins aussi sensibles au virus de l'encéphalite verno-estivale ; utilisez au moins 3 $cm^2$ de tapis cellulaire par millilitre d'inoculum. Faites incuber les cultures à 37 ± 1 °C pendant 14 jours. Aucun effet cytopathogène n'est décelé à la fin de la période d'incubation. Recueillez le surnageant des cultures et examinez-le pour détecter la présence du virus infectieux de l'encéphalite verno-estivale à l'aide de l'essai sur souris ci-après ou d'une méthode *in vitro* validée : utilisez au moins 10 souris, âgées d'environ 4 semaines et inoculez à chacune d'elles par voie intracérébrale 0,03 mL du surnageant recueilli. Mettez les souris en observation pendant 14 jours. Elles ne présentent aucun signe d'infection par le virus de l'encéphalite verno-estivale.

*PURIFICATION*

Plusieurs récoltes inactivées peuvent être mélangées avant de procéder à la concentration et la purification par des méthodes appropriées, de préférence par centrifugation en flux continu dans un gradient de densité créé par le saccharose.

Plusieurs récoltes inactivées et purifiées peuvent être mélangées.

Seule une récolte inactivée et purifiée qui satisfait aux essais suivants peut être utilisée pour la préparation du vrac final.

**Stérilité** (*2.6.1*). La récolte inactivée et purifiée satisfait à l'essai de stérilité, effectué en utilisant 10 mL de préparation pour chaque milieu.

**Activité spécifique**. Déterminez la teneur en antigène de la récolte inactivée et purifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). Déterminez la teneur en protéines totales par une méthode appropriée. L'activité spécifique, c'est-à-dire le rapport entre la teneur en antigène et la teneur en protéines totales, se situe entre les limites établies pour le produit spécifique.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé à partir d'une ou de plusieurs récoltes inactivées et purifiées.

Seul un vrac final qui satisfait à l'essai ci-après peut être utilisé pour la préparation du lot final.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Seul peut être libéré un lot final satisfaisant aux spécifications données ci-après sous Identification, Essai et Activité. Les essais du formaldéhyde libre, de la sérum-albumine bovine (le cas échéant) et des pyrogènes ainsi que le titrage d'activité peuvent être omis sur le lot final s'ils ont été réalisés avec des résultats satisfaisants sur le vrac final.

## IDENTIFICATION

Il est démontré par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) utilisant des anticorps spécifiques que le vaccin contient l'antigène du virus de l'encéphalite verno-estivale. L'essai d'activité sert également à identifier le vaccin.

## ESSAI

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,1 g/L.

**Sérum-albumine bovine** : au maximum 50 ng par dose humaine unitaire, déterminé par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) si de la sérum-albumine bovine a été utilisée pendant la préparation du vaccin.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

**Pyrogènes** (*2.6.8*). Le vaccin satisfait à l'essai des pyrogènes. Injectez à chaque lapin, par kilogramme de masse corporelle, 1 dose de vaccin.

## ACTIVITÉ

L'activité du vaccin à examiner est déterminée par comparaison de la dose de vaccin requise pour protéger une proportion donnée de souris des effets de l'administration par voie intrapéritonéale d'une dose létale du virus de l'encéphalite verno-estivale avec la quantité d'un vaccin de référence qui apporte une protection équivalente. Pour permettre cette comparaison, il est nécessaire de disposer d'une préparation de référence approuvée et, pour l'épreuve virulente, d'une préparation appropriée d'un virus de l'encéphalite verno-estivale provenant d'une souche approuvée.

*La méthode ci-après est citée à titre d'exemple d'un essai qui s'est avéré satisfaisant pour un produit donné.*

*Choix des animaux et répartition en groupes.* Utilisez des souris saines issues d'un même élevage, pesant 11-17 g. Répartissez-les en au moins 6 groupes, d'effectif suffisant pour que les conditions de validité de l'essai soient satisfaites, plus au moins 4 groupes de 10 animaux pour le titrage de la suspension d'épreuve. Utilisez des souris du même sexe ou répartissez également les mâles et les femelles entre les différents groupes.

*Détermination de l'activité du vaccin.* Préparez une série d'au moins 3 dilutions du vaccin à examiner et une série équivalente de dilutions de la préparation de référence ; en général, 4 ou 5 dilutions sont nécessaires pour satisfaire aux critères de validité. Choisissez les dilutions de telle sorte que la suspension la plus concentrée soit supposée protéger plus de 50 pour cent des animaux, et la moins concentrée, moins de 50 pour cent des animaux. Attribuez chacune des dilutions respectivement à un des groupes de souris. Injectez à chaque souris, par voie sous-cutanée 0,2 mL de la dilution attribuée à son groupe. Effectuez 7 jours plus tard une seconde injection avec la même

échelle de dilutions puis, 14 jours après la seconde injection, préparez une suspension du virus d'épreuve contenant au minimum 100 $DL_{50}$ dans 0,2 mL. Injectez 0,2 mL de cette suspension virale, par voie intrapéritonéale, à chacune des souris vaccinées. Pour estimer la dose d'épreuve, préparez une série d'au moins 3 dilutions de la suspension d'épreuve, le facteur de dilution étant d'au maximum 100. Attribuez respectivement la suspension d'épreuve et chacune des dilutions à un des groupes de 10 souris et injectez à chaque souris 0,2 mL de la suspension d'épreuve ou de la dilution attribuée à son groupe. Placez les animaux en observation pendant 21 jours et notez le nombre de souris qui meurent de l'encéphalite verno-estivale dans les 7-21 jours suivant l'épreuve. Afin d'éviter d'inutiles souffrances aux animaux après l'épreuve virulente, des points limites plus précoces peuvent être utilisés.

*Calculs.* Effectuez les calculs par les méthodes statistiques habituelles pour un titrage fondé sur une réponse qualitative (par exemple *5.3*).

*Conditions de validité.* Le titrage n'est valable que si :

– la concentration du virus d'épreuve n'est pas inférieure à 100 $DL_{50}$,
– pour la préparation à examiner et la préparation de référence, la dose protectrice à 50 pour cent ($DP_{50}$) est comprise entre la plus faible et la plus forte des doses administrées aux souris,
– l'analyse statistique montre que les courbes dose-réponse ont une pente significative et ne présentent pas d'écart de linéarité ou de parallélisme significatif,
– les limites de confiance ($P$ = 0,95) obtenues sont comprises entre 33 pour cent et 300 pour cent de l'activité estimée.

*Activité.* Utilisez les résultats de tous les essais valables dans le calcul de l'activité moyenne et de ses limites de confiance ($P$ = 0,95). Dans le calcul des moyennes pondérées utilisez comme facteur de pondération la réciproque du carré de l'écart type. Le vaccin satisfait à l'essai si l'activité estimée n'est pas inférieure à la valeur approuvée par l'Autorité compétente, sur la base de données provenant d'essais d'efficacité clinique.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– la souche virale utilisée dans la préparation,
– la nature des cellules employées dans la production du vaccin.

**01/2010:1107**

# VACCIN INACTIVÉ DE L'HÉPATITE A ADSORBÉ

## Vaccinum hepatitidis A inactivatum adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin inactivé de l'hépatite A adsorbé est une suspension constituée d'une souche appropriée du virus de l'hépatite A cultivé en cultures cellulaires, inactivé par une méthode validée et adsorbé sur un support minéral.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

La production du vaccin est basée sur un système de lot de semence virale et un système de banque cellulaire. Il doit être démontré que le procédé de production utilisé donne de façon constante des vaccins satisfaisant aux exigences de pouvoir immunogène, d'innocuité et de stabilité.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

Sauf exception justifiée et autorisée, le virus contenu dans le vaccin final ne doit pas avoir subi, depuis le lot de semence primaire, un nombre de passages supérieur à celui utilisé pour préparer le vaccin dont les études cliniques ont démontré l'innocuité et l'efficacité.

*Préparation de référence.* Est utilisée comme préparation de référence, une partie d'un lot dont on a démontré que le pouvoir immunogène chez l'animal est au moins égal à celui d'un lot qui, lors d'études cliniques conduites chez de jeunes adultes sains, a produit 95 pour cent au moins de séroconversion après immunisation primaire. Le critère de séroconversion correspond au taux d'anticorps neutralisants reconnu comme protecteur ; un taux de 20 mUI/mL déterminé par un dosage immunologique à enzyme conjuguée est reconnu comme étant protecteur.

*SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

Le virus est multiplié dans une lignée de cellules diploïdes humaines (*5.2.3*) ou dans une lignée cellulaire continue approuvée par l'Autorité compétente.

*LOTS DE SEMENCE*

La souche de virus de l'hépatite A utilisée pour préparer le lot de semence primaire doit être identifiée par des données historiques indiquant notamment son origine et les manipulations qu'elle a subies par la suite.

Seul un lot de semence qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la multiplication du virus.

**Identification**. Chaque lot de semence primaire et de travail est identifié comme virus de l'hépatite A à l'aide d'anticorps spécifiques.

**Concentration en virus**. La concentration en virus de chaque lot de semence primaire et de travail est déterminée, afin de surveiller la régularité de la production.

**Agents étrangers**. Le lot de semence de travail satisfait aux exigences définies pour les lots de semence pour vaccins viraux (*2.6.16*). En outre, si des cellules primaires simiennes ont été utilisées dans l'isolement de la souche, les mesures nécessaires sont prises pour éviter la contamination de la souche par des virus simiens tels que le virus de l'immunodéficience simienne et les filovirus.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

Toutes les manipulations effectuées sur la banque de cellules et les cultures cellulaires dérivées sont conduites dans des conditions d'asepsie dans un local où ne sont pas manipulées d'autres cellules. Un sérum animal (à l'exclusion de sérum humain) peut être utilisé dans les milieux de culture cellulaire. L'absence d'agents étrangers dans le sérum et la trypsine employés pour la préparation des suspensions cellulaires et des milieux est vérifiée. Les milieux de culture cellulaire peuvent contenir un indicateur de pH, tel que le rouge de phénol, et des antibiotiques à la concentration correspondant au seuil minimal d'efficacité. Un volume de 500 mL au moins des cultures cellulaires utilisées pour la production du vaccin est réservé comme culture de cellules non infectées (cellules témoins). Les différentes récoltes obtenues à partir d'une même culture cellulaire de production peuvent être mélangées et considérées comme une récolte unique.

Seule une récolte unique qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée pour la préparation du vaccin. Lorsque la détermination du rapport entre la concentration en virus et la teneur en antigène a été effectuée sur un nombre approprié de récoltes uniques afin de démontrer la régularité du procédé de production, il est admis de ne plus l'effectuer en tant que contrôle de routine.

**Identification**. La détermination de la teneur en antigène sert également à identifier la récolte unique.

**Contamination bactérienne et fongique**. La récolte unique satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

Vaccins

**Mycoplasmes** (*2.6.7*). La récolte virale unique satisfait à l'essai des mycoplasmes. Utilisez 1 mL de préparation pour chaque milieu.

**Cellules témoins**. Les cellules témoins de la culture cellulaire de production satisfont à un essai d'identification et aux exigences concernant les agents étrangers (*2.6.16*).

**Teneur en antigène**. La teneur en antigène du virus de l'hépatite A est déterminée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), afin de surveiller la régularité de la production ; la teneur se situe dans les limites approuvées pour le produit particulier.

**Rapport entre la concentration en virus et la teneur en antigène**. Le rapport entre la concentration en virus infectieux, déterminée par une méthode appropriée en culture cellulaire, et la teneur en antigène est établi pour un nombre approprié de récoltes uniques afin de valider la reproductibilité de cette valeur.

*PURIFICATION ET RÉCOLTE PURIFIÉE*

La récolte, qui peut être un mélange de plusieurs récoltes uniques, est purifiée par des méthodes validées. Si la production est effectuée au moyen de lignées cellulaires continues, il doit être démontré que le procédé de purification employé réduit régulièrement la teneur en ADN issu de la cellule hôte.

Seule une récolte purifiée qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée pour la préparation de la récolte inactivée.

**Concentration en virus**. Le titre en virus infectieux de la récolte purifiée est déterminé par une méthode de culture cellulaire appropriée, comme paramètre de surveillance de la régularité de la production et comme point de départ dans le contrôle de la courbe d'inactivation.

**Rapport entre la teneur en antigène et la teneur en protéines totales**. La teneur en antigène du virus de l'hépatite A est déterminée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), et la teneur en protéines totales par une méthode validée. Le rapport entre la teneur en antigène de l'hépatite A et la teneur en protéines totales doit se situer dans les limites approuvées pour le produit particulier.

**Sérum-albumine bovine** : au maximum 50 ng par dose humaine unitaire, déterminé par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). Dans les cas appropriés, selon le procédé de fabrication, d'autres marqueurs protéiques appropriés peuvent être utilisés pour démontrer l'efficacité du procédé de purification.

**ADN résiduel de la cellule hôte**. Si le virus est multiplié sur une lignée cellulaire continue, la teneur en ADN résiduel des cellules hôtes, déterminée par une méthode appropriée, n'est pas supérieure à 100 pg dans l'équivalent d'une dose humaine unitaire.

**Résidus chimiques**. Si des substances chimiques sont utilisées au cours du procédé de purification, des recherches de ces substances sont effectuées sur la récolte purifiée (ou sur la récolte inactivée), sauf si la validation du procédé a démontré leur élimination totale. La teneur ne doit pas dépasser celle approuvée pour le produit considéré.

*INACTIVATION ET RÉCOLTE INACTIVÉE*

Avant de procéder à l'inactivation, il est possible de mélanger plusieurs récoltes purifiées. La formation d'agrégats viraux entraîne une inactivation incomplète : afin d'éviter un défaut d'inactivation des virus présents sous forme d'agrégats, il est nécessaire d'empêcher la formation de ces derniers ou de les éliminer immédiatement avant ou pendant le procédé d'inactivation. La suspension virale est inactivée par une méthode validée, dont il a été démontré qu'elle permet d'inactiver de façon constante le virus de l'hépatite A sans compromettre l'activité antigénique et le pouvoir immunogène ; lors de chaque inactivation, une courbe d'inactivation représentant l'évolution dans le temps de la concentration en virus infectieux résiduel, avec 3 mesures au moins (par exemple, aux jours 0, 1 et 2 du procédé d'inactivation), est établie. Si le formaldéhyde est employé pour l'inactivation, la présence d'un excès de formaldéhyde libre à la fin de l'inactivation est vérifiée.

Seule une récolte inactivée qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée pour préparer le vrac final.

**Inactivation**. Procédez à un essai d'enrichissement en virus infectieux résiduel de l'hépatite A. Inoculez à des cultures cellulaires du même type que celles utilisées pour la production du vaccin une quantité de la récolte inactivée équivalant à 5 pour cent du lot ou, si la récolte contient l'équivalent de 30 000 doses ou plus, 1500 doses au moins de vaccin ; faites incuber pendant un total d'au moins 70 jours en procédant à au moins 1 passage de cellules pendant cette période. A la fin de la période d'incubation, utilisez une méthode de sensibilité appropriée pour détecter le virus infectieux résiduel. Aucun signe de multiplication du virus de l'hépatite A n'est observé dans les échantillons prélevés à la fin de l'étape d'inactivation. Effectuez en parallèle des inoculums de virus infectieux comme témoins positifs pour vérifier la sensibilité des cellules et l'absence d'interférence.

**Stérilité** (*2.6.1*). La récolte virale inactivée satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 2 UI dans l'équivalent d'une dose humaine unitaire.

**Teneur en antigène**. Déterminez la teneur en antigène du virus de l'hépatite A par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

**Résidus chimiques**. Procédez selon les indications données sous Purification et récolte purifiée.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé à partir d'une ou plusieurs récoltes inactivées. Des adjuvants, des stabilisants et des conservateurs antimicrobiens approuvés peuvent être ajoutés.

Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. La teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti en récipients stériles dans des conditions aseptiques. Les récipients sont ensuite fermés de façon à empêcher toute contamination.

Seul un lot final qui satisfait à chacun des essais décrits ci-après sous Identification, Essai et Activité peut être libéré. Si l'essai du formaldéhyde libre (s'il y a lieu) et l'essai de teneur en conservateur antimicrobien (s'il y a lieu) ont été réalisés avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent être omis sur le lot final. Lorsque le titrage d'activité est effectué chez la souris ou chez d'autres animaux, s'il a été effectué avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, il peut être omis sur le lot final.

## IDENTIFICATION

Il est démontré que le vaccin contient l'antigène du virus de l'hépatite A, par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) utilisant des anticorps spécifiques, ou par le titrage de l'activité *in vivo* (*2.7.14*).

## ESSAI

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

Vaccins

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. Elle n'est pas inférieure à la teneur minimale reconnue comme étant efficace ni supérieure à 115 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

ACTIVITÉ

Le vaccin satisfait au titrage d'activité du vaccin de l'hépatite A (*2.7.14*).

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique l'origine biologique des cellules utilisées pour la préparation du vaccin.

**01/2008:0250**

# VACCIN MÉNINGOCOCCIQUE POLYOSIDIQUE

## Vaccinum meningococcale polysaccharidicum

DÉFINITION

Le vaccin méningococcique polyosidique est une préparation cryodesséchée d'un ou de plusieurs polyosides capsulaires purifiés obtenus à partir d'une ou de plusieurs souches appropriées de *Neisseria meningitidis*, groupe A, groupe C, groupe Y et groupe W135 qui sont capables d'assurer de façon régulière la production de polyosides.

Le polyoside de *N. meningitidis* groupe A est constitué par des unités répétées et partiellement *O*-acétylées de *N*-acétylmannosamine à liaisons diester phosphorique 1α→6.

Le polyoside de *N. meningitidis* groupe C est constitué par des unités répétées et partiellement *O*-acétylées d'acide sialique à liaisons glucosidiques 2α→9.

Le polyoside de *N. meningitidis* groupe Y est constitué par des unités partiellement *O*-acétylées d'acide sialique alternant avec des unités de D-glucose à liaisons glucosidiques 2α→6 et 1α→4.

Le polyoside de *N. meningitidis* groupe W135 est constitué par des unités partiellement *O*-acétylées d'acide sialique alternant avec des unités de D-galactose à liaisons glucosidiques 2α→6 et 1α→4.

L'ensemble du ou des composés polyosidiques indiqués sur l'étiquette, des ions calcium et de l'humidité résiduelle représente plus de 90 pour cent de la masse des préparations.

PRODUCTION

La production des polyosides méningococciques est basée sur un système de lot de semence. Il doit avoir été établi que le procédé de production employé donne de façon constante des vaccins méningococciques polyosidiques dont l'innocuité et le pouvoir immunogène pour l'homme sont satisfaisants.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

*LOTS DE SEMENCE*

Les souches de *N. meningitidis* utilisées pour préparer les lots de semence primaires doivent être identifiées par des données historiques indiquant notamment leur origine, par leurs caractéristiques biochimiques et sérologiques.

Les cultures préparées à partir de chaque lot de semence de travail doivent avoir les mêmes caractéristiques que la souche utilisée pour préparer le lot de semence primaire. Les souches présentent les caractéristiques suivantes :

– les colonies préparées à partir d'une culture se présentent sous forme de colonies arrondies, régulières, lisses, avec un aspect muqueux, opalescent et grisâtre,
– la coloration de Gram montre l'aspect caractéristique de diplocoques Gram négatif disposés en « grains de café »,
– le test à l'oxydase est positif,
– la culture utilise le glucose et le maltose,
– les suspensions de culture présentent des réactions d'agglutination positives avec les antisérums spécifiques appropriés.

La pureté des souches bactériennes utilisées pour le lot de semence est vérifiée par des méthodes de sensibilité appropriée. Ces méthodes peuvent comprendre un ensemencement en milieux appropriés, l'examen morphologique des colonies, l'examen microscopique de frottis à coloration de Gram et l'agglutination des cultures à l'aide d'antisérums spécifiques appropriés.

*CULTURES ET RÉCOLTE*

Les lots de semence de travail sont cultivés sur milieux solides ne contenant aucune substance de groupes sanguins ou provenant de mammifères. L'inoculum obtenu peut donner lieu à une ou plusieurs subcultures en milieux liquides avant d'être utilisé pour l'ensemencement du milieu final. Les milieux liquides utilisés ainsi que le milieu final sont des milieux hémisynthétiques exempts de substances précipitées par le bromure de cétrimonium (bromure d'hexadécyltriméthylammonium). Ils ne contiennent pas de substances de groupes sanguins ni de polyosides de masse moléculaire élevée.

La pureté bactérienne des cultures est vérifiée par des méthodes de sensibilité appropriée. Ces méthodes peuvent comprendre un ensemencement en milieux appropriés, l'examen morphologique des colonies, l'examen microscopique de frottis à coloration de Gram et l'agglutination des cultures à l'aide d'antisérums spécifiques appropriés.

Les cultures sont ensuite centrifugées et les polyosides sont précipités dans le surnageant par addition de bromure de cétrimonium. Le précipité obtenu est récolté et peut être conservé à – 20 °C en attente de purification.

*POLYOSIDES PURIFIÉS*

Les polyosides sont purifiés, après dissociation des complexes de polyosides et de bromure de cétrimonium, par élimination successive des acides nucléiques, des protéines et des lipopolysaccharides par des traitements appropriés.

L'étape finale de purification consiste en une précipitation éthanolique des polyosides qui sont ensuite desséchés sous vide et conservés à – 20 °C. La perte à la dessiccation est déterminée par thermogravimétrie (*2.2.34*). Ce pourcentage permet de calculer le résultat des autres essais chimiques par rapport à la substance desséchée.

Seuls des polyosides purifiés qui satisfont aux essais ci-après peuvent être utilisés dans la préparation du vrac final.

**Protéines** (*2.5.16*). La teneur en protéines par gramme de polyoside purifié, calculée par rapport à la substance desséchée, n'est pas supérieure à 10 mg.

**Acides nucléiques** (*2.5.17*). La teneur en acides nucléiques par gramme de polyoside purifié, calculée par rapport à la substance desséchée, n'est pas supérieure à 10 mg.

**Groupement *O*-acétyl** (*2.5.19*). La teneur en *O*-acétyl par gramme de polyoside purifié, calculée par rapport à la substance desséchée, est d'au minimum 2 mmol pour le polyoside du groupe A, d'au minimum 1,5 mmol pour le polyoside du groupe C et d'au minimum 0,3 mmol pour les polyosides des groupes Y et W135.

**Phosphore** (*2.5.18*). La teneur en phosphore par gramme de polyoside purifié, calculée par rapport à la substance desséchée, est d'au minimum 80 mg.

**Acide sialique** (*2.5.23*). La teneur en acide sialique par gramme de polyoside purifié, calculée par rapport à la substance desséchée, est d'au minimum 800 mg pour le polyoside purifié

Vaccins

du groupe C et d'au minimum 560 mg pour les polyosides purifiés des groupes Y et W135. Utilisez les solutions de référence suivantes.

Polyoside du groupe C : une solution d'*acide N-acétylneuraminique R* à 150 mg/L.

Polyoside du groupe Y : une solution à 95 mg/L d'*acide N-acétylneuraminique R* et à 55 mg/L de *glucose R*.

Polyoside du groupe W135 : une solution à 95 mg/L d'*acide N-acétylneuraminique R* et à 55 mg/L de *galactose R*.

**Calcium**. Si un sel de calcium est employé pendant la purification, effectuez une détermination de la teneur en calcium du polyoside purifié. La teneur se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Distribution de taille moléculaire**. Déterminez la taille moléculaire par chromatographie d'exclusion (*2.2.30*) sur *agarose pour chromatographie R* ou sur *agarose réticulé pour chromatographie R*. Utilisez une colonne d'une longueur de 0,9 m environ et d'un diamètre intérieur de 16 mm, équilibrée avec un solvant d'une force ionique de 0,2 mol/kg et d'un pH de 7,0-7,5. Utilisez une prise d'essai du vaccin à examiner contenant 2,5 mg environ de polyoside, dans un volume de 1,5 mL environ et éluez à un débit de 20 mL/h environ. Recueillez des fractions de 2,5 mL environ et déterminez la teneur en polyoside par une méthode appropriée. Au moins 65 pour cent du polyoside du groupe A, 75 pour cent du polyoside du groupe C, 80 pour cent du polyoside du groupe Y ou 80 pour cent du polyoside du groupe W135 sont élués avant qu'un coefficient de distribution ($K_0$) de 0,50 ne soit atteint. En outre, les pourcentages élués avant ce coefficient de distribution se situent dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Identification et spécificité sérologique**. L'identité et la spécificité sérologique sont déterminées par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). L'identité de chaque polyoside est démontrée ainsi que sa pureté ; le polyoside purifié contient au maximum 1 pour cent *m/m* de polyosides des groupes hétérologues de *N. meningitidis*.

**Pyrogènes** (*2.6.8*). Le polyoside satisfait à l'essai des pyrogènes. Injectez à chaque lapin par kilogramme de masse corporelle 1 mL d'une solution contenant 0,025 µg de polyoside purifié par millilitre.

*VRAC FINAL*

Un ou plusieurs polyosides purifiés d'un ou plusieurs groupes de *N. meningitidis* sont dissous dans un solvant approprié qui peut contenir un stabilisant. Après dissolution complète, la solution est stérilisée par filtration sur membrane.

Seul un vrac final qui satisfait à l'essai ci-après peut être utilisé pour la préparation du lot final.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité, effectué en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti en récipients stériles dans des conditions aseptiques. Les récipients sont ensuite fermés de façon à empêcher toute contamination.

Seul un lot final qui est conforme à chacun des essais décrits ci-après sous Identification, Essai et Dosage peut être libéré.

## CARACTÈRES

Poudre ou pastille blanche ou blanc crème, facilement soluble dans l'eau.

## IDENTIFICATION

Effectuez l'identification de chaque polyoside présent dans le vaccin par un essai immunochimique approprié (*2.7.1*).

## ESSAI

**Distribution de taille moléculaire**. Opérez par chromatographie d'exclusion (*2.2.30*). Utilisez une colonne d'une longueur de 0,9 m environ et d'un diamètre intérieur de 16 mm, équilibrée avec un solvant d'une force ionique de 0,2 mol/kg et d'un pH de 7,0-7,5. Utilisez une prise d'essai du vaccin à examiner contenant environ 2,5 mg de chaque polyoside, dans un volume de 1,5 mL environ et éluez à un débit de 20 mL/h environ. Recueillez des fractions de 2,5 mL environ et déterminez la teneur en polyoside par une méthode appropriée.

Dans le cas du vaccin bivalent (groupe A + groupe C) utilisez de l'*agarose réticulé pour chromatographie R*. Le vaccin satisfait à l'essai si :

– 65 pour cent de polyosides du groupe A sont élués avant $K_0$ = 0,50,

– 75 pour cent de polyosides du groupe C sont élués avant $K_0$ = 0,50.

Dans le cas du vaccin tétravalent (groupe A + groupe C + groupe Y + groupe W135) utilisez de l'*agarose réticulé pour chromatographie R1* et employez une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) pour reconstituer la courbe d'élution des différents polyosides. Le vaccin satisfait à l'essai si le pic principal se situe à un $K_0$ :

– inférieur ou égal à 0,70 pour les polyosides des groupes A et C,

– inférieur ou égal à 0,57 pour les polyosides du groupe Y,

– inférieur ou égal à 0,68 pour les polyosides du groupe W135.

**Eau** (*2.5.12*). Déterminée par semi-microdosage, la teneur en eau n'est pas supérieure à 3,0 pour cent.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin méningococcique polyosidique satisfait à l'essai de stérilité.

**Pyrogènes** (*2.6.8*). Le vaccin méningococcique polyosidique satisfait à l'essai des pyrogènes. Injectez à chaque lapin par kilogramme de masse corporelle 1 mL d'une solution contenant :

– 0,025 µg de polyoside pour un vaccin monovalent,

– 0,050 µg de polyoside pour un vaccin bivalent,

– 0,10 µg de polyoside pour un vaccin tétravalent.

## DOSAGE

Effectuez un dosage de chaque polyoside présent dans le vaccin méningococcique polyosidique.

Dans le cas d'un vaccin bivalent (groupe A + groupe C), utilisez le dosage du phosphore (*2.5.18*) pour déterminer la teneur en polyoside du groupe A et le dosage de l'acide sialique (*2.5.23*) pour déterminer la teneur en polyoside du groupe C. Pour la détermination de l'acide sialique dans le polyoside du groupe C, utilisez une solution de référence d'*acide N-acétylneuraminique R* à 150 mg/L.

Dans le cas d'un vaccin tétravalent (groupe A + groupe C + groupe Y + groupe W135), utilisez une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) et une préparation de référence du polyoside purifié de chaque groupe.

Le vaccin à examiner contient au minimum 70 pour cent et au maximum 130 pour cent de la quantité de chaque polyoside indiquée sur l'étiquette.

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le groupe ou les groupes de polyosides (A, C, Y ou W135) présents dans le vaccin,

– le nombre de microgrammes de chaque polyoside par dose humaine.

**01/2008:0966**

# VACCIN PNEUMOCOCCIQUE POLYOSIDIQUE

## Vaccinum pneumococcale polysaccharidicum

DÉFINITION

Le vaccin pneumococcique polyosidique est constitué par le mélange à parties égales des antigènes polyosidiques capsulaires purifiés obtenus à partir de souches pathogènes appropriées de *Streptococcus pneumoniae* dont il a été démontré que leurs capsules sont constituées de polyosides capables de susciter chez l'homme la production d'anticorps spécifiques, à des taux satisfaisants. Il contient les polyosides de 23 types capsulaires différents du point de vue immunochimique indiqués dans le tableau 0966.-1.

Le vaccin est un liquide limpide, incolore.

PRODUCTION

Le vaccin est préparé selon un système de lot de semence pour chaque type. Il doit être démontré que la méthode de production donne de façon constante des vaccins pneumococciques polyosidiques d'innocuité et de pouvoir immunogène satisfaisants chez l'homme.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait, s'il lui était appliqué, à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), modifié comme suit pour l'essai chez le cobaye : injectez 10 doses humaines par cobaye et observez les animaux pendant 12 jours.

*POLYOSIDES PURIFIÉS*

Les bactéries sont cultivées dans un milieu liquide approprié qui ne contient pas de substances de groupes sanguins ni de polyosides de masse moléculaire élevée. La pureté bactérienne de la culture est vérifiée, puis la culture est inactivée par le phénol. Les impuretés sont éliminées par différentes techniques telles que la précipitation fractionnée, la digestion enzymatique et l'ultrafiltration. Le polyoside est obtenu par précipitation fractionnée, lavé et séché sous vide jusqu'à obtention d'un produit ayant une teneur en eau démontrée favorable à la stabilité du polyoside. La teneur en humidité résiduelle est déterminée par dessiccation sous vide sur du pentoxyde de diphosphore, ou par thermogravimétrie, et la valeur obtenue est prise en compte dans le calcul des résultats des essais ci-après qui se réfèrent à la substance desséchée. Les polyosides purifiés sont conservés à une température appropriée dans des conditions qui évitent l'introduction d'humidité.
Seul un polyoside purifié qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du vrac final. Les limites pour cent des différents composants, déterminées par les méthodes indiquées ci-après, sont présentées dans le tableau 0966.-1.

**Protéines** (*2.5.16*).

**Acides nucléiques** (*2.5.17*).

**Azote total** (*2.5.9*).

**Phosphore** (*2.5.18*).

**Distribution de taille moléculaire**. Déterminez par chromatographie d'exclusion (*2.2.30*) sur *agarose réticulé pour chromatographie R* ou *agarose réticulé pour chromatographie R1*.

**Acides uroniques** (*2.5.22*).

**Hexosamines** (*2.5.20*).

**Méthylpentoses** (*2.5.21*).

**Groupes *O*-acétyle** (*2.5.19*).

**Identification** (*2.7.1*). Vérifiez l'identité du polyoside purifié par une méthode immunochimique par double diffusion ou par électroimmunodiffusion (sauf pour les polyosides 7F, 14 et 33F), avec un immunosérum spécifique du polyoside.

**Spécificité**. Aucune réaction ne se produit lorsque les antigènes sont essayés vis-à-vis de tous les immunosérums spécifiques des autres polyosides du vaccin, y compris les immunosérums qui différencient les types d'un même groupe. La concentration des polyosides est de 50 μL/mL et la méthode est capable de déceler 0,5 μL/mL.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est obtenu en mélangeant aseptiquement les différents polyosides purifiés sous forme de poudre. Le mélange homogène est dissous aseptiquement dans une solution isotonique appropriée de telle sorte qu'une dose humaine de 0,50 mL renferme 25 μg de chacun des types de polyosides. Un conservateur antimicrobien peut être ajouté. La solution est stérilisée par filtration sur une membrane retenant les bactéries.

Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable.
Seul un lot final qui est conforme à chacun des essais décrits ci-après sous Identification, Essai et Dosage peut être libéré. Si les essais du phénol et du conservateur antimicrobien ont été effectués avec de bons résultats sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final. Lorsque la régularité de la production a été établie sur un nombre approprié de lots consécutifs et si un dosage a été effectué sur chaque polyoside purifié utilisé dans la préparation du lot final, le dosage peut être remplacé par un essai qualitatif qui identifie chaque polyoside.

IDENTIFICATION

Le dosage sert également à identifier le vaccin.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*). Le pH du vaccin à examiner est de 4,5 à 7,4.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à la teneur minimale qui s'est révélée efficace ni supérieure à 115 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Phénol** (*2.5.15*). Le vaccin à examiner ne contient pas plus de 2,5 g/L de phénol.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin à examiner satisfait à l'essai de stérilité.

**Pyrogènes** (*2.6.8*). Le vaccin à examiner satisfait à l'essai des pyrogènes. Injectez à chaque lapin, par kilogramme de masse corporelle, 1 mL d'une dilution du vaccin contenant chaque polyoside à raison de 2,5 μg/mL.

DOSAGE

Déterminez la teneur de chaque polyoside par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) à l'aide d'immunosérums spécifiques de chaque polyoside entrant dans la composition du vaccin, y compris des immunosérums qui différencient les types d'un même groupe, et des polyosides purifiés de chaque type en tant qu'étalons.

Tableau 0966.-1. – *Limites (pour cent) appliquées aux polyosides purifiés*

| Type* | Protéines | Acides nucléiques | Azote total | Phosphore | Taille moléculaire ($K_0$) | | Acide uroniques | Hexos-amines | Méthyl-pentoses | Groupes *O*-acétyle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | ** | *** | | | | |
| 1 | ≤ 2 | ≤ 2 | 3,5-6 | 0-1,5 | ≤ 0,15 | | ≥ 45 | | | ≥ 1,8 |
| 2 | ≤ 2 | ≤ 2 | 0-1 | 0-1,0 | ≤ 0,15 | | ≥ 15 | | ≥ 38 | |
| 3 | ≤ 5 | ≤ 2 | 0-1 | 0-1,0 | ≤ 0,15 | | ≥ 40 | | | |
| 4 | ≤ 3 | ≤ 2 | 4-6 | 0-1,5 | ≤ 0,15 | | | ≥ 40 | | |
| 5 | ≤ 7,5 | ≤ 2 | 2,5-6,0 | ≤ 2 | | ≤ 0,60 | ≥ 12 | ≥ 20 | | |
| 6B | ≤ 2 | ≤ 2 | 0-2 | 2,5-5,0 | | ≤ 0,50 | | | ≥ 15 | |
| 7F | ≤ 5 | ≤ 2 | 1,5-4,0 | 0-1,0 | ≤ 0,20 | | | | ≥ 13 | |
| 8 | ≤ 2 | ≤ 2 | 0-1 | 0-1,0 | ≤ 0,15 | | ≥ 25 | | | |
| 9N | ≤ 2 | ≤ 1 | 2,2-4 | 0-1,0 | ≤ 0,20 | | ≥ 20 | ≥ 28 | | |
| 9V | ≤ 2 | ≤ 2 | 0,5-3 | 0-1,0 | | ≤ 0,45 | ≥ 15 | ≥ 13 | | |
| 10A | ≤ 7 | ≤ 2 | 0,5-3,5 | 1,5-3,5 | | ≤ 0,65 | | ≥ 12 | | |
| 11A | ≤ 3 | ≤ 2 | 0-2,5 | 2,0-5,0 | | ≤ 0,40 | | | | ≥ 9 |
| 12F | ≤ 3 | ≤ 2 | 3-5 | 0-1,0 | ≤ 0,25 | | | ≥ 25 | | |
| 14 | ≤ 5 | ≤ 2 | 1,5-4 | 0-1,0 | ≤ 0,30 | | | ≥ 20 | | |
| 15B | ≤ 3 | ≤ 2 | 1-3 | 2,0-4,5 | | ≤ 0,55 | | ≥ 15 | | |
| 17A ou 17F | ≤ 2 | ≤ 2 | 0-1,5 | 0-3,5 | | ≤ 0,45 | | | ≥ 20 | |
| 18C | ≤ 3 | ≤ 2 | 0-1 | 2,4-4,9 | ≤ 0,15 | | | | ≥ 14 | |
| 19A | ≤ 2 | ≤ 2 | 0,6-3,5 | 3,0-7,0 | ≤ 0,45 | | | ≥ 12 | ≥ 20 | |
| 19F | ≤ 3 | ≤ 2 | 1,4-3,5 | 3,0-5,5 | ≤ 0,20 | | | ≥ 12,5 | ≥ 20 | |
| 20 | ≤ 2 | ≤ 2 | 0,5-2,5 | 1,5-4,0 | | ≤ 0,60 | | ≥ 12 | | |
| 22F | ≤ 2 | ≤ 2 | 0-2 | 0-1,0 | | ≤ 0,55 | ≥ 15 | | ≥ 25 | |
| 23F | ≤ 2 | ≤ 2 | 0-1 | 3,0-4,5 | ≤ 0,15 | | | | ≥ 37 | |
| 33F | ≤ 2,5 | ≤ 2 | 0-2 | 0-1,0 | | ≤ 0,50 | | | | |

*La nomenclature danoise est utilisée pour les types de polyosides.

***Agarose réticulé pour chromatographie R.*

****Agarose réticulé pour chromatographie R1.*

Le vaccin contient au minimum 70 pour cent et au maximum 130 pour cent de la quantité indiquée sur l'étiquette pour chaque polyoside. Les limites de confiance ($P$ = 0,95) ne sont pas inférieures à 80 pour cent ni supérieures à 120 pour cent de la teneur estimée.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nombre de microgrammes de chaque polyoside par dose humaine,
– la quantité totale de polyoside dans le récipient.

**01/2008:2150**

# VACCIN PNEUMOCOCCIQUE POLYOSIDIQUE CONJUGUÉ ADSORBÉ

## Vaccinum pneumococcale polysaccharidicum coniugatum adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin pneumococcique polyosidique conjugué adsorbé est une solution stérile d'antigènes polyosidiques capsulaires purifiés, obtenus à partir de sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* conjugués individuellement à une protéine vectrice. Le vaccin peut être adsorbé sur un adjuvant ou un adsorbant approprié.

Chaque sérotype, produit à partir de souches pathogènes appropriées de *S. pneumoniae*, est cultivé sur milieu approprié.

Les polyosides individuels sont purifiés selon des méthodes de purification appropriées (par exemple : centrifugation, précipitation, ultrafiltration et chromatographie sur colonne).

Chaque polyoside est de composition et d'intervalle de taille moléculaire définis.

Le choix du polyoside dépend de la fréquence des sérotypes responsables de pathologies aiguës et de leur répartition géographique. Le vaccin contient des polyosides capsulaires différents du point de vue immunochimique.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit être démontré que la méthode de production donne de façon constante des vaccins conjugués de *S. pneumoniae* d'innocuité et de pouvoir immunogène satisfaisants chez l'homme. Les polyosides et la protéine vectrice sont préparés selon un système de lot de semence.

Pendant les études de développement et chaque fois qu'il est nécessaire de revalider le procédé de production, un essai des pyrogènes (*2.6.8*) est réalisé en injectant une dose appropriée du lot final à des lapins. Il est démontré que le vaccin est satisfaisant en ce qui concerne l'absence de pyrogène.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

Pendant les études de développement et chaque fois qu'il est nécessaire de revalider le procédé de production, il doit être démontré par un essai chez l'animal que le vaccin est capable d'induire de façon régulière une réponse immunitaire des lymphocytes B dépendante des lymphocytes T.

La stabilité du lot final et des osides pneumococciques est évaluée au moyen d'un ou de plusieurs essais indicatifs. Les essais indicatifs de stabilité sont par exemple la détermination de la taille moléculaire, la détermination de la teneur en oside et de la teneur en polyoside libre dans le conjugué.

*LOTS DE SEMENCE*

Les souches bactériennes utilisées pour préparer les lots de semence primaires doivent être identifiées par des données historiques indiquant notamment leur origine et par les essais utilisés pour caractériser la souche.

Les cultures préparées à partir du lot de semence de travail doivent avoir les mêmes caractéristiques que les souches utilisées pour préparer le lot de semence primaire.

La pureté des cultures bactériennes est contrôlée par des méthodes de sensibilité appropriée. Ces méthodes sont par exemple l'ensemencement sur milieux appropriés, l'examen de la morphologie des colonies, l'examen microscopique de frottis avec coloration de Gram et l'agglutination des cultures à l'aide d'antisérums spécifiques appropriés.

*POLYOSIDE PNEUMOCOCCIQUE*

Chaque souche des sérotypes de *S. pneumoniae* est cultivée individuellement dans un milieu liquide ne contenant pas de polyosides de masse moléculaire élevée ; si un ingrédient du milieu contient des substances de groupe sanguin, le procédé de fabrication est validé pour démontrer que, suite à l'étape de purification, de telles substances ne sont plus décelables. La pureté bactériologique de la culture est vérifiée par des méthodes appropriées. La culture est ensuite inactivée. Le polyoside est séparé du milieu de culture et purifié par une méthode appropriée. Les substances volatiles, dont l'eau, contenues dans le polyoside purifié sont déterminées par une méthode appropriée telle que la thermogravimétrie (*2.2.34*) ; le résultat de la détermination sert à calculer le résultat de certains essais chimiques par rapport à la substance desséchée, selon les indications ci-après.

Seul des polyosides satisfaisant aux exigences ci-après peuvent être utilisés pour la préparation du conjugué.

**Identification**. Chaque polyoside est identifié par une méthode immunochimique (*2.7.1*) ou toute autre méthode appropriée, par exemple, la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire $^{1}$H (*2.2.33*) (titrage relatif au groupe fonctionnel).

**Protéines** (*2.5.16*) : selon le sérotype utilisé, au maximum la limite approuvée pour le produit, calculé par rapport à la substance desséchée.

**Acides nucléiques** (*2.5.17*) : selon le sérotype utilisé, au maximum la limite approuvée pour le produit, calculé par rapport à la substance desséchée.

**Taille moléculaire**. Evaluez la taille moléculaire par chromatographie liquide (*2.2.29*) avec détection à angles multiples de dispersion de lumière laser ou par une autre méthode appropriée. Les résultats obtenus sont compris dans les limites approuvées pour chaque sérotype. Une méthode validée de détermination du degré de polymérisation ou de la moyenne massique de la masse moléculaire et de la dispersion de la masse moléculaire peuvent être utilisées au lieu de la détermination de la distribution de taille moléculaire.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le polyoside satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL pour chaque milieu ou l'équivalent de 100 doses pour chaque milieu, en choisissant la quantité minimale.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 0,5 UI par microgramme de polyoside.

**Résidus de réactifs**. Dans les cas appropriés, des essais sont effectués pour déterminer les résidus des réactifs utilisés pendant l'inactivation et la purification. Une valeur acceptable est établie pour chaque réactif et pour chaque produit considéré et il est démontré que chaque lot de polyoside est conforme à cette limite. Si les études de validation ont démontré l'élimination des résidus d'un réactif, l'essai sur le polyoside peut être omis.

*POLYOSIDES PNEUMOCOCCIQUES ACTIVÉS*

Le polyoside est activé par voie chimique avant la conjugaison ; il est généralement partiellement dépolymérisé avant ou pendant ce procédé.

Seul un polyoside activé satisfaisant aux exigences ci-après peut être utilisé pour la préparation du conjugué.

**Degré d'oxydation**. Le degré d'oxydation est représenté par le rapport des moles d'unité osidique constitutive par mole d'aldéhyde et déterminé par une méthode appropriée. Les résultats obtenus sont compris dans les limites approuvées pour chaque sérotype.

**Taille moléculaire**. Evaluez la taille moléculaire par chromatographie liquide (*2.2.29*) avec détection à angles multiples de dispersion de lumière laser ou par une autre méthode appropriée. Les résultats obtenus sont compris dans les limites approuvées pour chaque sérotype.

*PROTÉINE VECTRICE*

La protéine vectrice est produite par culture de microorganismes appropriés. La pureté bactériologique de la culture est vérifiée. La culture est inactivée. La protéine vectrice est purifiée par une méthode appropriée.

Seule une protéine vectrice qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée pour la préparation du conjugué.

**Identification**. La protéine vectrice est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

**Stérilité** (*2.6.1*). La protéine vectrice satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL pour chaque milieu ou l'équivalent de 100 doses pour chaque milieu, en choisissant la quantité minimale.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 1 UI par microgramme de protéine.

**Protéine vectrice** : au minimum 90 pour cent de la teneur totale en protéine, déterminé par une méthode appropriée. Des essais appropriés sont effectués pour la validation afin de démontrer que le produit n'est pas toxique.

*CONJUGUÉ MONOVALENT EN VRAC*

Le conjugué est obtenu en couplant les polyosides activés et la protéine vectrice par liaison covalente.

Les traitements de purification du conjugué sont destinés à éliminer les résidus de réactifs utilisés pour la conjugaison. L'élimination des réactifs résiduels est confirmée par des essais appropriés ou par la validation du procédé de purification.

Seul un conjugué en vrac qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la préparation du vrac final. Une valeur acceptable est établie pour chaque essai et il doit être démontré que chaque lot de conjugué est conforme à ces limites.

**Oside**. La teneur en polyoside est déterminée par une méthode physique ou chimique appropriée ou par un dosage immunochimique (*2.7.1*). Les résultats obtenus satisfont aux exigences approuvées pour chaque sérotype.

**Protéine**. La teneur en protéine est déterminée par une méthode physique ou chimique (*2.5.16*, par exemple). Les résultats obtenus satisfont aux exigences approuvées pour chaque sérotype.

**Rapport des teneurs en osides et protéines**. Déterminez le rapport des teneurs en osides et protéines par calcul. Le résultat obtenu satisfait aux exigences approuvées pour chaque sérotype.

**Oside libre**. La détermination est effectuée après élimination du conjugué, par exemple au moyen d'une chromatographie d'échange d'anions, d'exclusion ou hydrophobe, par ultrafiltration ou par d'autres procédés validés. Une valeur cohérente avec un pouvoir immunogène adéquat tel que démontré par les essais cliniques est établie pour chaque sérotype et il doit être démontré que chaque lot est conforme à ces limites.

**Protéine vectrice libre**. Déterminez la teneur en protéine vectrice libre par une méthode appropriée soit directement soit par calcul à partir des résultats des autres essais. La teneur est comprise dans les limites approuvées pour chaque sérotype.

**Taille moléculaire**. Evaluez la taille moléculaire par chromatographie liquide (*2.2.29*) avec détection à angles multiples de dispersion de lumière laser ou par une autre méthode appropriée. Les résultats obtenus sont compris dans les limites approuvées pour chaque sérotype.

**Résidus de réactifs**. Dans les cas appropriés, des essais sont effectués pour déterminer les résidus des réactifs utilisés pendant l'inactivation et la purification. Une valeur acceptable est établie pour chaque réactif et pour chaque produit considéré et il est démontré que chaque lot de conjugué est conforme à cette limite. Si les études de validation ont démontré l'élimination des résidus d'un réactif, l'essai sur le polyoside conjugué peut être omis.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le conjugué satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL pour chaque milieu ou l'équivalent de 100 doses pour chaque milieu, en choisissant la quantité minimale.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 0,75 UI par microgramme de polyoside.

*VRAC FINAL*

Les vracs monovalents individuels sont combinés pour former le vaccin. Un adjuvant peut être ajouté avant la dilution finale.

Seul un vrac final satisfaisant aux exigences suivantes et compris dans les limites approuvées pour le produit considéré peut être utilisé pour la préparation du lot final.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Seul un lot final compris dans les limites approuvées pour le produit considéré et conforme à chacun des essais décrits ci-après sous Identification, Essai et Dosage peut être libéré.

IDENTIFICATION

Identifiez chaque polyoside présent dans le vaccin par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

ESSAI

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin à examiner satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 12,5 UI par dose humaine unitaire, sauf exception justifiée et autorisée.

DOSAGE

**Teneur en oside**. Déterminez la teneur de chaque polyoside pour chaque sérotype par une méthode immunochimique appropriée (par exemple, par dosage néphélométrique). Le vaccin contient au minimum 70 pour cent et au maximum 130 pour cent de la quantité indiquée sur l'étiquette pour chaque polyoside. Les limites de confiance ($P$ = 0,95) du titrage ne sont pas inférieures à 80 pour cent ni supérieures à 120 pour cent de la teneur estimée.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nombre de microgrammes de chaque polyoside par dose humaine unitaire,
– le nombre de microgrammes de protéine vectrice par dose humaine unitaire.

**04/2010:0214**

# VACCIN POLIOMYÉLITIQUE INACTIVÉ

## Vaccinum poliomyelitidis inactivatum

DÉFINITION

Le vaccin poliomyélitique inactivé est une préparation liquide obtenue à partir de souches appropriées des virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3, cultivés en cultures cellulaires appropriées et inactivés par une méthode validée. Il se présente sous la forme d'un liquide limpide qui peut être coloré en raison de la présence d'un indicateur de pH.

PRODUCTION

Il convient d'établir que le procédé de production utilisé donne de façon constante des vaccins de pouvoir immunogène et d'innocuité acceptables chez l'homme.

Le vaccin est produit selon un système de lot de semence virale. Les lignées cellulaires sont utilisées selon un système de banque de cellules. Si des cellules rénales primaires, secondaires ou tertiaires de singe sont utilisées, la production satisfait aux spécifications indiquées ci-après.

Sauf exception justifiée et autorisée, le virus contenu dans le vaccin final ne doit pas avoir subi, depuis le lot de semence primaire, un nombre de passages supérieur à celui utilisé pour préparer le vaccin dont les études cliniques ont démontré l'innocuité et l'efficacité.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

*SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DES VIRUS*

Le virus est multiplié dans une lignée de cellules diploïdes humaines (*5.2.3*), dans une lignée continue de cellules (*5.2.3*) ou dans des cellules rénales primaires, secondaires ou tertiaires de singe.

**Cellules rénales primaires, secondaires ou tertiaires de singe**. Les spécifications particulières suivantes pour le substrat de multiplication du virus s'appliquent aux vaccins préparés sur cellules rénales primaires, secondaires ou tertiaires de singe.

*Singes employés dans la préparation des cultures de cellules rénales pour la production et le contrôle du vaccin*. Les animaux utilisés appartiennent à une espèce approuvée par l'Autorité compétente, en bonne santé et, sauf exception justifiée et autorisée, n'ayant jamais servi à aucune expérience. Les cellules rénales utilisées pour la production et le contrôle du vaccin sont obtenues à partir de singes élevés en colonies fermées et surveillées, et non d'animaux capturés dans le milieu naturel. Sous réserve de l'autorisation de l'Autorité compétente, un lot de semence déjà approuvé et préparé à partir de virus qui a subi un passage sur des cellules provenant de singes sauvages peut être utilisé dans la préparation du vaccin si les données historiques sur l'innocuité le justifient.

*Colonies fermées et surveillées de singes*. Les singes sont logés en groupes dans des cages. Pour prévenir la contamination par des agents étrangers, les animaux utilisés sont maintenus dans les colonies fermées, soumis à une surveillance vétérinaire et à des essais de laboratoire systématiques et continus afin de déceler la présence d'agents infectieux. Le fournisseur des animaux doit être agréé par l'Autorité compétente. Chaque singe subit des essais sérologiques à intervalles réguliers

pendant une période de quarantaine d'au moins 6 semaines avant d'entrer dans la colonie, puis pendant son séjour dans la colonie.

On vérifiera que les singes employés présentent une réaction négative vis-à-vis de la tuberculine et qu'ils sont exempts d'anticorps contre le virus simien 40 (SV40) et contre le virus de l'immunodéficience simienne. Le prélevèment de l'échantillon sanguin utilisé dans la recherche d'anticorps dirigés contre le SV40 doit être aussi proche que possible de la récolte des reins. Si des singes du genre *Macaca* sont utilisés pour la production, on vérifiera également qu'ils sont exempts d'anticorps contre l'herpèsvirus B (herpèsvirus 1 cercopithécin). L'herpèsvirus 1 humain a été utilisé comme indicateur de l'absence d'anticorps contre l'herpèsvirus B (herpèsvirus 1 cercopithécin) en raison du danger que comporte la manipulation de ce dernier.

Les singes dont les reins doivent être prélevés sont examinés avec soin, notamment pour déceler la tuberculose et une infection par l'herpèsvirus B (herpèsvirus 1 cercopithécin). Tout singe présentant une lésion pathologique en rapport avec l'utilisation de ses reins pour la préparation d'un lot de semence ou d'un vaccin ne sera pas utilisé, pas plus que ne le seront les autres singes du groupe concerné, à moins qu'il ne soit évident que leur emploi ne compromettra pas l'innocuité du produit.

Toutes les opérations décrites dans la présente section sont effectuées en dehors des locaux de production du vaccin.

*Cultures de cellules rénales de singe destinées à la production du vaccin*. Les reins utilisés pour la préparation des cultures de cellules ne doivent présenter aucun signe pathologique. Chaque groupe de cultures cellulaires provenant d'un singe constitue une culture cellulaire de production séparée d'où dérive une récolte unique séparée.

La suspension de cellules rénales primaires de singe satisfait à l'essai des mycobactéries (*2.6.2*) ; effectuez l'essai sur un lysat des cellules.

Si des cellules secondaires ou tertiaires sont utilisées, il sera démontré par des essais de validation appropriés que des cellules à un niveau de passage au-delà de celui utilisé pour la production sont exemptes de pouvoir tumorigène.

*LOTS DE SEMENCE*

L'identité des 3 souches de virus de la poliomyélite utilisées est attestée par des documents indiquant notamment leur origine et les manipulations qu'elles ont subies par la suite.
Seul un lot de semence de travail qui satisfait aux spécifications suivantes peut être utilisé pour la multiplication du virus.

**Identification**. Chaque lot de semence de travail est identifié comme virus poliomyélitique humain de type 1, 2 ou 3 par un essai de neutralisation du virus en cultures cellulaires à l'aide d'anticorps spécifiques.

**Concentration en virus**. La concentration en virus de chaque lot de semence de travail est évaluée de façon à déterminer la quantité de virus à utiliser lors de l'inoculation des cellules de production.

**Agents étrangers**. Le lot de semence de travail satisfait aux spécifications définies pour les lots de semence pour vaccins viraux (*2.6.16*). En outre, si des cellules rénales primaires, secondaires ou tertiaires de singe ont été utilisées dans l'isolement de la souche, les contrôles sont pratiqués pour s'assurer que ces virus ne sont pas contaminés par des virus simiens tels que le virus de l'immunodéficience simienne, le virus simien 40, les filovirus et l'herpèsvirus B (herpèsvirus 1 cercopithécin). Un lot de semence de travail préparé dans des cellules rénales primaires, secondaires ou tertiaires de singe satisfait également aux spécifications données ci-après sous Multiplication et récolte du virus pour les récoltes uniques préparées sur de telles cellules.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

Toutes les manipulations effectuées sur la banque de cellules et les cultures cellulaires sont conduites dans des conditions aseptiques dans des locaux où ne sont pas manipulés simultanément d'autres cellules ou d'autres virus. Un sérum animal approuvé (à l'exclusion de sérum humain) peut être utilisé dans les milieux de culture cellulaire. L'absence d'agents étrangers dans le sérum et la trypsine employés pour la préparation des suspensions cellulaires et des milieux est vérifiée. Les milieux de culture cellulaire peuvent contenir un indicateur de pH, tel que le rouge de phénol, et des antibiotiques approuvés, à la concentration correspondant au seuil d'efficacité. Réservez un volume correspondant à au moins 500 mL des cultures cellulaires utilisées pour la production du vaccin comme culture de cellules non infectées (cellules témoins). Dans le cas d'utilisation d'une lignée continue de cellules cultivée en fermenteur, prélevez $200 \times 10^6$ cellules pour la préparation des cellules témoins. Dans le cas d'utilisation de cellules rénales primaires, secondaires ou tertiaires de singe, prélevez un échantillon équivalant à au moins 500 mL de la suspension cellulaire à la concentration employée pour la production (cellules témoins).
Seule une récolte unique qui satisfait aux spécifications suivantes peut être utilisée dans la préparation du vaccin.
Les essais d'identification et de contamination bactérienne et fongique peuvent être effectués sur le mélange de récoltes monovalentes purifiées plutôt que sur la récolte unique. L'essai de concentration en virus peut être effectué sur le mélange de récoltes monovalentes purifiées plutôt que sur la récolte unique, après que la régularité de la production au stade de la récolte unique a été démontrée.

**Cellules témoins**. Les cellules témoins de la culture cellulaire de production satisfont à un essai d'identification (si un système de banque de cellules est utilisé pour la production) et aux spécifications des agents étrangers (*2.6.16* ; si des cellules rénales primaires, secondaires ou tertiaires de singe sont utilisées pour la production, les essais sur cultures cellulaires sont effectués comme décrit ci-après sous Essai dans des cultures de cellules rénales de lapin et Essai dans des cultures de cellules rénales de cercopithecus).

*Essai dans des cultures de cellules rénales de lapin*. Examinez un échantillon d'au moins 10 mL du mélange de surnageant de cellules témoins par inoculation à des cultures de cellules rénales de lapin afin de déceler l'herpèsvirus B (herpèsvirus 1 cercopithécin) et d'autres virus. La dilution du surnageant dans le milieu nutritif ne doit pas dépasser 1/4 et la surface de la couche cellulaire doit être d'au moins 3 $cm^2$ par millilitre d'inoculum. Maintenez un ou plusieurs récipients de chaque lot de cellules avec le même milieu comme cellules témoins non-ensemencées. Faites incuber les cultures à 37 °C et observez-les pendant au moins 2 semaines. L'essai n'est pas valable si plus de 20 pour cent des cultures témoins sont rejetées pour des raisons non spécifiques accidentelles.

*Essai dans des cultures de cellules rénales de cercopithecus*. Examinez un échantillon d'au moins 10 mL du mélange de surnageant des cellules témoins, afin de déceler le virus SV40 et d'autres agents étrangers, par inoculation à des cultures cellulaires préparées à partir de reins de singes cercopithecus, ou d'autres cellules démontrées au moins aussi sensibles au SV40 ; procédez comme décrit sous Essai dans des cultures de cellules rénales de lapin. L'essai n'est pas valable si plus de 20 pour cent des cultures témoins sont rejetées pour des raisons non spécifiques accidentelles.

**Identification**. La récolte unique est identifiée comme contenant du virus poliomyélitique humain de type 1, 2 ou 3 par un essai de neutralisation du virus en cultures cellulaires à l'aide d'anticorps spécifiques.

**Concentration en virus**. La concentration en virus de la récolte unique est déterminée en titrant le pouvoir infectieux du virus sur cultures cellulaires.

**Contamination bactérienne et fongique**. La récolte unique satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de récolte pour chaque milieu.

**Mycoplasmes** (*2.6.7*). La récolte unique satisfait à l'essai des mycoplasmes. Utilisez 10 mL de récolte.

**Essai dans des cultures de cellules rénales de lapin**. Si la production est effectuée sur des cellules rénales primaires, secondaires ou tertiaires de singe, examinez un échantillon d'au moins 10 mL de la récolte unique, afin de déceler l'herpèsvirus B (herpèsvirus 1 cercopithécin) et d'autres virus, par inoculation à des cultures de cellules rénales de lapin comme décrit ci-dessus pour les cellules témoins.

**Essai dans des cultures de cellules rénales de cercopithecus**. Si la production est effectuée sur des cellules rénales primaires, secondaires ou tertiaires de singe, examinez un échantillon d'au moins 10 mL de la récolte unique, afin de déceler le virus SV40 et d'autres agents étrangers. Neutralisez l'échantillon à l'aide d'un antisérum de titre élevé contre le type de virus poliomyélitique présent. Effectuez l'essai sur des cellules rénales primaires de cercopithecus ou sur des cellules démontrées au moins aussi sensibles au SV40. Faites incuber les cellules à 37 °C et observez pendant 14 jours. A la fin de cette période, effectuez au moins une subculture de liquide dans des cellules du même système et observez les cultures primaires et les subcultures pendant encore 14 jours.

*PURIFICATION ET RÉCOLTE MONOVALENTE PURIFIÉE*

Plusieurs récoltes uniques de même type peuvent être mélangées et éventuellement concentrées. La récolte monovalente ou le mélange de récoltes monovalent est purifié par des méthodes validées. Si la production est effectuée sur lignées cellulaires continues, il convient de démontrer que le procédé de purification employé réduit régulièrement la teneur en ADN issu des cellules du substrat à 100 pg maximum par dose humaine unitaire.

Seule une récolte monovalente purifiée qui satisfait aux spécifications suivantes peut être utilisée pour la préparation de la récolte monovalente inactivée.

**Identification**. Le virus est identifié soit par neutralisation en cultures cellulaires à l'aide d'anticorps spécifiques, soit par détermination de l'antigène D.

**Concentration virale**. La concentration en virus est déterminée en titrant le pouvoir infectieux.

**Activité spécifique**. Le rapport entre la concentration en virus ou la teneur en antigène D, déterminée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), et la teneur en protéines totales (activité spécifique) de la récolte monovalente purifiée se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

*INACTIVATION ET RÉCOLTE MONOVALENTE INACTIVÉE*

Avant de procéder à l'inactivation, il est possible de mélanger plusieurs récoltes monovalentes purifiées de même type. Afin d'éviter les défauts d'inactivation dus à la présence d'agrégats viraux, on procède à une filtration avant et pendant le procédé d'inactivation. Le procédé d'inactivation est déclenché dans un délai approprié suivant la filtration préalable ; ce délai est de préférence inférieur à 24 h et dans tous les cas doit être inférieur à 72 h. La suspension virale est inactivée par une méthode validée dont il a été démontré qu'elle permet d'inactiver le virus poliomyélitique sans compromettre le pouvoir immunogène ; pendant les études de validation, une courbe d'inactivation représentant la diminution dans le temps de la concentration en virus vivant résiduel avec au moins 4 mesures (par exemple : temps 0 h, 24 h, 48 h et 96 h) est établie. Si le formaldéhyde est employé pour l'inactivation, la présence d'un excès de formaldéhyde libre à la fin de l'inactivation est vérifiée. Les essais de cinétique d'inactivation mentionnés ci-après sont effectués sur chaque lot pour s'assurer de la régularité du procédé d'inactivation.

Seule une récolte monovalente inactivée qui satisfait aux essais suivants peut être utilisée dans la préparation d'un concentré trivalent ou d'un vrac final.

**Essai d'inactivation**. Après neutralisation du formaldéhyde par le bisulfite de sodium (si nécessaire), vérifiez, par inoculation de cultures cellulaires appropriées, l'absence de virus poliomyélitique vivant résiduel dans 2 échantillons de chaque récolte monovalente inactivée correspondant au moins à 1500 doses humaines. Les cellules utilisées pour cet essai doivent être de sensibilité optimale par rapport au virus poliomyélitique infectieux résiduel. Par exemple, des cellules rénales provenant de certaines espèces de singes (*Macaca*, *Cercopithecus* ou *Papio*) ou des cellules Hep-2 peuvent être utilisées. Si d'autres cellules sont utilisées, il doit avoir été démontré qu'elles sont de sensibilité au moins égale à celle des cellules spécifiées ci-dessus. Un échantillon est prélevé au plus tard aux 3/4 de l'opération et l'autre à la fin de la période d'inactivation. Inoculez les 2 échantillons sur des cultures cellulaires de façon que la dilution du vaccin dans le liquide nutritif ne dépasse pas 1/4 et que la surface de la couche cellulaire soit d'au moins 3 $cm^2$ par millilitre d'inoculum. Mettez de côté, pour servir de boîtes témoins non inoculées contenant le même milieu, une ou plusieurs boîtes de cultures. Les boîtes de cultures cellulaires sont maintenues en observation pendant au moins 3 semaines. Procédez au minimum à 2 repiquages à partir de chaque boîte, l'un à la fin de la période d'observation et l'autre 1 semaine avant la fin de cette période. Les repiquages sont effectués à partir du surnageant des cultures et l'inoculation est faite de la même manière que pour l'échantillon d'origine. Maintenez les repiquages en observation pendant au moins 2 semaines. Aucun signe de multiplication du virus poliomyélitique n'est observé dans les cultures cellulaires. A la fin de la période d'observation, la sensibilité de la culture cellulaire utilisée est éprouvée au moyen d'un virus poliomyélitique vivant du même type que celui présent dans la récolte monovalente inactivée.

**Cinétiques d'inactivation**. Des cinétiques d'inactivation sont établies et approuvées par l'Autorité compétente. Des données appropriées relatives aux cinétiques d'inactivation sont obtenues et la régularité du procédé d'inactivation est contrôlée.

**Stérilité** (*2.6.1*). La récolte monovalente inactivée satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

**Teneur en antigène D**. Déterminez la teneur en antigène D par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La teneur se situe dans les limites approuvées pour la préparation considérée.

*VRAC FINAL*

Le vrac final peut être préparé soit directement à partir de la récolte des monovalents inactivés de virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3, soit à partir d'un mélange trivalent de récoltes monovalentes inactivées. Un stabilisant et un conservateur antimicrobien appropriés peuvent être ajoutés.

Seul un vrac final qui satisfait aux spécifications suivantes peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

**Conservateur antimicrobien**. Déterminez dans les cas appropriés la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. Elle n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

*LOT FINAL*

Seul un lot final satisfaisant à chacun des essais décrits sous Identification, Essai et Activité peut être libéré. Si les essais de formaldéhyde libre et de conservateur antimicrobien et la détermination d'activité *in vivo* ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

Le titrage d'activité *in vivo* peut ne pas être effectué s'il a été démontré sur un produit donné et pour chaque type de poliovirus, que les critères d'acceptation de la détermination de la teneur en antigène D sont tels qu'ils fournissent les mêmes résultats que le titrage d'activité *in vivo* en termes d'acceptation ou de rejet d'un lot. Cette démonstration doit comprendre des essais sur des lots à activité altérée, produits de manière expérimentale si nécessaire via un traitement par la chaleur par exemple ou d'autres moyens permettant de diminuer l'activité immunogène. En cas de modification significative du procédé

de production des antigènes ou de leur formulation, l'impact sur les titrages d'activité *in vivo* et *in vitro* devra être évalué, et le besoin de revalidation devra être considéré.

S'il a été démontré, sur les récoltes monovalentes purifiées ou sur les récoltes monovalentes inactivées, que la teneur en protéines du lot final ne dépasserait pas 10 µg par dose humaine unitaire, l'essai de la teneur en protéines peut ne pas être effectué sur le lot final.

Si l'essai de sérum-albumine bovine a été effectué avec des résultats satisfaisants sur le mélange trivalent de récoltes monovalentes inactivées ou sur le vrac final, il peut ne pas être effectué sur le lot final.

## IDENTIFICATION

Il est démontré que le vaccin contient les virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3, par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) telle que la détermination de l'antigène D par immunoadsorption à enzyme conjuguée (ELISA).

## ESSAI

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Déterminez dans les cas appropriés la teneur en conservateur antimicrobien par une méthode chimique ou physicochimique appropriée. Elle n'est pas inférieure à la valeur établie comme seuil d'efficacité ni supérieure à 115 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

**Teneur en protéines** (*2.5.33, Méthode 2*) : au maximum 10 µg par dose humaine unitaire.

**Sérum-albumine bovine** : au maximum 50 ng par dose humaine unitaire, déterminé par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 5 UI par dose humaine unitaire.

## ACTIVITÉ

**Teneur en antigène D**. Afin de contrôler la régularité de la production, déterminez la teneur en antigène D pour les virus poliomyélitiques humains de type 1, 2 et 3 par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), en utilisant une préparation de référence étalonnée en Unités Pharmacopée Européenne d'antigène D. Pour chaque type, la teneur mesurée, exprimée par rapport à la teneur en antigène D indiquée sur l'étiquette, se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré. Le *vaccin poliomyélitique inactivé PBR*, étalonné en Unités Pharmacopée Européenne, est destiné à être utilisé pour la détermination de la teneur en antigène D. L'Unité Pharmacopée Européenne et l'unité internationale sont équivalentes.

**Essai *in vivo***. Le vaccin satisfait au titrage *in vivo* du vaccin poliomyélitique inactivé (*2.7.20*).

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- les types de virus poliomyélitique présents dans le vaccin,
- la quantité nominale du virus de chaque type (1, 2 et 3), exprimée en Unités Pharmacopée Européenne d'antigène D, par dose humaine unitaire,
- le substrat cellulaire utilisé pour la préparation du vaccin.

**04/2008:0215**

# VACCIN POLIOMYÉLITIQUE ORAL

## Vaccinum poliomyelitidis perorale

## DÉFINITION

Le vaccin poliomyélitique oral est une préparation obtenue à partir de souches approuvées du virus poliomyélitique vivant atténué du type 1, 2 ou 3, cultivées dans des cultures cellulaires *in vitro* approuvées. Il contient l'un des types viraux ou une combinaison quelconque des 3 types de souches de Sabin et est présenté sous une forme adaptée à l'administration orale.

La vaccin se présente sous la forme d'un liquide limpide qui peut être coloré en raison de la présence d'un indicateur de pH.

## PRODUCTION

Il doit être démontré que les souches vaccinales et la méthode de production utilisées donnent de façon constante des vaccins poliomyélitiques oraux d'un pouvoir immunogène et d'une innocuité adéquats pour l'homme.

La production du vaccin est basée sur un système de lot de semence virale. Les lignées cellulaires sont utilisées selon un système de banque de cellules. S'il s'agit de cellules rénales primaires de singe, la production satisfait aux exigences particulières indiquées ci-après. Sauf exception justifiée et autorisée, le virus contenu dans le vaccin final ne doit pas avoir subi plus de 2 passages depuis le lot de semence primaire.

### PRÉPARATIONS DE RÉFÉRENCE

Le *vaccin poliomyélitique oral types 1, 2, 3 PBR* convient comme préparation de référence du virus dans l'essai de concentration en virus infectieux.

Les étalons internationaux du poliovirus de type 2 (Sabin) pour l'analyse par titrage MAPREC (analyse des virus mutants par PCR et coupure par enzyme de restriction) et du poliovirus de type 3, Sabin, ADN synthétique pour l'analyse par titrage MAPREC sont appropriés pour l'essai des marqueurs génétiques et les essais moléculaires pour la régularité de la production.

Des préparations de référence pour chaque type de poliovirus au niveau Sabin initial plus 2 passages, à savoir WHO (SO + 2)/I pour le virus de type 1, WHO (SO + 2)/II pour le virus de type 2 et WHO (SO + 2)/III pour le virus de type 3 sont disponibles pour la comparaison de la neurovirulence *in vivo* avec celle des vaccins homotypiques. Les demandes de préparations de référence internationales pour les essais de neurovirulence *in vivo* sont à effectuer auprès de l'OMS, Organisation Mondiale de la Santé, Service des produits biologiques, Genève, Suisse.

Une préparation de référence appropriée doit être incluse dans chaque essai.

*SUBSTRAT POUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS*

Le virus est multiplié dans des cellules diploïdes humaines (*5.2.3*), dans des lignées cellulaires continues (*5.2.3*) ou dans des cellules rénales primaires de singe (y compris des cellules ayant subi des passages en série à partir de cellules rénales primaires de singe).

**Cellules rénales primaires de singe**. *Les exigences particulières suivantes pour le substrat pour la multiplication du virus s'appliquent aux vaccins préparés sur cellules rénales primaires de singe.*

*Singes employés pour la préparation des cultures de cellules rénales primaires de singe et pour l'essai du virus.* Si le vaccin est préparé sur des cultures de cellules rénales primaires de singe, on utilisera des animaux appartenant à une espèce approuvée par l'Autorité compétente, en bonne santé, maintenus en colonies fermées ou sous surveillance intensive, et n'ayant jamais servi à aucune expérience.

Les singes seront logés dans des cages aussi espacées que possible, dans une animalerie bien construite et suffisamment aérée. On prendra les précautions nécessaires pour éviter toute infection croisée d'une cage à l'autre. On ne mettra pas plus de

Vaccins

2 singes par cage et on évitera tout échange d'animaux entres les cages. Avant d'être utilisés, ces singes seront maintenus dans le pays de fabrication du vaccin en groupes quarantenaires pendant une période d'au moins 6 semaines. Un groupe quarantenaire est une colonie de singes sélectionnés, en bonne santé, logés dans un local disposant d'installations de nettoyage et d'alimentation séparées, et privés de tout contact avec d'autres singes pendant toute la période de quarantaine. Si, à un moment quelconque de la période de quarantaine, le taux global de mortalité d'un ou plusieurs groupes atteint 5 pour cent (à l'exclusion des morts dues à des accidents ou à des causes manifestement sans rapport avec une maladie infectieuse), tous les singes de ces groupes seront remis en quarantaine pendant au moins 6 semaines. Même après la fin de la quarantaine, les groupes seront isolés en permanence dans les mêmes conditions jusqu'au moment de l'utilisation des animaux. Lorsque le dernier singe d'un groupe aura été utilisé, le local ayant servi à loger ce groupe sera soigneusement nettoyé et décontaminé avant d'accueillir un nouveau groupe. Si on utilise des reins de singes obtenus par césarienne avant terme, la mère doit être mise en quarantaine jusqu'à la fin de la gestation.

Les singes dont on prélèvera les reins seront anesthésiés et examinés avec soin, à la recherche notamment d'une tuberculose ou d'une infection à virus herpétique des cercopithécidés type 1 (virus B).

Tout singe présentant une lésion pathologique en rapport avec l'utilisation de ses reins pour la préparation d'un lot de semence ou d'un vaccin ne sera pas utilisé, pas plus que ne le seront les autres singes du groupe quarantenaire concerné, à moins qu'il ne soit évident que leur emploi ne compromettra pas l'innocuité du produit.

Toutes les opérations décrites dans la présente section seront effectuées en dehors des locaux de production du vaccin.

On vérifiera que les singes employés sont exempts d'anticorps contre le virus simien 40 (SV40), contre le virus de l'immunodéficience simienne et contre les spumavirus. L'échantillon sanguin utilisé dans la recherche d'anticorps dirigés contre le SV40 doit être prélevé dès que possible après l'ablation des reins. Si des singes *Macaca* spp. sont utilisés pour la production, on vérifiera également qu'ils sont exempts d'anticorps contre le virus herpétique des cercopithécidés type 1 (virus B). Le virus herpétique humain a été utilisé comme indicateur de l'absence d'anticorps contre le virus herpétique des cercopithécidés type 1 (virus B) en raison du danger que comporte la manipulation de ce dernier. Il est établi que les singes utilisés pour la production de nouveaux lots de semence sont exempts d'anticorps dirigés contre le cytomégalovirus simien (sCMV).

*Cultures de cellules rénales primaires de singe destinées à la production du vaccin*. Les reins utilisés pour la préparation des cultures de cellules ne présenteront aucun signe pathologique. Si les singes proviennent d'une colonie maintenue en vue de la production de vaccin, des cellules repiquées en série à partir de cellules primaires rénales de singe peuvent être utilisées, sinon les cellules ne seront pas repiquées en série. Le virus est cultivé dans des conditions d'asepsie. Du sérum animal peut être utilisé dans le milieu pour la croissance cellulaire, mais le milieu utilisé pour maintenir la croissance cellulaire en cours de multiplication virale ne doit pas contenir de sérum.

Chaque groupe de cultures cellulaires provenant d'un singe ou d'au maximum 10 foetus de singes obtenus par césarienne avant terme sera préparé et contrôlé séparément.

*LOTS DE SEMENCE*

L'identité et l'historique des souches de virus poliomyélitique utilisées doivent être attestées par des documents contenant notamment des informations relatives à l'origine des souches et aux manipulations qu'elles ont subies.

Les lots de semence de travail doivent avoir subi un seul passage à partir du lot de semence primaire et un nombre de passages approuvé à partir du virus de Sabin initial. Les lots de semence viraux sont préparés en grande quantité et conservés à une température inférieure à − 60 °C.

Seul un lot de semence qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la multiplication du virus.

**Identification**. Chaque lot de semence de travail est identifié comme étant le virus poliomyélitique du type indiqué à l'aide d'anticorps spécifiques.

**Concentration en virus**. Déterminée par la méthode spécifiée ci-après, la concentration en virus sert à établir la quantité de virus à utiliser dans l'essai de neurovirulence.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). S'ils sont produits sur des cellules diploïdes humaines ou sur une lignée cellulaire continue, les lots de semence de travail satisfont aux exigences pour les lots de semence des vaccins viraux. S'ils sont produits sur des cellules rénales primaires de singe, les lots de semence de travail satisfont aux exigences données sous Multiplication et récolte du virus et sous Mélange monovalent de récoltes et aux essais chez les souris adultes, les souriceaux et les cobayes prescrits dans le chapitre *2.6.16*.

Outre les exigences du chapitre *2.6.16*, dans le cas des vaccins produits sur lignées cellulaires et lorsque le lot de semence est produit sur des cultures de cellules rénales primaires de singe, un essai validé de sCMV doit être effectué.

Les lots de semence de travail doivent être exempts de séquences d'ADN décelables provenant du virus simien 40 (SV40).

**Neurovirulence**. Chaque lot de semence primaire et chaque lot de semence de travail satisfont à l'essai de neurovirulence du vaccin poliomyélitique oral sur singes (*2.6.19*). De plus, il doit être démontré qu'au moins les 4 premiers lots consécutifs de mélanges monovalents de récoltes préparés à partir de ces lots de semence satisfont à l'essai de neurovirulence du vaccin poliomyélitique oral sur singe (*2.6.19*) avant que le lot de semence ne soit considéré comme convenable pour son utilisation. En outre, un lot de semence doit cesser d'être utilisé pour la production de vaccin si la fréquence d'obtention de résultats non conformes, pour les mélanges monovalents de récoltes qui en sont issus, devient supérieure à la valeur prédite statistiquement. Cette valeur est estimée à chaque contrôle, sur la totalité des vracs contrôlés et est donnée par la probabilité de faux rejet lors d'un premier contrôle (c'est-à-dire 1 pour cent), la probabilité de faux rejet lors d'une répétition étant négligeable. Si l'essai n'est effectué que par le fabricant, les lames de l'essai sont soumises à l'Autorité de contrôle pour examen.

**Marqueurs génétiques**. Chaque lot de semence de travail est soumis à l'essai décrit sous Mélange monovalent de récoltes pour établir sa capacité à se multiplier aux températures comprises entre 36 °C et 40 °C. Un profil (pourcentage de mutants) des récoltes de virus est préparé à l'aide du titrage MAPREC. Les lots de semence de virus type 3 satisfont au titrage MAPREC décrit sous Mélange monovalent de récoltes.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

Toutes les manipulations effectuées sur la banque de cellules et les cultures cellulaires dérivées sont conduites dans des conditions d'asepsie, dans un endroit où d'autres cellules ne sont pas manipulées pendant la production. Un sérum animal approprié (à l'exclusion du sérum humain) peut être utilisé dans la composition des milieux de culture, mais le milieu final utilisé pour maintenir la croissance cellulaire pendant la multiplication virale ne doit pas contenir de sérum animal. Il est démontré que le sérum et la trypsine utilisés dans la préparation des suspensions de cellules et des milieux de culture sont exempts d'agents étrangers. Le milieu de culture cellulaire peut contenir un indicateur de pH, tel que le rouge de phénol, et des antibiotiques appropriés à la plus faible concentration efficace. Il est souhaitable d'utiliser un substrat exempt d'antibiotiques pendant la production. Le jour de l'inoculation avec le lot de semence de travail de virus, conservez au moins

5 pour cent ou 1000 mL, en choisissant la quantité moindre, des cultures cellulaires utilisées dans la production du vaccin comme cultures cellulaires non infectées (cellules témoins) ; des exigences particulières données ci-après s'appliquent aux cellules témoins si le vaccin est produit sur cellules rénales primaires de singe. La récolte du virus est effectuée au plus tard 4 jours après l'inoculation. Une fois les cellules productrices mises en contact avec le lot de semence de travail du virus, les cultures cellulaires infectées sont maintenues à une température déterminée, qui a été démontrée appropriée, entre 33 °C et 35 °C ; la température est maintenue constante à ± 0,5 °C près ; les cultures cellulaires témoins sont maintenues à 33-35 °C pendant la durée d'incubation appropriée.

Seule une récolte unique satisfaisant aux exigences ci-après peut être utilisée dans la préparation du mélange monovalent de récoltes.

**Concentration en virus**. La concentration en virus dans les récoltes de virus est déterminée comme prescrit sous Dosage afin de s'assurer de la régularité de la production et de déterminer la dilution à utiliser dans la préparation du vrac final.

**Essais moléculaires pour la régularité de la production**. Effectuez le titrage MAPREC sur chaque récolte virale. Les critères d'acceptabilité et de rejet de la régularité de la production sont déterminés en accord avec l'Autorité compétente pour chaque fabricant et pour chaque lot de semence de travail. Ces critères sont revus et mis à jour régulièrement en accord avec l'Autorité compétente. Un examen approfondi est nécessaire si des résultats incompatibles avec les antécédents de la production sont obtenus pour une récolte virale.

**Cellules témoins**. Les cellules témoins satisfont à un essai d'identification et aux exigences des agents étrangers (*2.6.16*), ou, si des cellules rénales primaires de singes sont utilisées pour la production, les exigences prescrites ci-après.

**Cellules rénales primaires de singes**. *Les exigences particulières suivantes s'appliquent à la multiplication et récolte du virus sur cellules rénales primaires de singe.*

*Cultures cellulaires.* Le jour de l'inoculation du virus du lot de semence de travail, chaque culture cellulaire sera examinée afin de vérifier qu'elle ne présente pas de dégénérescence due à un agent infectieux. Si cet examen révèle la présence d'un agent contaminant dans une culture, la totalité du groupe de cultures en cause sera rejetée.

Le jour de l'inoculation du virus du lot de semence de travail, un échantillon d'au moins 30 mL du mélange des liquides provenant des cultures cellulaires des reins de chaque singe, ou d'au maximum 10 foetus obtenus par césarienne avant terme, sera prélevé et divisé en 2 portions égales. L'une d'elles sera examinée sur des cultures de cellules rénales provenant d'un singe de la même espèce que l'animal utilisé pour la production du vaccin, mais non de cet animal lui-même. L'autre sera examinée, si nécessaire, sur des cultures de cellules rénales d'une autre espèce de singe, de façon que les essais soient pratiqués sur des cultures cellulaires provenant d'au moins 1 espèce connue pour être sensible au virus SV40. Le mélange de liquides sera introduit dans les flacons contenant ces cultures cellulaires de façon que la dilution du mélange dans le milieu nutritif ne dépasse pas 1:4. La surface de la couche cellulaire sera d'au moins 3 $cm^2$/mL de mélange. Au moins 1 flacon de chaque sorte de culture cellulaire sera conservé comme témoin, sans l'ensemencer. Si l'espèce de singe utilisée pour la production est connue pour être sensible au SV40, il n'est pas nécessaire de répéter l'épreuve sur une 2$^e$ espèce. Du sérum animal peut être utilisé pour la multiplication des cellules, à condition qu'il ne contienne pas d'anticorps anti-SV40, mais après inoculation de la préparation à examiner, le milieu d'entretien ne doit contenir aucun sérum ajouté sauf dans les conditions précisées ci-après.

Les cultures sont mises en incubation à 35-37 °C et gardées en observation pendant au moins 4 semaines. Au cours de cette période, et après au minimum 2 semaines d'incubation, au moins 1 repiquage du liquide provenant de chacune de ces cultures sur le même système de culture cellulaire sera effectué. Les subcultures seront également gardées en observation pendant au moins 2 semaines.

Au moment d'effectuer le repiquage, du sérum peut être ajouté à la culture initiale à condition qu'il ne contienne pas d'anticorps anti-SV40.

Les techniques d'immunofluorescence peuvent être utiles pour détecter le virus SV40 ou d'autres virus dans les cellules.

L'absence du virus herpétique des cercopithécidés type 1 (virus B) et d'autres virus sera vérifiée dans un autre échantillon d'au moins 10 mL du mélange de liquides. La recherche se fera sur des cultures de cellules rénales de lapin. L'absence d'inhibiteurs du virus B dans le sérum employé dans le milieu nutritif des cultures aura été établie au préalable. L'herpèsvirus humain a été utilisé comme indicateur de l'absence d'inhibiteurs du virus herpétique des cercopithécidés type 1 (virus B) en raison du danger que comporte la manipulation de ce dernier. L'échantillon sera introduit dans les flacons contenant ces cultures cellulaires de façon que la dilution du mélange de liquides dans le milieu nutritif ne dépasse pas 1:4. La surface de la couche cellulaire sera d'au moins 3 $cm^2$/mL de mélange. Au moins 1 flacon de culture cellulaire sera conservé comme témoin, sans l'ensemencer.

Les cultures seront mises en incubation à 35-37 °C et gardées en observation pendant au moins 2 semaines.

L'absence d'agents contaminants est également vérifiée sur un autre échantillon du mélange de liquides prélevés dans les cultures cellulaires le jour de l'inoculation du virus de semence, en inoculant 10 mL de l'échantillon dans des cultures de cellules humaines sensibles au virus de la rougeole.

Les essais ne sont valables que si la proportion de flacons de culture rejetés avant la fin des périodes d'épreuve respectives pour des raisons accidentelles non spécifiques ne dépasse pas 20 pour cent.

Si ces essais révèlent la présence d'un agent étranger, la récolte unique provenant de l'ensemble des cultures cellulaires en cause sera déclarée inappropriée à la production de vaccin.

Si la présence du virus herpétique des cercopithécidés type 1 (virus B) est démontrée, la fabrication du vaccin poliomyélitique oral sera interrompue et l'Autorité compétente sera informée. La fabrication ne reprendra pas avant qu'une enquête approfondie n'ait été faite, que les précautions nécessaires pour empêcher la réapparition de l'infection n'aient été prises et que l'Autorité compétente n'ait donné son accord.

Si les essais mentionnés ci-dessus ne sont pas pratiqués immédiatement, les échantillons du mélange de liquides seront conservés à une température égale ou inférieure à – 60 °C, à l'exception de l'échantillon destiné à la recherche du virus B, qui peut être gardé à 4 °C à condition que l'essai soit pratiqué dans les 7 jours suivant le prélèvement.

*Cellules témoins.* Le jour de l'inoculation du virus du lot de semence de travail, 25 pour cent (mais pas plus de 2,5 L) de la suspension cellulaire provenant des reins de chaque singe, ou d'au maximum 10 singes obtenus par césarienne avant terme, sera prélevée pour préparer des cultures cellulaires non ensemencées (cellules témoins). Ces cultures, qui serviront de témoins, seront incubées dans les mêmes conditions que les cultures ensemencées pendant au moins 2 semaines et seront examinées au cours de cette période pour la recherche d'éventuelles modifications cytopathogènes. Les essais ne sont valables que si la proportion de cultures cellulaires témoins rejetées pour des raisons accidentelles non spécifiques n'excède pas 20 pour cent. A la fin de la période d'observation, les cultures cellulaires témoins seront examinées pour s'assurer qu'elles ne présentent pas de signe de dégénérescence due à un agent infectieux. Si cet examen ou un des essais prescrits dans

Vaccins

la présente section révèlent la présence d'un agent étranger dans une culture témoin, le virus poliomyélitique des cultures ensemencées provenant du même groupe sera rejeté.

*Recherche de virus hémadsorbants*. Au moment de la récolte, ou dans les 4 jours suivant l'ensemencement des cultures de production avec le virus du lot de semence de travail, on prélèvera un échantillon de 4 pour cent des cultures cellulaires témoins dans lequel on recherchera la présence de virus hémadsorbants. A la fin de la période d'observation, on effectuera la même recherche dans les cultures cellulaires témoins restantes. Les épreuves seront pratiquées comme indiqué dans le chapitre *2.6.16*.

*Recherche d'autres agents étrangers*. Au moment de la récolte, ou dans les 7 jours suivant l'ensemencement des cultures de production avec le virus du lot de semence de travail, on prélèvera dans le mélange de liquides de chaque groupe de cultures témoins un échantillon d'au moins 20 mL qui sera soumis à des essais sur 2 sortes de cultures de cellules rénales de singe, comme indiqué ci-dessus.

A la fin de la période d'observation des cultures cellulaires témoins d'origine, des échantillons similaires du mélange de liquides seront prélevés et les essais mentionnés dans la présente section sur les 2 sortes de cultures de cellules rénales de singe ainsi que sur les cultures cellulaires de lapin, seront répétés comme indiqué ci-dessus sous Cultures cellulaires.

Si la présence du virus herpétique des cercopithécidés type 1 (virus B) est démontrée, les cultures destinées à la production ne seront pas utilisées et les mesures indiquées ci-dessus concernant la production de vaccin seront appliquées.

Les liquides prélevés sur les cultures cellulaires témoins au moment de la récolte du virus et à la fin de la période d'observation peuvent être mélangés avant les essais d'agents contaminants. Un échantillon de 2 pour cent du mélange est examiné dans chacun des systèmes de cultures cellulaires indiqués.

*Récoltes uniques*

*Essais effectués sur les récoltes uniques neutralisées provenant de cultures de cellules rénales primaires de singe*. Un échantillon d'au moins 10 mL de chaque récolte unique est neutralisé au moyen d'un immunosérum spécifique du type de poliovirus considéré. Cet immunosérum sera préparé par immunisation d'animaux autres que le singe, à l'aide d'antigènes cultivés sur des cellules non simiennes.

La moitié de l'échantillon neutralisé (correspondant à au moins 5 mL de récolte unique) sera examinée sur des cultures de cellules rénales provenant d'un singe de la même espèce que l'animal utilisé pour la production du vaccin, mais non de cet animal lui-même. L'autre moitié sera examinée, si nécessaire, sur des cultures de cellules rénales d'une autre espèce de singe, de telle sorte que les épreuves soient pratiquées sur des cultures cellulaires provenant d'au moins 1 espèce connue pour être sensible au virus SV40.

Les suspensions neutralisées seront introduites dans les flacons renfermant ces cultures cellulaires de façon que la dilution de la suspension dans le milieu nutritif ne dépasse pas 1:4. La surface de la couche cellulaire doit être d'au moins 3 $cm^2$/mL de suspension neutralisée. Au moins 1 flacon de chaque sorte de culture cellulaire sera conservé comme témoin, sans l'ensemencer ; les cultures témoins seront entretenues à l'aide d'un milieu nutritif contenant l'immunosérum spécifique à la même concentration que celle employée pour la neutralisation.

Du sérum animal peut être utilisé pendant la multiplication des cellules, à condition qu'il ne contienne pas d'anticorps anti-SV40, mais après inoculation de la préparation à examiner, le milieu d'entretien ne doit pas contenir d'autre sérum ajouté que l'immunosérum neutralisant, sauf dans les circonstances décrites ci-après.

Les cultures seront mises en incubation à 35-37 °C et gardées en observation pendant au moins 4 semaines. Au cours de cette période, et après au minimum, 2 semaines d'incubation au moins 1 repiquage du liquide provenant de chaque culture sera effectué sur le même système de culture cellulaire. Ces subcultures seront également gardées en observation pendant au moins 2 semaines.

Au moment d'effectuer le repiquage, du sérum peut être ajouté aux cultures initiales, à condition qu'il ne contienne pas d'anticorps anti-SV40.

L'absence d'agents étrangers est également vérifiée sur un autre échantillon des récoltes uniques neutralisées, en inoculant 10 mL dans des cultures de cellules humaines sensibles au virus de la rougeole. Cet essai est également validé pour la détection du sCMV.

Les techniques d'immunofluorescence peuvent être utiles pour la recherche du SV40 et d'autres virus dans les cellules.

Ces essais ne sont valables que si la proportion de flacons de culture rejetés avant la fin des périodes d'épreuve respectives pour des raisons accidentelles non spécifiques ne dépasse pas 20 pour cent.

Si l'on observe une modification cytopathogène dans l'une des cultures, on en recherchera la cause. S'il apparaît qu'elle est due au virus poliomyélitique non neutralisé, l'essai sera répété. Si l'on met en évidence la présence du SV40 ou d'autres agents étrangers provenant de la récolte unique, cette dernière sera déclarée impropre à la production de vaccin.

*MÉLANGE MONOVALENT DE RÉCOLTES*

Les mélanges monovalents de récoltes sont préparés par mélange de plusieurs récoltes uniques, déclarées satisfaisantes, du même type viral. Les mélanges monovalents de récoltes produits sur une lignée cellulaire continue peuvent être purifiés. Chaque mélange monovalent de récoltes est filtré sur un filtre retenant les bactéries.

Seul un mélange monovalent de récoltes qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du vrac final.

**Identification**. Chaque mélange monovalent de récoltes est identifié comme virus poliomyélitique du type considéré à l'aide d'anticorps spécifiques.

**Concentration en virus**. Déterminée par la méthode décrite ci-après, la concentration en virus sert de base de calcul pour les dilutions à effectuer lors de la préparation du vrac final et pour la quantité de virus à utiliser dans l'essai de neurovirulence, et de paramètre d'établissement et de surveillance de la régularité de la production.

**Marqueurs génétiques**. En ce qui concerne le poliovirus Sabin de type 3, un titrage MAPREC validé est effectué. Dans cette analyse, la quantité de la mutation à la position 472 du génome (472-C) est estimée et exprimée par rapport à l'Etalon International d'analyse MAPREC du poliovirus de type 3 (Sabin). Un mélange de récoltes monovalent de poliovirus de type 3 ne satisfait pas à l'essai du titrage MAPREC s'il présente une quantité de 472-C supérieure de manière significative à celle présente dans l'Etalon International d'analyse MAPREC du poliovirus de type 3 (Sabin).

L'analyse MAPREC du poliovirus de type 3 (Sabin) est effectuée à l'aide de la procédure opératoire standardisée approuvée par l'Autorité compétente. Une procédure appropriée (*Analyse des virus mutants par amplification génétique (PCR) et coupure par une enzyme de restriction (MAPREC) du virus poliomyélitique oral*) est disponible auprès de l'Organisation Mondiale de la Santé, Qualité et innocuité des produits biologiques, Genève. Un laboratoire doit démontrer auprès de l'Autorité compétente sa compétence à effectuer le titrage. Le fabricant et l'Autorité compétente devront parvenir à un consensus quant à la procédure à suivre et aux critères permettant d'établir qu'un mélange de récoltes monovalent de poliovirus de type 3 présente une quantité de 472-C supérieure de manière significative à celle présente dans l'Etalon International.

Les critères d'acceptation ou de rejet relatifs à l'évaluation de la régularité de la production devront être déterminés pour chaque fabricant et pour chaque semence de travail par

l'Autorité compétente. Ces critères devront être mis à jour chaque fois qu'un nouveau vrac est préparé et analysé. Une enquête de régularité de la production est menée si les résultats obtenus sur un mélange de récoltes monovalent ne sont pas compatibles avec les antécédents de la production.

Etant donné que les dosages MAPREC relatifs au poliovirus de type 3 (Sabin) constituent un excellent indicateur de la neurovirulence *in vivo*, si un mélange de récoltes monovalent filtré de poliovirus de type 3 (Sabin) ne donne pas de résultats satisfaisants du titrage MAPREC, une enquête sur la régularité du procédé de production devra automatiquement être lancée. Cette enquête devra également déterminer si la semence de travail est appropriée.

Les mélanges de récoltes monovalents qui satisfont à l'essai du titrage MAPREC doivent ensuite subir un essai de neurovirulence *in vivo*.

En ce qui concerne le poliovirus de type 3, les résultats de l'essai du titrage MAPREC et de l'essai de neurovirulence sur singe (*2.6.19*) sont utilisés de manière concomitante pour évaluer l'impact des modifications du procédé de production ou en cas de production par un nouveau fabricant.

Dans l'attente de la validation des titrages MAPREC pour les poliovirus des types 1 et 2, les suspensions de vrac filtré sont testées pour ces virus afin de déterminer leur propriété à se reproduire à des températures de 36 °C et 40 °C. Le rapport entre les capacités de multiplication du virus contenu dans le mélange monovalent de récoltes et dans une préparation de référence est déterminé sur une gamme de températures allant de 36 °C à 40 °C, par comparaison avec le lot de semence ou avec une préparation de référence destinée à des épreuves de recherche de marqueur et avec des souches rct/40− et rct/40+ appropriées du virus poliomyélitique du même type. Les températures d'incubation utilisées lors de cet essai sont contrôlées à ± 0,1 °C près. Le mélange monovalent de récoltes satisfait à l'essai si les concentrations en virus obtenues à 36 °C, pour la récolte et pour la préparation de référence, sont supérieures d'au moins 5,0 log aux valeurs correspondantes obtenues à 40 °C. Si la multiplication du virus à 40 °C est si faible qu'une comparaison valable ne peut être établie, une température comprise entre 39,0 °C et 39,5 °C est employée ; à la température choisie, la concentration en virus obtenue pour la préparation de référence doit être inférieure d'un facteur 3,0 log à 5,0 log à la valeur obtenue à 36 °C ; la réduction minimale acceptable est déterminée pour chaque souche pour une température donnée. Si les concentrations en virus obtenues pour 1 ou plusieurs des virus de référence ne concordent pas avec les valeurs attendues, l'essai doit être répété.

**Neurovirulence** (*2.6.19*). Chaque mélange monovalent de récoltes satisfait à l'essai de neurovirulence du vaccin poliomyélitique oral. Si l'essai de neurovirulence réalisé sur des singes n'est effectué que par le fabricant, les lames de l'essai sont soumises à l'Autorité de contrôle pour examen. Le modèle de la souris transgénique TgPVR21 fournit une solution de substitution appropriée à l'essai de neurovirulence sur le singe pour les essais de neurovirulence des vaccins des types 1, 2 ou 3 si un laboratoire est habilité à effectuer l'essai et si l'expérience acquise est jugée satisfaisante par l'Autorité compétente. L'essai est effectué à l'aide de la procédure opératoire standardisée approuvée par l'Autorité compétente. Une procédure appropriée (*test de neurovirulence des vaccins poliomyétiques vivants oraux de types 1, 2 ou 3 dans des souris transgéniques sensibles à l'infection par le poliovirus)* est disponible auprès de l'Organisation Mondiale de la Santé, Qualité et innocuité des produits biologiques, Genève.

**Cellules rénales primaires de singe**. *Les exigences particulières suivantes s'appliquent aux mélanges monovalents de récoltes obtenus à partir de cellules rénales primaires de singe.*

*Rétrovirus*. Le mélange monovalent de récoltes est examiné par un dosage de transcriptase inverse. Il n'y a aucune indication de la présence de rétrovirus.

*Essais sur le lapin*. La présence du virus herpétique des cercopithécidés type 1 (virus B) et d'autres virus sera recherchée sur un échantillon d'au moins 100 mL du mélange monovalent de récoltes, par injection à au moins 10 lapins en bonne santé, pesant 1,5-2,5 kg. Chaque lapin recevra une dose d'au moins 10 mL et d'au plus 20 mL, 1 mL étant administré en plusieurs points par voie intradermique puisque le volume maximal pouvant être administré par voie intradermique à chaque point est de 0,1 mL, et le reste par voie sous-cutanée. Les lapins seront mis en observation pendant au moins 3 semaines et l'on enregistrera la mortalité et les signes de maladie.

Tous les lapins qui meurent après les premières 24 h ou qui présentent des signes de maladie sont autopsiés ; un examen détaillé du cerveau et des autres organes est effectué de façon à établir la cause de la mort.

L'essai n'est valable que si 20 pour cent au plus des lapins inoculés présentent des signes d'infection intercurrente pendant la période d'observation. Le mélange monovalent de récoltes satisfait à l'épreuve si aucun lapin ne montre de signes d'infection due au virus B ou à un autre agent contaminant, ni de lésions d'aucune sorte susceptibles d'être dues au mélange monovalent de récoltes.

Si l'essai révèle la présence du virus B, on appliquera les mesures concernant la production de vaccin décrites ci-dessus sous Cultures cellulaires.

*Epreuve sur cobaye. Si les cellules rénales primaires de singe ne proviennent pas de singes maintenus dans une colonie fermée, il doit être démontré que le mélange monovalent des récoltes satisfait à l'essai suivant.* Utilisez au moins 5 cobayes, pesant 350-450 g. Administrez à chacun d'eux 0,1 mL du mélange monovalent de récoltes, par voie intracérébrale (0,05 mL dans chaque hémisphère cérébral) et 0,5 mL par voie intrapéritonéale. Mesurez la température rectale de chaque animal chaque jour de travail pendant 6 semaines. A la fin de la période d'observation, effectuez l'autopsie de chaque animal.

En outre, administrez à chacun de 5 cobayes 0,5 mL du mélange monovalent de récoltes par voie intrapéritonéale et mettez-les en observation comme décrit ci-dessus pendant 2-3 semaines. A la fin de la période d'observation, effectuez à partir de ces animaux un passage sur au moins 5 cobayes en utilisant du sang et une suspension du foie ou de la rate. Mesurez la température rectale de ces derniers cobayes pendant 2-3 semaines. Effectuez l'autopsie de chaque animal qui, après la première journée de l'essai, meurt ou qui est euthanasié en raison de l'apparition de signes de maladie, ou qui présente pendant 3 jours consécutifs une température corporelle supérieure à 40,1 °C ; effectuez un examen histologique pour rechercher les filovirus ; en outre, injectez une suspension du foie ou de la rate ou du sang par voie intrapéritonéale à au moins 3 cobayes. S'il apparaît des signes d'infection par les filovirus, effectuez des essais de confirmation sérologiques sur le sang des animaux affectés. Le mélange monovalent de récoltes satisfait à l'essai si au moins 80 pour cent des cobayes survivent jusqu'à la fin de l'essai et restent en bonne santé et si aucun animal ne présente des signes d'infection par les filovirus.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé à partir d'un ou de plusieurs mélanges monovalents de récoltes déclarés satisfaisants. Il peut contenir plusieurs des types viraux. Des substances aromatisantes et des stabilisants appropriés peuvent être ajoutés.

Seul un vrac final qui satisfait à l'essai ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Contamination bactérienne et fongique**. Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*), effectué en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Seul un lot final qui satisfait à l'essai ci-après de stabilité thermique et à chacun des essais décrits ci-après sous Identification, Essai et Dosage peut être libéré.

IDENTIFICATION

A l'aide d'anticorps spécifiques, il est démontré que le vaccin à examiner contient les virus poliomyélitiques de chaque type indiqué sur l'étiquette.

ESSAI

**Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*).

**Stabilité thermique**. Maintenez au moins 3 flacons du lot final de vaccin à 37 ± 1 °C pendant 48 h. Déterminez la concentration totale en virus du vaccin après chauffage, comme décrit sous Dosage et effectuez en parallèle le titrage du vaccin conservé à la température de conservation recommandée. L'estimation de la différence entre la concentration totale en virus du vaccin non chauffé et celle du vaccin après chauffage n'est pas supérieure à 0,5 log unités virales infectieuses ($DICC_{50}$) par dose humaine unitaire.

DOSAGE

Titrez le virus infectieux du vaccin par la méthode décrite ci-après, en utilisant au moins 3 flacons séparés. Titrez en triple le contenu d'un flacon de préparation de référence appropriée de virus pour valider chaque titrage. La concentration en virus de la préparation de référence est suivie à l'aide d'une carte de contrôle et un titre est établi par chaque laboratoire à partir des données historiques. Si le vaccin contient plusieurs types du virus poliomyélitique, chacun d'eux fait l'objet d'un titrage séparé, les autres types présents étant neutralisés au moyen d'un immunosérum spécifique approprié (ou, de préférence, un anticorps monoclonal).

Calculez la concentration individuelle en virus pour chaque flacon de vaccin et pour chaque échantillon répliqué de la préparation de référence ainsi que les concentrations en virus combinées correspondantes en utilisant les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple).

Dans le cas d'un vaccin trivalent, le titre combiné estimé d'une dose humaine unitaire du vaccin n'est pas inférieur à 6,0 log unités virales infectieuses ($DICC_{50}$) pour le type 1, à 5,0 log unités virales infectieuses ($DICC_{50}$) pour le type 2 et à 5,5 log unités virales infectieuses ($DICC_{50}$) pour le type 3.

Dans le cas d'un vaccin monovalent ou divalent, les titres minimaux en virus sont décidés par l'Autorité compétente.

*Méthode*. Dans un nombre approprié de cupules d'une plaque de microtitrage, introduisez un volume approprié des différentes dilutions de la suspension virale choisies, puis un volume approprié d'une suspension cellulaire de la lignée Hep-2 (Cincinnati). Examinez les cultures entre les 7$^{e}$ et 9$^{e}$ jours.

L'essai n'est pas valable si :

- l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration en virus estimée de la préparation de référence pour les 3 échantillons répliqués combinés est supérieur à ± 0,3 log $DICC_{50}$ ;
- la concentration en virus de la préparation de référence diffère de plus de 0,5 log $DICC_{50}$ par rapport à la teneur établie. Si une préparation de référence de fabricant est utilisée, sa relation avec la Préparation Biologique de Référence appropriée de la Pharmacopée Européenne est établie et contrôlée à intervalles réguliers.

L'essai est répété si l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration en virus combinée du vaccin est supérieur à ± 0,3 log $DICC_{50}$ ; seules les données provenant de titrages valides sont combinées par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple) pour le calcul de la concentration en virus de l'échantillon. L'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration en virus combinée n'est pas supérieur à ± 0,3 log $DICC_{50}$.

Le *vaccin poliomyélitique oral PBR* convient comme préparation de référence.

Dans les cas justifiés et autorisés, des titrages de conceptions différentes peuvent être utilisés, ce qui peut impliquer l'application de critères de validité ou d'acceptation différents. Cependant, le vaccin doit être conforme s'il est contrôlé comme décrit ci-dessus.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- les types de virus poliomyélitique contenus dans le vaccin,
- la quantité minimale de chaque type du virus contenue dans une dose humaine unitaire,
- la nature du substrat cellulaire utilisé pour la préparation du vaccin,
- que le vaccin ne doit pas être injecté.

**04/2008:0216**

# VACCIN RABIQUE POUR USAGE HUMAIN PRÉPARÉ SUR CULTURES CELLULAIRES

## Vaccinum rabiei ex cellulis ad usum humanum

DÉFINITION

Le vaccin rabique pour usage humain préparé sur cultures cellulaires est une préparation cryodesséchée obtenue à partir d'une souche appropriée de virus fixe de la rage cultivée sur cultures cellulaires et inactivée par une méthode validée.

Le vaccin, reconstitué immédiatement avant l'emploi d'après les indications de l'étiquette, se présente sous la forme d'un liquide limpide qui peut être coloré en raison de la présence d'un indicateur de pH.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

La production du vaccin est basée sur un système de lot de semence viral. Si le vaccin est produit sur une lignée cellulaire, celle-ci est utilisée selon un système de banque de cellules. Il doit être démontré que le procédé de production donne de façon reproductible des vaccins conformes aux exigences d'activité, d'innocuité et de stabilité. Sauf exception justifiée et autorisée, le virus dans le vaccin final ne devra pas avoir subi plus de passages depuis le lot de semence primaire que le vaccin qui s'est avéré satisfaisant en ce qui concerne l'innocuité et l'efficacité lors d'essais cliniques ; même avec une exception autorisée, le nombre de passages au-delà du niveau du vaccin utilisé pour les essais cliniques n'est pas supérieur à 5.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

*SUBSTRAT POUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS*

Le virus est multiplié dans une lignée de cellules diploïdes humaines (*5.2.3*), dans une lignée cellulaire continue approuvée par l'Autorité compétente ou dans des cultures de cellules embryonnaires aviaires provenant d'un élevage exempt de microorganismes pathogènes spécifiés (*5.2.2*).

*LOTS DE SEMENCE*

L'identité et l'historique de la souche de virus utilisée doivent être attestés par des documents contenant notamment des informations relatives à son origine et aux éventuels passages qu'elle a subis.

Les lots de semence de travail sont préparés par au maximum 5 passages à partir du lot de semence primaire.

Seul un lot de semence de travail qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la multiplication du virus.

**Identification**. Chaque lot de semence de travail est identifié comme virus rabique à l'aide d'anticorps spécifiques.

Vaccins

**Concentration en virus**. Pour chaque lot de semence de travail, la concentration en virus est déterminée par une technique en cultures cellulaires utilisant l'immunofluorescence, afin d'assurer la régularité de la production.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Les lots de semence de travail satisfont aux exigences pour les lots de semence de virus. Si le virus a subi des passages sur cerveau de souris, des essais spécifiques aux virus d'origine murine sont effectués.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE DU VIRUS*

Toutes les manipulations effectuées sur la banque de cellules et les cultures cellulaires dérivées sont conduites dans des conditions d'asepsie, dans un local où d'autres cellules ne sont pas manipulées en même temps. Un sérum animal approuvé (à l'exclusion du sérum humain) peut être utilisé dans la composition des milieux de culture cellulaire, mais le milieu final utilisé pour maintenir la croissance cellulaire pendant la multiplication virale ne doit pas contenir de sérum animal ; les milieux peuvent contenir de l'albumine humaine. L'absence d'agents étrangers dans le sérum et la trypsine utilisés pour la préparation des suspensions cellulaires et des milieux est vérifiée. Les milieux de culture cellulaire peuvent contenir un indicateur de pH tel que le rouge de phénol, et des antibiotiques approuvés à la concentration correspondant au seuil minimal d'efficacité. Un volume d'au moins 500 mL des cultures cellulaires utilisées pour la production du vaccin est réservé comme culture de cellules non infectées (cellules témoins). La suspension virale est récoltée en une ou plusieurs fois pendant l'incubation. De multiples récoltes provenant d'un seul lot de cellules peuvent être mélangées, constituant alors une récolte unique.

Seule une récolte unique qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée pour la préparation de la suspension virale inactivée.

**Identification**. La récolte unique contient le virus rabique identifié en tant que tel à l'aide d'anticorps spécifiques.

**Concentration en virus**. Titrez le virus infectieux en cultures cellulaires afin de contrôler la régularité de la production.

**Cellules témoins**. Les cellules témoins de la culture cellulaire de production d'où provient la récolte unique satisfont à un essai d'identification et aux exigences pour les agents étrangers (*2.6.16*).

*PURIFICATION, INACTIVATION*

La récolte peut ensuite être concentrée et/ou purifiée selon des méthodes appropriées. L'inactivation de la récolte par une méthode validée a lieu à une étape fixe et bien déterminée du procédé, qui se situe avant, pendant ou après ces opérations. Il devra être démontré que le procédé d'inactivation est capable d'inactiver le virus rabique sans détruire son pouvoir immunogène. Si la bêtapropiolactone est utilisée, la concentration ne doit dépasser 1:3500 à aucun moment de l'inactivation.

Seule une suspension inactivée qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée dans la préparation du vrac final.

**Virus infectieux résiduel**. Procédez à un essai d'enrichissement en virus infectieux rabique résiduel, soit immédiatement après l'inactivation soit en utilisant un échantillon congelé immédiatement après l'inactivation et conservé à – 70 °C. Inoculez une quantité de suspension virale inactivée correspondant au moins à 25 doses humaines sur des cultures cellulaires du même type que celui qui a été utilisé pour la préparation du vaccin. Un passage peut être effectué après 7 jours. Maintenez les cellules en culture pendant un total de 21 jours, puis examinez les cultures par immunofluorescence. La récolte virale inactivée satisfait à l'essai si aucun virus rabique n'est décelé.

**ADN résiduel de la cellule hôte**. Si le virus est multiplié sur une lignée cellulaire continue, la teneur en ADN résiduel de la cellule hôte, déterminée par une méthode appropriée, telle que décrite sous *Produits obtenus par la méthode dite de l'ADN recombinant (0784)*, n'est pas supérieure à 10 ng par dose humaine unitaire.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé à partir d'une ou plusieurs suspensions virales inactivées. Un agent stabilisant approuvé peut y être introduit afin de conserver l'activité du produit pendant et après la lyophilisation.

Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Teneur en glycoprotéine**. Déterminez la teneur en glycoprotéine par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), par exemple, l'immunodiffusion radiale simple, l'immunodosage à enzyme conjuguée ou l'essai de liaison d'anticorps. La teneur se situe dans les limites approuvées pour le produit considéré.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité, effectué en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles. Il est cryodesséché jusqu'à une teneur en eau dont il est démontré qu'elle favorise la stabilité du vaccin. Les récipients sont alors fermés pour éviter la contamination et l'introduction d'humidité.

Seul un lot final satisfaisant à chacun des essais décrits ci-après sous Identification, Essai et Activité peut être libéré. Si l'essai du virus infectieux résiduel a été effectué avec des résultats satisfaisants sur la suspension virale inactivée et si l'essai de sérum-albumine bovine a été effectué avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ces essais peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

## IDENTIFICATION

A l'aide d'anticorps spécifiques de préférence monoclonaux, il est démontré par une méthode immunochimique (*2.7.1*) que le vaccin examiné contient les antigènes du virus rabique ; l'essai d'activité sert également à identifier le vaccin.

## ESSAI

**Virus infectieux résiduel**. Inoculez une quantité correspondant au moins à 25 doses humaines sur des cultures cellulaires du même type que celui qui a été utilisé pour la préparation du vaccin. Un passage peut être effectué après 7 jours. Maintenez les cellules en culture pendant un total de 21 jours, puis examinez les cultures par immunofluorescence. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun virus rabique n'est décelé.

**Sérum-albumine bovine** : au maximum 50 ng par dose humaine unitaire, déterminé par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin reconstitué satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 25 UI par dose humaine unitaire.

**Pyrogènes** (*2.6.8*). Le vaccin satisfait à l'essai des pyrogènes. Sauf exception justifiée et autorisée, injectez à chaque lapin une dose humaine unitaire diluée au 1/10.

**Eau** (*2.5.12*) : au maximum 3,0 pour cent.

## ACTIVITÉ

L'activité du vaccin rabique est évaluée par détermination de la quantité nécessaire pour protéger des souris contre les effets d'une dose létale de virus rabique administrée par voie intracérébrale. Cette dose est comparée avec la quantité de la préparation de référence de vaccin rabique nécessaire pour assurer la même protection. Le titrage biologique nécessite l'emploi d'une préparation de référence de vaccin rabique étalonnée en Unités Internationales et d'une souche appropriée de virus rabique destinée à servir de préparation d'épreuve.

L'Unité Internationale correspond à l'activité spécifique d'une quantité donnée de l'étalon international. La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

L'essai décrit ci-après emploie un modèle en lignes parallèles qui comporte au moins 3 points pour le vaccin à examiner et la préparation de référence. Une fois que l'analyste a acquis une certaine expérience avec la méthode pour chaque vaccin donné, il est possible d'utiliser un essai simplifié avec une seule dilution du vaccin à examiner. Un tel essai permet à l'analyste de vérifier que le vaccin a une activité supérieure de façon significative au minimum requis mais ne donne pas d'information complète sur la validité de chaque détermination individuelle. L'emploi d'un essai avec une seule dilution permet une réduction considérable du nombre d'animaux nécessaire pour l'essai et doit être considéré par chaque laboratoire conformément aux dispositions de la Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques.

*Choix et répartition des animaux d'expérience.* Utilisez des souris femelles saines, âgées d'environ 4 semaines, pesant chacune 11-15 g et provenant d'un même élevage. Répartissez les souris en 6 groupes d'un nombre suffisant pour satisfaire aux conditions de validité de l'essai et, pour le titrage de la suspension d'épreuve, en 4 groupes de 5.

*Préparation de la suspension d'épreuve.* Inoculez à des souris par voie intracérébrale la souche CVS (*Challenge Virus Standard*) du virus rabique. Lorsque les souris présentent des signes de la rage, mais avant qu'elles ne meurent, euthanasiez-les. Prélevez les cerveaux et préparez une suspension homogène de tissu cérébral dans un diluant approprié. Centrifugez et éliminez les grosses particules. Recueillez le surnageant qui constitue la suspension d'épreuve. Répartissez cette suspension en ampoules de faible capacité. Scellez les ampoules et conservez-les à une température inférieure à − 60 °C. Décongelez le contenu d'une ampoule et préparez à partir de la suspension une série de dilutions dans un liquide approprié. Utilisez un groupe de 5 souris pour chaque dilution. Inoculez par voie intracérébrale à chaque souris 0,03 mL de la dilution attribuée à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 14 jours. Calculez la $DL_{50}$ de la suspension non diluée à partir du nombre de souris dans chaque groupe qui meurent ou qui présentent des signes de la rage entre le 5e et le 14e jour.

*Détermination de l'activité du vaccin.* Préparez une série de 3 dilutions de raison 5 du vaccin à examiner et une série analogue de la préparation de référence de façon que les suspensions les plus concentrées protègent plus de 50 pour cent des souris auxquelles elles ont été administrées et que les suspensions les moins concentrées protègent moins de 50 pour cent des souris auxquelles elles ont été administrées. Utilisez 6 groupes de souris à raison d'un groupe par dilution. Injectez par voie intrapéritonéale à chaque souris 0,5 mL de la dilution attribuée à son groupe. Après 7 jours, préparez 3 nouvelles dilutions identiques du vaccin à examiner et de la préparation de référence respectivement, puis répétez les inoculations. 7 jours après l'injection de la seconde dose de vaccin, préparez une suspension d'épreuve telle que, sur la base du titrage préliminaire, elle contienne environ 50 $DL_{50}$ par 0,03 mL. Inoculez par voie intracérébrale à chaque souris vaccinée 0,03 mL de cette suspension. Préparez ensuite une série de 3 dilutions appropriées de la suspension virale d'épreuve. Utilisez 4 groupes de 5 souris témoins. Attribuez respectivement à chaque groupe la suspension et ses 3 dilutions. Injectez par voie intracérébrale à chaque souris 0,03 mL de la suspension ou d'une des dilutions d'épreuve attribuée à son groupe. Mettez les souris de tous les groupes en observation pendant 14 jours. Notez dans chaque groupe le nombre de souris qui meurent ou qui présentent des signes de la rage au cours des 5 à 14 jours qui suivent l'épreuve.

L'essai n'est valable que si :

- pour le vaccin à examiner et pour la préparation de référence, les dilutions en série encadrent la dose protectrice à 50 pour cent,
- le titrage de la suspension virale indique que la dose d'épreuve (0,03 mL) contient au moins 10 $DL_{50}$,
- l'analyse statistique démontre une pente significative des courbes dose/réponse et ne révèle aucune déviation significative de la linéarité ou du parallélisme,
- les limites de confiance ($P$ = 0,95) ne sont pas inférieures à 25 pour cent ni supérieures à 400 pour cent de l'activité estimée.

Le vaccin satisfait à l'essai si l'activité estimée est au minimum de 2,5 UI par dose humaine.

*Application de points limites alternatifs.* Une fois qu'un laboratoire a établi, en utilisation de routine, le titrage d'activité ci-dessus, le point limite constitué par la mort de l'animal devra être remplacé par une observation des signes cliniques et la mise en application d'un point limite plus précoce afin de réduire la souffrance de l'animal. Ce qui suit est donné à titre d'exemple.

La progression de l'infection rabique chez la souris suite à une injection intracérébrale peut être représentée par 5 étapes définies par des signes cliniques caractéristiques :

Etape 1 : poils hérissés, dos voûté,

Etape 2 : mouvements lents, animaux moins alertes (des mouvements circulaires peuvent également être observés),

Etape 3 : mouvements saccadés, tremblements, convulsions,

Etape 4 : signes de parésie ou de paralysie,

Etape 5 : état moribond.

Observez les souris au moins 2 fois par jour à partir du 4e jour après l'injection. Enregistrez les signes cliniques à l'aide d'un tableau semblable au tableau 0216.-1. L'expérience montre que l'utilisation de l'étape 3 comme point limite donne des résultats de titrage d'activité équivalents à ceux obtenus quand la mort de l'animal constitue le point limite. Ceci doit être vérifié par chaque laboratoire en évaluant un nombre approprié de titrages utilisant les 2 types de point limite (signes cliniques ou mort).

Tableau 0216.-1. – *Exemple de tableau utilisé pour enregistrer les signes cliniques dans le titrage de l'activité du vaccin rabique*

| | Nombre de jours après l'injection | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Signes cliniques** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **11** |
| Poils hérissés<br>Dos voûté | | | | | | | | |
| Mouvements lents<br>Animaux moins alertes<br>Mouvements circulaires | | | | | | | | |
| Mouvements saccadés<br>Tremblements<br>Convulsions | | | | | | | | |
| Parésie<br>Paralysie | | | | | | | | |
| Etat moribond | | | | | | | | |

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique l'origine biologique de la culture cellulaire qui a servi à la préparation du vaccin.

Vaccins

**04/2010:1057**

# VACCIN ROUGEOLEUX, DES OREILLONS ET RUBÉOLEUX, VIVANT

## Vaccinum morbillorum, parotitidis et rubellae vivum

DÉFINITION

Le vaccin rougeoleux, des oreillons et rubéoleux, vivant, est une préparation cryodesséchée obtenue à partir de souches atténuées appropriées du virus rougeoleux, du virus des oreillons et du virus rubéoleux.

Le vaccin, reconstitué immédiatement avant l'emploi d'après les indications figurant sur l'étiquette, se présente sous forme d'un liquide limpide qui peut être coloré en raison de la présence d'un indicateur de pH.

PRODUCTION

Les 3 composants sont préparés comme décrit dans les monographies *Vaccin rougeoleux vivant (0213)*, *Vaccin vivant des oreillons (0538)* et *Vaccin rubéoleux vivant (0162)* et satisfont aux spécifications qui y sont prescrites.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

*VRAC FINAL*

Les récoltes de virus de chaque composant sont mélangées et clarifiées afin d'éliminer les cellules. Un stabilisant approprié peut être ajouté et le mélange de récoltes dilué de façon appropriée. Des quantités appropriées du mélange des récoltes de chaque composant sont mélangées.

Seul un vrac final qui satisfait à l'essai ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Contamination bactérienne et fongique**. Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*) effectué en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Pour chaque composant, une concentration minimale en virus pour la libération du vaccin est établie à l'aide des données relatives à la stabilité, de manière à s'assurer qu'en fin de période de validité, la concentration minimale en virus indiquée sur l'étiquette sera présente dans le vaccin.

Seul un lot final qui satisfait à la spécification de la concentration minimale en virus de chaque composant pour la libération des lots et à l'essai ci-après de stabilité thermique et qui est conforme à chacun des essais décrits ci-après sous Identification et Essai peut être libéré. Si les essais de sérum-albumine bovine et, dans les cas appropriés, l'essai d'ovalbumine ont été effectués avec de bons résultats sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

**Stabilité thermique**. Maintenez au minimum 3 flacons du lot final de vaccin cryodesséché à l'état sec à 37 ± 1 °C pendant 7 jours. Selon les modalités décrites sous Dosage, déterminez la concentration en virus du vaccin après chauffage et effectuez en parallèle le titrage du vaccin conservé à la température de conservation recommandée. Pour chaque composant, la concentration en virus du vaccin après chauffage n'est pas inférieure de plus de 1,0 log à la valeur obtenue avec le vaccin non chauffé.

IDENTIFICATION

Lorsque le vaccin reconstitué d'après les indications de l'étiquette est mélangé à des anticorps spécifiques du virus rougeoleux, du virus des oreillons et du virus rubéoleux, il n'infecte plus des cultures cellulaires sensibles à ces virus. Lorsque le vaccin reconstitué d'après les indications de l'étiquette est mélangé à des quantités suffisantes d'anticorps spécifiques pour neutraliser 2 des 3 composants, le 3e composant infecte des cultures cellulaires sensibles.

ESSAI

**Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin reconstitué satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*).

**Sérum-albumine bovine**. Déterminez la teneur en sérum-albumine bovine par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La teneur n'est pas supérieure à 50 ng par dose humaine unitaire.

**Ovalbumine**. Si le composant ourlien a été préparé sur embryons de poulet, déterminez la teneur en ovalbumine par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La teneur n'est pas supérieure à 1 µg d'ovalbumine par dose humaine unitaire.

**Eau** (*2.5.12*). Déterminée par semi-microdosage, la teneur en eau n'est pas supérieure à 3,0 pour cent.

DOSAGE

Les lignées cellulaires et/ou immunosérums neutralisants sont choisis afin de garantir que chaque composant sera titré sans interférence avec les 2 autres composants.

Titrez les virus rougeoleux, des oreillons et rubéoleux infectieux du vaccin, en utilisant au moins 3 flacons séparés de vaccin et en ensemençant un nombre approprié de cupules pour chaque étape de dilution. Titrez en triple le contenu d'un flacon de la préparation de référence appropriée de virus pour valider chaque titrage. La concentration en virus de la préparation de référence est suivie à l'aide d'une carte de contrôle et un titre est établi par chaque laboratoire à partir des données historiques. Si une préparation de référence du fabricant est utilisée, sa relation avec la Préparation Biologique de Référence appropriée de la Pharmacopée Européenne est établie et contrôlée à intervalles réguliers. Calculez la concentration individuelle en virus pour chaque flacon de vaccin et pour chaque échantillon répliqué de la préparation de référence ainsi que les concentrations en virus combinées correspondantes en utilisant les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple).

Les concentrations combinées estimées en virus rougeoleux, des oreillons et rubéoleux pour les 3 flacons de vaccin ne sont pas inférieures à celles indiquées sur l'étiquette ; la concentration minimale en virus rougeoleux indiquée sur l'étiquette n'est pas inférieure à 3,0 log $DICC_{50}$ par dose humaine ; la concentration minimale en virus des oreillons indiquée sur l'étiquette n'est pas inférieure à 3,7 log $DICC_{50}$ par dose humaine ; la concentration minimale en virus rubéoleux indiquée sur l'étiquette n'est pas inférieure à 3,0 log $DICC_{50}$ par dose humaine.

L'essai n'est pas valable si :

- l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration estimée en virus de la préparation de référence pour les 3 échantillons répliqués combinés est supérieur à ± 0,3 log $DICC_{50}$ ;
- la concentration en virus de la préparation de référence diffère de plus de 0,5 log $DICC_{50}$ par rapport à la teneur établie.

L'essai est répété si l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration en virus combinée du vaccin est supérieur à ± 0,3 log $DICC_{50}$ ; seules les données provenant de titrages valides sont combinées par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple) pour le calcul de la concentration en virus de l'échantillon. L'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration en virus combinée n'est pas supérieur à ± 0,3 log $DICC_{50}$.

Le *vaccin rougeoleux vivant PBR* convient comme préparation de référence.

Le *vaccin vivant des oreillons PBR* convient comme préparation de référence.

Le *vaccin rubéoleux vivant PBR* convient comme préparation de référence.

Vaccins

Dans les cas justifiés et autorisés, des titrages de conceptions différentes peuvent être utilisés, ce qui peut impliquer l'application de critères de validité ou d'acceptation différents. Cependant, le vaccin doit être conforme s'il est contrôlé comme décrit ci-dessus.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- les souches de virus utilisées pour la préparation du vaccin,
- dans les cas appropriés, que le vaccin a été préparé sur embryons de poulet,
- le type et l'origine des cellules utilisées pour la préparation du vaccin,
- la concentration minimale en virus pour chaque composant,
- que le contact entre le vaccin et les désinfectants doit être évité.

**01/2011:2442**

# VACCIN ROUGEOLEUX, DES OREILLONS, RUBÉOLEUX ET VARICELLEUX, VIVANT

## Vaccinum morbillorum, parotitidis, rubellae et varicellae vivum

DÉFINITION

Le vaccin rougeoleux, des oreillons, rubéoleux et varicelleux, vivant, est une préparation cryodesséchée obtenue à partir de souches atténuées appropriées du virus rougeoleux, du virus des oreillons, du virus rubéoleux et de l'herpèsvirus humain 3. Le vaccin, reconstitué immédiatement avant l'emploi d'après les indications figurant sur l'étiquette, se présente sous forme d'un liquide limpide qui peut être coloré en raison de la présence d'un indicateur de pH.

PRODUCTION

Les 4 composants sont préparés comme décrit dans les monographies *Vaccin rougeoleux vivant (0213), Vaccin vivant des oreillons (0538), Vaccin rubéoleux vivant (0162)* et *Vaccin varicelleux vivant (0648)* et satisfont aux spécifications qui y sont prescrites.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

*VRAC FINAL*

Les récoltes de virus de chaque composant sont mélangées et clarifiées afin d'éliminer les cellules. Un stabilisant approprié peut être ajouté et les mélanges de récoltes de chaque composant dilués de façon appropriée. Des quantités appropriées du mélange des récoltes de chaque composant sont mélangées. Seul un vrac final qui satisfait à l'essai ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Contamination bactérienne et fongique**. Effectuez l'essai de stérilité (*2.6.1*) en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Pour chaque composant, une concentration minimale en virus pour la libération du vaccin est établie à l'aide des données relatives à la stabilité, de manière à s'assurer qu'en fin de période de validité, la concentration minimale en virus indiquée sur l'étiquette sera présente dans le vaccin. Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable, et cryodesséché jusqu'à une teneur en eau dont il est démontré qu'elle favorise la stabilité du vaccin. Les récipients sont alors fermés pour éviter la contamination et l'introduction d'humidité.

Seul un lot final qui satisfait à la spécification de la concentration minimale en virus de chaque composant pour la libération des lots et aux essais ci-après de stabilité thermique, de sérum-albumine bovine et de teneur en eau, et qui est conforme à chacun des essais décrits sous Identification et Essai peut être libéré. Si l'essai de sérum-albumine bovine a été effectué avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, il peut ne pas être effectué sur le lot final.

**Stabilité thermique**. Sauf exception justifiée et autorisée, l'essai de stabilité thermique s'applique. Pour les composants rougeoleux, des oreillons et rubéoleux, maintenez au minimum 3 flacons du lot final de vaccin cryodesséché à l'état sec à 37 ± 1 °C pendant 7 jours. Selon les modalités décrites sous Dosage, déterminez la concentration en virus du vaccin après chauffage et effectuez en parallèle le titrage d'un échantillon du vaccin conservé à la température de conservation recommandée. Pour chaque composant, la concentration en virus du vaccin après chauffage n'est pas inférieure de plus de 1,0 log à la valeur obtenue avec le vaccin non chauffé.

**Sérum-albumine bovine**. Déterminez la teneur en sérum-albumine bovine par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La teneur n'est pas supérieure à celle approuvée par l'Autorité compétente.

**Eau** (*2.5.12*). Déterminée par semi-microdosage, la teneur en eau n'est pas supérieure à la teneur approuvée par l'Autorité compétente, permettant de garantir la stabilité des vaccins.

IDENTIFICATION

Lorsque le vaccin reconstitué d'après les indications de l'étiquette est mélangé à des anticorps spécifiques du virus rougeoleux, du virus des oreillons, du virus rubéoleux et de l'herpèsvirus humain 3, il n'infecte plus des cultures cellulaires sensibles à ces virus. Lorsque le vaccin reconstitué d'après les indications de l'étiquette est mélangé à des quantités suffisantes d'anticorps spécifiques pour neutraliser 3 des 4 composants, le $4^{e}$ composant infecte des cultures cellulaires sensibles.

ESSAI

**Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin reconstitué satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*).

DOSAGE

Les lignées cellulaires et/ou immunosérums neutralisants sont choisis afin de garantir que chaque composant sera titré sans interférence avec les 3 autres composants.

Titrez les virus rougeoleux, des oreillons, rubéoleux et l'herpèsvirus humain 3 infectieux du vaccin, en utilisant au moins 3 flacons séparés de vaccin et en ensemençant un nombre approprié de cupules pour chaque étape de dilution. Titrez en triple le contenu d'un flacon de la préparation de référence appropriée de virus pour valider chaque titrage. La concentration en virus de la préparation de référence est suivie à l'aide d'une carte de contrôle et un titre est établi par chaque laboratoire à partir des données historiques. Pour les virus rougeoleux, des oreillons, rubéoleux et l'herpèsvirus humain 3, sauf exception justifiée et autorisée, si une préparation de référence du fabricant est utilisée, sa relation avec la Préparation Biologique de Référence appropriée de la Pharmacopée Européenne est établie et contrôlée à intervalles réguliers. Calculez la concentration individuelle en virus pour chaque flacon de vaccin et pour chaque échantillon répliqué de la préparation de référence ainsi que les concentrations en virus combinées correspondantes en utilisant les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple).

Les concentrations combinées estimées en virus rougeoleux, des oreillons, rubéoleux et herpèsvirus humain 3 pour les 3 flacons de vaccin ne sont pas inférieures à celles indiquées sur l'étiquette ; la concentration minimale en virus rougeoleux indiquée sur l'étiquette n'est pas inférieure à 3,0 log $DICC_{50}$ par dose humaine ; la concentration minimale en virus des oreillons indiquée sur l'étiquette n'est pas inférieure à 3,7 log $DICC_{50}$ par

Vaccins

dose humaine ; la concentration minimale en virus rubéoleux indiquée sur l'étiquette n'est pas inférieure à 3,0 log $DICC_{50}$ par dose humaine.

L'essai n'est pas valable si :

– l'intervalle de confiance (*P* = 0,95) de la concentration estimée en virus de la préparation de référence pour les 3 échantillons répliqués combinés est supérieur à ± 0,3 log $DICC_{50}$ (virus rougeoleux, des oreillons et rubéoleux) ou à ± 0,3 log UFP (herpèsvirus humain 3),
– la concentration en virus de la préparation de référence diffère de plus de 0,5 log $DICC_{50}$ (virus rougeoleux, des oreillons et rubéoleux) ou de 0,5 log UFP (herpèsvirus humain 3) par rapport à la teneur établie.

L'essai est répété si l'intervalle de confiance (*P* = 0,95) de la concentration en virus combinée du vaccin est supérieur à ± 0,3 log $DICC_{50}$ (virus rougeoleux, des oreillons et rubéoleux) ou à ± 0,3 log UFP (herpèsvirus humain 3) ; seules les données obtenues à partir de titrages valides sont combinées par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple) pour le calcul de la concentration en virus de l'échantillon. L'intervalle de confiance (*P* = 0,95) de la concentration en virus combinée n'est pas supérieur à ± 0,3 log $DICC_{50}$ (virus rougeoleux, des oreillons et rubéoleux) ou à ± 0,3 log UFP (herpèsvirus humain 3).

Le *vaccin rougeoleux vivant PBR* convient comme préparation de référence.

Le *vaccin vivant des oreillons PBR* convient comme préparation de référence.

Le *vaccin rubéoleux vivant PBR* convient comme préparation de référence.

Le *vaccin varicelleux vivant PBR* convient comme préparation de référence.

Dans des cas justifiés et autorisés, des titrages de conceptions différentes peuvent être utilisés, ce qui peut impliquer l'application de critères de validité et d'acceptation différents. Cependant, le vaccin doit satisfaire à l'essai décrit ci-dessus, s'il lui était appliqué.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– les souches de virus utilisées pour la préparation du vaccin,
– le type et l'origine des cellules utilisées pour la préparation du vaccin,
– la concentration minimale en virus pour chaque composant du vaccin,
– que le contact entre le vaccin et les désinfectants doit être évité.

**04/2008:0213**

# VACCIN ROUGEOLEUX VIVANT

## Vaccinum morbillorum vivum

DÉFINITION

Le vaccin rougeoleux vivant est une préparation cryodesséchée obtenue à partir d'une souche atténuée appropriée du virus rougeoleux. Le vaccin, reconstitué immédiatement avant l'emploi d'après les indications figurant sur l'étiquette, se présente sous forme d'un liquide limpide qui peut être coloré en raison de la présence d'un indicateur de pH.

PRODUCTION

La production du vaccin est basée sur un système de lot de semence virale et, s'il est préparé sur cellules diploïdes humaines, sur un système de banque de cellules. Il aura été démontré que ces systèmes donnent de façon constante des vaccins rougeoleux vivants d'un pouvoir immunogène et d'une innocuité adéquats pour l'homme. Sauf exception justifiée et autorisée, le virus dans le vaccin final n'aura pas subi plus de passages depuis le lot de semence primaire que le vaccin qui a satisfait aux essais cliniques d'innocuité et d'efficacité ; même en cas d'exception autorisée, le nombre de passages au-delà du niveau utilisé pour les essais cliniques ne sera pas supérieur à 5.

La neurovirulence potentielle de la souche vaccinale est considérée lors du développement préclinique, sur la base des données épidémiologiques disponibles concernant la neurovirulence et le neurotropisme, principalement celles pour le type sauvage du virus. A la lumière de ces considérations, une analyse de risque est effectuée. Si nécessaire, et selon les disponibilités, un essai est effectué sur la souche vaccinale en utilisant un modèle animal qui différencie le type sauvage du virus atténué ; les essais sur les souches d'atténuation intermédiaire peuvent également être requis.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

*SUBSTRAT POUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS*

Le virus est multiplié dans des cellules diploïdes humaines (*5.2.3*) ou dans des cultures de cellules d'embryons de poulet provenant d'un élevage exempt de microorganismes pathogènes spécifiés (*5.2.2*).

*LOT DE SEMENCE*

La souche de virus rougeoleux utilisée sera identifiée par des données historiques y compris des informations sur son origine et sa manipulation ultérieure. Les lots de semence virale sont préparés en quantités importantes et conservés à des températures inférieures à – 20 °C s'ils sont cryodesséchés ou inférieures à – 60 °C s'ils ne le sont pas.

Seul un lot de semence qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la multiplication du virus.

**Identification**. L'identité virale des lots de semence primaire et de travail est vérifiée par un essai de séroneutralisation en culture cellulaire, effectué à l'aide d'anticorps spécifiques.

**Concentration en virus**. La concentration en virus dans les lots de semence primaire et de travail est déterminée afin de s'assurer de la régularité de la production.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Le lot de semence de travail satisfait aux essais pour les lots de semence.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

Toutes les manipulations effectuées sur la banque de cellules et les cultures cellulaires dérivées sont conduites dans des conditions d'asepsie, dans un local où d'autres cellules ne sont pas manipulées pendant la production. Un sérum animal approprié (à l'exclusion du sérum humain) peut être utilisé dans la composition du milieu pour la croissance cellulaire, mais le milieu final utilisé pour maintenir les cellules pendant la multiplication virale ne doit pas contenir de sérum animal. Il est démontré que le sérum et la trypsine utilisés dans la préparation des suspensions de cellules et des milieux de culture sont exempts d'agents étrangers. Le milieu de culture cellulaire peut contenir un indicateur de pH, tel que le rouge de phénol, et des antibiotiques appropriés à la plus faible concentration efficace. Il est souhaitable d'utiliser un substrat exempt d'antibiotiques pendant la production. 500 mL au moins des cultures cellulaires de production sont gardés comme cellules témoins non ensemencées. Les suspensions de virus sont recueillies au moment approprié pour la souche de virus utilisée.

Seule une récolte unique qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée dans la préparation du vrac final.

**Identification**. L'identité virale de la récolte unique est vérifiée par un essai de séroneutralisation en culture cellulaire, effectué à l'aide d'anticorps spécifiques.

**Concentration en virus**. La concentration en virus dans les récoltes uniques est déterminée comme prescrit sous Dosage afin de s'assurer de la régularité de la production et de déterminer la dilution à utiliser dans la préparation du vrac final.

Vaccins

**Agents étrangers** (*2.6.16*). La récolte unique satisfait aux essais des agents étrangers.

**Cellules témoins**. Si des cellules diploïdes humaines sont utilisées pour la production, les cellules témoins satisfont à un essai d'identification. Elles satisfont également aux essais des agents étrangers (*2.6.16*).

*VRAC FINAL*

Les récoltes de virus qui satisfont aux essais prescrits ci-dessus sont mélangées et clarifiées afin d'éliminer les cellules. Un stabilisant approprié peut être ajouté et le mélange de récoltes est dilué de façon appropriée.

Seul un vrac final qui satisfait à l'essai ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Contamination bactérienne et fongique**. Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*), effectué en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Une concentration minimale en virus pour la libération du vaccin est établie à l'aide des données de stabilité de manière à s'assurer qu'en fin de période de validité, la concentration minimale en virus indiquée sur l'étiquette sera présente dans le vaccin.

Seul un lot final qui est conforme à la spécification de la concentration minimale en virus pour la libération des lots, à l'essai ci-après de stabilité thermique et à chacun des essais décrits ci-après sous Identification et Essai peut être libéré. Si l'essai de sérum-albumine bovine a été effectué avec de bons résultats sur le vrac final, il peut ne pas être effectué sur le lot final.

**Stabilité thermique**. Maintenez au minimum 3 flacons du lot final de vaccin cryodesséché à l'état sec à 37 ± 1 °C pendant 7 jours. Selon les modalités décrites sous Dosage, déterminez la concentration en virus du vaccin après chauffage et effectuez en parallèle le titrage du vaccin conservé à la température de conservation recommandée. La concentration en virus du vaccin après chauffage n'est pas inférieure de plus de 1,0 log à la valeur obtenue avec le vaccin non chauffé.

IDENTIFICATION

Lorsque le vaccin reconstitué d'après les indications de l'étiquette est mélangé à des anticorps spécifiques du virus rougeoleux, il n'infecte plus des cultures cellulaires sensibles.

ESSAI

**Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin reconstitué satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*).

**Sérum-albumine bovine**. Déterminez la teneur en sérum-albumine bovine par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La teneur n'est pas supérieure à 50 ng par dose humaine unitaire.

**Eau** (*2.5.12*). Déterminée par semi-microdosage, la teneur en eau n'est pas supérieure à 3,0 pour cent.

DOSAGE

Titrez le virus infectieux du vaccin, en utilisant au moins 3 flacons séparés de vaccin et en ensemençant un nombre approprié de cupules pour chaque étape de dilution.
Titrez en triple le contenu d'un flacon de préparation de référence appropriée de virus pour valider chaque titrage.
La concentration en virus de la préparation de référence est suivie à l'aide d'une carte de contrôle et un titre est établi par chaque laboratoire à partir des données historiques. Si une préparation de référence du fabricant est utilisée, sa relation avec la Préparation Biologique de Référence appropriée de la Pharmacopée Européenne est établie et contrôlée à intervalles réguliers. Calculez la concentration individuelle en virus pour chaque flacon de vaccin et pour chaque échantillon répliqué de la préparation de référence ainsi que les concentrations en virus combinées correspondantes en utilisant les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple). La concentration combinée estimée en virus pour les 3 flacons de vaccin n'est pas inférieure à celle indiquée sur l'étiquette ; la concentration minimale en virus indiquée sur l'étiquette n'est pas inférieure à 3,0 log $DICC_{50}$ par dose humaine.

L'essai n'est pas valable si :

– l'intervalle de confiance (*P* = 0,95) de la concentration estimée en virus de la préparation de référence pour les 3 échantillons répliqués combinés est supérieur à ± 0,3 log $DICC_{50}$ ;
– la concentration en virus de la préparation de référence diffère de plus de 0,5 log $DICC_{50}$ par rapport à la teneur établie.

L'essai est répété si l'intervalle de confiance (*P* = 0,95) de la concentration en virus combinée du vaccin est supérieur à ± 0,3 log $DICC_{50}$ ; seules les données provenant de titrages valides sont combinées par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple) pour le calcul de la concentration en virus de l'échantillon. L'intervalle de confiance (*P* = 0,95) de la concentration en virus combinée n'est pas supérieur à ± 0,3 log $DICC_{50}$.

Le *vaccin rougeoleux vivant PBR* convient comme préparation de référence.

Dans les cas justifiés et autorisés, des titrages de conceptions différentes peuvent être utilisés, ce qui peut impliquer l'application de critères de validité ou d'acceptation différents. Cependant, le vaccin doit être conforme s'il est contrôlé comme décrit ci-dessus.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– la souche de virus utilisée pour la préparation du vaccin,
– le type et l'origine des cellules utilisées pour la préparation du vaccin,
– la concentration minimale en virus,
– que le contact entre le vaccin et les désinfectants doit être évité.

**04/2010:0162**

# VACCIN RUBÉOLEUX VIVANT

## Vaccinum rubellae vivum

DÉFINITION

Le vaccin rubéoleux vivant est une préparation cryodesséchée obtenue à partir d'une souche atténuée appropriée du virus rubéoleux. Le vaccin, reconstitué immédiatement avant l'emploi d'après les indications figurant sur l'étiquette, se présente sous forme d'un liquide limpide qui peut être coloré en raison de la présence d'un indicateur de pH.

PRODUCTION

La production du vaccin est basée sur un système de lot de semence virale et un système de banque de cellules. Il aura été démontré que ces systèmes donnent de façon constante des vaccins rubéoleux vivants d'un pouvoir immunogène et d'une innocuité adéquats pour l'homme. Sauf exception justifiée et autorisée, le virus dans le vaccin final n'aura pas subi plus de passages depuis le lot de semence primaire que le vaccin qui a satisfait aux essais cliniques d'innocuité et d'efficacité.

La neurovirulence potentielle de la souche vaccinale est considérée lors du développement préclinique, sur la base des données épidémiologiques disponibles concernant la neurovirulence et le neurotropisme, principalement celles pour le type sauvage du virus. A la lumière de ces considérations, une analyse de risque est effectuée. Si nécessaire, et selon les disponibilités, un essai est effectué sur la souche vaccinale en utilisant un modèle animal qui différencie le type sauvage du virus atténué ; les essais sur les souches d'atténuation intermédiaire peuvent également être requis.

Vaccins

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

*SUBSTRAT POUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS*

Le virus est multiplié dans des cellules diploïdes humaines (*5.2.3*).

*LOT DE SEMENCE*

La souche de virus rubéoleux utilisée sera identifiée par des données historiques y compris des informations sur son origine et sa manipulation ultérieure. Les lots de semence virale sont préparés en quantités importantes et conservés à des températures inférieures à – 20 °C s'ils sont cryodesséchés ou inférieures à – 60 °C s'ils ne le sont pas.

Seul un lot de semence qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la multiplication du virus.

**Identification**. L'identité virale des lots de semence primaire et de travail est vérifiée par un essai de séroneutralisation en culture cellulaire, effectué à l'aide d'anticorps spécifiques.

**Concentration en virus**. La concentration en virus dans les lots de semence primaire et de travail est déterminée afin de s'assurer de la régularité de la production.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Le lot de semence de travail satisfait aux exigences pour les lots de semence.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

Toutes les manipulations effectuées sur la banque de cellules et les cultures cellulaires dérivées sont conduites dans des conditions d'asepsie, dans un local où d'autres cellules ne sont pas manipulées pendant la production. Un sérum animal approprié (à l'exclusion du sérum humain) peut être utilisé dans la composition du milieu pour la croissance cellulaire, mais le milieu final utilisé pour maintenir les cellules pendant la multiplication virale ne doit pas contenir de sérum animal. Il est démontré que le sérum et la trypsine utilisés dans la préparation des suspensions de cellules et des milieux de culture sont exempts d'agents étrangers. Le milieu de culture cellulaire peut contenir un indicateur de pH, tel que le rouge de phénol, et des antibiotiques appropriés à la plus faible concentration efficace. Il est souhaitable d'utiliser un substrat exempt d'antibiotiques pendant la production. 500 mL au moins des cultures cellulaires de production sont gardés comme cellules témoins non ensemencées. La température d'incubation est contrôlée pendant la multiplication du virus. Les suspensions de virus sont recueillies en une ou plusieurs fois pendant les 28 jours suivant l'inoculation. Les récoltes multiples d'un même lot de cellules peuvent être réunies et considérées comme une récolte unique.

Seule une récolte unique qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée dans la préparation du vrac final.

**Identification**. L'identité virale de la récolte unique est vérifiée par un essai de séroneutralisation en culture cellulaire, effectué à l'aide d'anticorps spécifiques.

**Concentration en virus**. La concentration en virus dans la récolte unique est déterminée comme prescrit sous Dosage afin de s'assurer de la régularité de la production et de déterminer la dilution à utiliser dans la préparation du vrac final.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). La récolte unique satisfait aux essais des agents étrangers.

**Cellules témoins**. Les cellules témoins satisfont à un essai d'identification et aux essais des agents étrangers (*2.6.16*).

*VRAC FINAL*

Les récoltes de virus qui satisfont aux essais prescrits ci-dessus sont mélangées et clarifiées afin d'éliminer les cellules. Un stabilisant approprié peut être ajouté et le mélange de récoltes est dilué de façon appropriée.

Seul un vrac final qui satisfait à l'essai ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Contamination bactérienne et fongique**. Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*), effectué en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Une concentration minimale en virus pour la libération du vaccin est établie à l'aide des données de stabilité de manière à s'assurer qu'en fin de période de validité, la concentration minimale en virus indiquée sur l'étiquette sera présente dans le vaccin.

Seul un lot final qui est conforme à la spécification de la concentration minimale en virus pour la libération des lots, à l'essai ci-après de stabilité thermique et à chacun des essais décrits ci-après sous Identification et Essai peut être libéré. Si l'essai de sérum-albumine bovine a été effectué avec de bons résultats sur le vrac final, il peut ne pas être effectué sur le lot final.

**Stabilité thermique**. Maintenez au minimum 3 flacons du lot final de vaccin cryodesséché à l'état sec à 37 ± 1 °C pendant 7 jours. Selon les modalités décrites sous Dosage, déterminez la concentration en virus du vaccin après chauffage et effectuez en parallèle le titrage du vaccin conservé à la température de conservation recommandée. La concentration en virus du vaccin après chauffage n'est pas inférieure de plus de 1,0 log à la valeur obtenue avec le vaccin non chauffé.

## IDENTIFICATION

Lorsque le vaccin reconstitué d'après les indications de l'étiquette est mélangé à des anticorps spécifiques du virus rubéoleux, il n'infecte plus des cultures cellulaires sensibles.

## ESSAI

**Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin reconstitué satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*).

**Sérum-albumine bovine**. Déterminez la teneur en sérum-albumine bovine par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La teneur n'est pas supérieure à 50 ng par dose humaine unitaire.

**Eau** (*2.5.12*). Déterminée par semi-microdosage, la teneur en eau n'est pas supérieure à 3,0 pour cent.

## DOSAGE

Titrez le virus infectieux du vaccin, en utilisant au moins 3 flacons séparés de vaccin et en ensemençant un nombre approprié de cupules pour chaque étape de dilution.
Titrez en triple le contenu d'un flacon de préparation de référence appropriée de virus pour valider chaque titrage.
La concentration en virus de la préparation de référence est suivie à l'aide d'une carte de contrôle et un titre est établi par chaque laboratoire à partir des données historiques. Si une préparation de référence du fabricant est utilisée, sa relation avec la Préparation Biologique de Référence de la Pharmacopée Européenne appropriée est établie et contrôlée à intervalles réguliers. Calculez la concentration individuelle en virus pour chaque flacon de vaccin et pour chaque échantillon répliqué de la préparation de référence ainsi que les concentrations en virus combinées correspondantes en utilisant les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple). La concentration combinée estimée en virus pour les 3 flacons de vaccin n'est pas inférieure à celle indiquée sur l'étiquette ; la concentration minimale en virus indiquée sur l'étiquette n'est pas inférieure à 3,0 log $DICC_{50}$ par dose humaine.

L'essai n'est pas valable si :

– l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration estimée en virus de la préparation de référence pour les 3 échantillons répliqués combinés est supérieur à ± 0,3 log $DICC_{50}$ ;
– la concentration en virus de la préparation de référence diffère de plus de 0,5 log $DICC_{50}$ par rapport à la teneur établie.

Vaccins

L'essai est répété si l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration en virus combinée du vaccin est supérieur à ± 0,3 log $DICC_{50}$ ; seules les données provenant de titrages valides sont combinées par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple) pour le calcul de la concentration en virus de l'échantillon. L'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration en virus combinée n'est pas supérieur à ± 0,3 log $DICC_{50}$.

Le *vaccin rubéoleux vivant PBR* convient comme préparation de référence.

Dans les cas justifiés et autorisés, des titrages de conceptions différentes peuvent être utilisés, ce qui peut impliquer l'application de critères de validité ou d'acceptation différents. Cependant, le vaccin doit être conforme s'il est contrôlé comme décrit ci-dessus.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- la souche de virus utilisée pour la préparation du vaccin,
- le type et l'origine des cellules utilisées pour la préparation du vaccin,
- la concentration minimale en virus,
- que le contact entre le vaccin et les désinfectants doit être évité.

**01/2008:0452**
**corrigé 6.0**

# VACCIN TÉTANIQUE ADSORBÉ

## Vaccinum tetani adsorbatum

DÉFINITION

Le vaccin tétanique adsorbé est une préparation d'anatoxine tétanique avec un adsorbant minéral. L'anatoxine est obtenue par l'action du formaldéhyde sur la toxine résultant de la croissance de *Clostridium tetani*.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

**Toxicité spécifique**. Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai suivant, s'il lui était appliqué : utilisez 5 cobayes en bonne santé, pesant de 250-350 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux par voie sous-cutanée une quantité équivalant à 5 fois la dose humaine unitaire indiquée sur l'étiquette. Si, dans les 21 jours qui suivent l'injection, un des animaux présente des signes ou meurt du tétanos, le vaccin ne satisfait pas à l'essai. Si plus de 1 animal meurt de causes non spécifiques, répétez l'essai une seule fois ; si plus de 1 animal meurt dans le second essai, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

*ANATOXINE PURIFIÉE EN VRAC*

Pour la production de la toxine tétanique, à partir de laquelle l'anatoxine est préparée, les cultures de semence sont organisées dans un système défini de lot de semence où le pouvoir toxigène est maintenu et restauré, si besoin est, par une nouvelle sélection. Une souche de *Clostridium tetani* fortement toxigène dont l'origine et l'historique sont connus, est cultivée en milieu liquide approprié. En fin de croissance, la pureté de chaque culture est vérifiée et les cultures contaminées sont éliminées. Le milieu de culture contenant la toxine est récolté aseptiquement. La teneur en toxine (Lf par millilitre) est déterminée (*2.7.27*) afin de contrôler la régularité de la production. Des récoltes individuelles peuvent être réunies pour préparer l'anatoxine purifiée en vrac. La toxine est purifiée pour éliminer les composants susceptibles de causer des réactions indésirables en usage humain. La toxine purifiée est détoxifiée par le formaldéhyde selon une méthode qui évite de détruire l'activité immunogène de l'anatoxine et la réversibilité à la toxine, notamment par action de la chaleur. La purification peut également être effectuée après détoxification.

Seule une anatoxine purifiée en vrac qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée dans la préparation du vrac final.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Absence de toxine et irréversibilité de l'anatoxine**. A l'aide de la solution tampon, sans adsorbant, utilisée dans le vaccin final, préparez une solution d'anatoxine purifiée à la même concentration que dans le vaccin final. Divisez la solution en 2 parties égales. Maintenez l'une d'elle à 5 ± 3 °C et l'autre à 37 °C pendant 6 semaines. Soumettez les 2 échantillons à l'épreuve comme décrit ci-après. Utilisez 15 cobayes pesant 250-350 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injectez à 5 cobayes par voie sous-cutanée 5 mL de l'échantillon incubé à 5 ± 3 °C. Injectez à 5 cobayes par voie sous-cutanée 5 mL de l'échantillon incubé à 37 °C. Injectez à 5 cobayes par voie sous-cutanée au moins 500 Lf d'anatoxine purifiée non-incubée sous un volume de 1 mL. L'anatoxine purifiée satisfait à l'essai si, pendant les 21 jours qui suivent l'injection, aucun cobaye ne présente des signes ni ne meurt de tétanos. Si plus de 1 cobaye meurt de causes non spécifiques, répétez l'essai ; si plus de 1 cobaye meurt dans le second essai, l'anatoxine ne satisfait pas à l'essai.

**Pureté antigénique** (*2.7.27*). L'anatoxine purifiée en vrac contient au minimum 1000 Lf par milligramme d'azote protéique.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé par adsorption d'une quantité appropriée d'anatoxine purifiée en vrac sur un support minéral tel que du phosphate d'aluminium hydraté ou de l'hydroxyde d'aluminium ; le mélange obtenu est approximativement isotonique au sang. Des conservateurs antimicrobiens appropriés peuvent être ajoutés. L'activité antigénique du vaccin est altérée par certains conservateurs antimicrobiens, notamment ceux du type phénolique, qui ne doivent pas être ajoutés au vaccin.

Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable. Les récipients sont fermés de façon à prévenir toute contamination.

Seul un lot final qui est conforme à chacun des essais décrits ci-après sous Identification, Essai et Activité peut être libéré. Si l'essai de conservateur antimicrobien et la détermination de l'activité ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

Si la teneur en formaldéhyde libre a été déterminée sur l'anatoxine purifiée en vrac ou sur le vrac final et s'il a été démontré que la teneur dans le lot final ne dépassera pas 0,2 g/L, l'essai du formaldéhyde libre peut ne pas être effectué sur le lot final.

IDENTIFICATION

L'anatoxine tétanique est identifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La méthode ci-après, applicable à certains vaccins, est donnée à titre d'exemple. Dissolvez dans le vaccin tétanique adsorbé une quantité suffisante de *citrate de sodium R* pour obtenir une solution à 100 g/L. Faites incuber à 37 °C pendant environ 16 h et

centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Le liquide surnageant limpide réagit avec une antitoxine tétanique appropriée en donnant un précipité.

ESSAI

**Aluminium** (*2.5.13*) : au maximum 1,25 mg par dose humaine unitaire, si l'adsorbant utilisé est de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium hydraté.

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage chimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à la teneur minimale qui s'est avérée efficace et elle n'est pas supérieure à 115 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin tétanique adsorbé satisfait à l'essai de stérilité.

ACTIVITÉ

Evaluez l'activité du vaccin tétanique adsorbé par un des titrages prescrits (*2.7.8*).

La limite inférieure de confiance ($P$ = 0,95) de l'activité estimée n'est pas inférieure à 40 UI par dose humaine unitaire.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nombre minimal d'Unités Internationales par dose humaine unitaire,
– le nom et la quantité de l'adsorbant utilisé,
– que le vaccin doit être agité avant l'emploi,
– que le vaccin ne doit pas être congelé.

**01/2008:0156**

# VACCIN TYPHOÏDIQUE

## Vaccinum febris typhoidi

DÉFINITION

Le vaccin typhoïdique est une suspension stérile de *Salmonella typhi* inactivés qui contient au minimum 5 × $10^8$ et au maximum 1 × $10^9$ bactéries (*S. typhi*) par dose humaine. Cette dose n'est pas supérieure à 1,0 mL.

PRODUCTION

Le vaccin est obtenu à partir d'un lot de semence provenant d'une souche appropriée telle que Ty 2[(7)] de *S. typhi*. Le vaccin final représente au maximum 3 subcultures de la souche sur laquelle ont été réalisés les examens de laboratoire et les essais cliniques ayant démontré qu'elle est utilisable. Les bactéries sont inactivées par l'acétone, par le formaldéhyde, par le phénol ou par le chauffage ou par l'association de ces 2 derniers procédés.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait, s'il lui était appliqué, à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), modifié comme suit : injectez 0,5 mL du vaccin par souris ; injectez 1,0 mL du vaccin par cobaye.

IDENTIFICATION

Le vaccin typhoïdique est identifié par agglutination spécifique.

ESSAI

**Phénol** (*2.5.15*). Si le phénol est utilisé, sa concentration ne dépasse pas 5 g/L.

**Pouvoir antigénique**. Injectez le vaccin typhoïdique à des animaux de laboratoire réceptifs. Le vaccin stimule la formation des agglutinines anti-O, anti-H et, en quantité moindre, anti-Vi.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin typhoïdique satisfait à l'essai de stérilité.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le procédé utilisé pour inactiver les bactéries,
– le nombre de bactéries par dose humaine.

**01/2008:0157**

# VACCIN TYPHOÏDIQUE CRYODESSÉCHÉ

## Vaccinum febris typhoidi cryodesiccatum

DÉFINITION

Le vaccin typhoïdique cryodesséché est une préparation obtenue à partir de *Salmonella typhi* inactivés. Le vaccin reconstitué d'après les indications de l'étiquette se présente sous forme d'une suspension homogène qui contient au minimum 5 × $10^8$ et au maximum 1 × $10^9$ bactéries (*S. typhi*) par dose humaine. Cette dose n'est pas supérieure à 1,0 mL du vaccin reconstitué.

PRODUCTION

Le vaccin est obtenu à partir d'un lot de semence provenant d'une souche appropriée telle que Ty 2[(8)] de *S. typhi*. Le vaccin final représente au maximum 3 subcultures de la souche sur laquelle ont été réalisés les examens de laboratoire et les essais cliniques ayant démontré qu'elle est utilisable. Les bactéries sont inactivées par l'acétone, par le formaldéhyde ou par chauffage. Le phénol ne doit pas être utilisé. Le vaccin est réparti dans des récipients stériles, puis cryodesséché jusqu'à obtention d'une préparation dont la teneur en eau favorise la stabilité du vaccin. Les récipients sont ensuite fermés de façon à prévenir toute contamination.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait, s'il lui était appliqué, à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), modifié comme suit : injectez 0,5 mL du vaccin par souris ; injectez 1,0 mL du vaccin par cobaye.

IDENTIFICATION

Le vaccin typhoïdique cryodesséché, reconstitué d'après les indications de l'étiquette, est identifié par agglutination spécifique.

ESSAI

**Phénol** (*2.5.15*). Si le phénol est utilisé, sa concentration ne dépasse pas 5 g/L.

**Pouvoir antigénique**. Injectez le vaccin reconstitué à des animaux de laboratoire réceptifs. Le vaccin stimule la formation des agglutinines anti-O, anti-H et, en quantité moindre, anti-Vi.

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin reconstitué satisfait à l'essai de stérilité.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le procédé utilisé pour inactiver les bactéries,
– le nombre de bactéries par dose humaine,
– que le vaccin doit être utilisé dans les 8 h qui suivent sa reconstitution.



(7) Cette souche est distribuée par le Centre de Référence et de Recherche des Vaccins Bactériens de l'Organisation Mondiale de la Santé, Institut des sérums et vaccins pour usage humain, Szallas Utca 5, H-1107 Budapest, Hongrie.
(8) Cette souche est distribuée par le Centre de Référence et de Recherche des Vaccins Bactériens de l'Organisation Mondiale de la Santé, Institut des sérums et vaccins pour usage humain, Szallas Utca 5, H-1107 Budapest, Hongrie.

Vaccins

**01/2008:1160**

# VACCIN TYPHOÏDIQUE POLYOSIDIQUE

## Vaccinum febris typhoidis polysaccharidicum

DÉFINITION

Le vaccin typhoïdique polyosidique est une préparation de polyoside capsulaire Vi purifié, obtenu à partir de *Salmonella typhi* de la souche Ty 2 ou d'une autre souche appropriée qui est capable de produire le polyoside Vi.

Le polyoside capsulaire Vi est constitué par des unités répétées et partiellement 3-*O*-acétylées d'acide 2-acétylamino-2-désoxy-D-galactopyranuronique à liaisons α-(1→4).

PRODUCTION

La production du polyoside Vi est basée sur un système de lot de semence. Il doit être démontré que la méthode de production donne de façon constante des vaccins typhoïdiques polyosidiques de pouvoir immunogène et d'innocuité adéquats pour l'homme.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

*LOTS DE SEMENCE*

La souche de *S. typhi* utilisée pour préparer le lot de semence primaire devra être identifiée par des données historiques y compris des informations sur son origine et par ses caractéristiques biochimiques et sérologiques. Les cultures préparées à partir du lot de semence de travail doivent avoir les mêmes caractéristiques que la souche utilisée pour préparer le lot de semence primaire.

Seule une souche qui présente les caractéristiques suivantes peut être utilisée dans la production du vaccin : (a) les frottis colorés préparés à partir d'une culture sont typiques des entérobactéries ; (b) la culture utilise le glucose sans production de gaz ; (c) les colonies sur gélose sont oxidase négatives ; (d) une suspension de la culture présente une réaction d'agglutination en présence d'un antisérum Vi approprié ou les colonies présentent des auréoles sur une plaque de gélose contenant un antisérum Vi approprié.

La pureté de la souche bactérienne utilisée pour le lot de semence est vérifiée par des méthodes de sensibilité appropriée. Ces méthodes peuvent comprendre un ensemencement en milieux appropriés, l'examen morphologique des colonies, l'examen microscopique de frottis à coloration de Gram et l'agglutination des cultures à l'aide d'antisérums spécifiques appropriés.

*CULTURE ET RÉCOLTE*

Le lot de semence de travail est cultivé sur un milieu solide, qui peut contenir des substances de groupe sanguin, ou sur un milieu liquide ; l'inoculum obtenu est transféré dans un milieu liquide qui servira à ensemencer le milieu final. Le milieu liquide utilisé ainsi que le milieu final sont des milieux hémisynthétiques, exempts de substances précipitées par le bromure de cétrimonium ; ils ne contiennent pas de substances de groupe sanguin ou de polyosides de masse moléculaire élevée, sauf s'il a été démontré que le procédé de purification élimine ces substances.

La pureté bactérienne de la culture est vérifiée par des méthodes de sensibilité appropriée. Ces méthodes peuvent comprendre un ensemencement en milieux appropriés, l'examen morphologique des colonies, l'examen microscopique de frottis à coloration de Gram et l'agglutination des cultures à l'aide d'antisérums spécifiques appropriés.

La culture est ensuite inactivée au début de la phase stationnaire par addition de formaldéhyde. Les cellules bactériennes sont éliminées par centrifugation ; le polyoside est précipité du milieu de culture par addition de bromure d'hexadécyltriméthylammonium (bromure de cétrimonium). Le précipité est récolté et peut être conservé à – 20 °C en attente de purification.

*POLYOSIDE VI PURIFIÉ*

Le polyoside est purifié après dissociation du complexe polyoside/bromure de cétrimonium par éliminations successives des acides nucléiques, des protéines et des lipopolysaccharides par des traitements appropriés. Il est ensuite précipité sous forme de sel calcique en présence d'éthanol. Le précipité est alors desséché à 2-8 °C ; la poudre obtenue constitue le polyoside Vi purifié. La perte à la dessiccation est déterminée par thermogravimétrie (*2.2.34*) et sert à calculer le résultat des autres essais chimiques par rapport à la substance desséchée.

Seul un polyoside Vi purifié qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du vrac final.

**Protéines** (*2.5.16*) : au maximum 10 mg de protéines par gramme de polyoside, calculé par rapport à la substance desséchée.

**Acides nucléiques** (*2.5.17*) : au maximum 20 mg d'acides nucléiques par gramme de polyoside, calculé par rapport à la substance desséchée.

**Groupements *O*-acétyle** (*2.5.19*) : au minimum 2 mmol de groupements *O*-acétyle par gramme de polyoside, calculé par rapport à la substance desséchée.

**Distribution de taille moléculaire**. Déterminez la taille moléculaire par chromatographie d'exclusion (*2.2.30*) sur *agarose reticulé pour chromatographie R*. Utilisez une colonne d'une longueur de 0,9 m et d'un diamètre intérieur de 16 mm équilibrée avec un solvant d'une force ionique de 0,2 mol/kg et d'un pH de 7,0-7,5. Utilisez une prise d'essai de polyoside à examiner contenant environ 5 mg dans un volume de 1 mL et éluez à un débit d'environ 20 mL/h. Recueillez des fractions d'environ 2,5 mL. Déterminez le point correspondant à $K_0$ = 0,25 et constituez 2 mélanges, l'un correspondant aux fractions éluées avant ce point, l'autre à celles éluées après. Réalisez un dosage des groupements *O*-acétyle (*2.5.19*) sur les 2 mélanges. Au moins 50 pour cent du polyoside élué est retrouvé dans le mélange avant $K_0$ = 0,25.

**Identification**. Effectuez un essai d'identification par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

**Endotoxines bactériennes**. La teneur en endotoxines du polyoside Vi purifié, déterminée par une méthode appropriée (*2.6.14*), n'est pas supérieure à la limite approuvée pour le produit considéré.

*VRAC FINAL*

Un ou plusieurs lots de polyoside Vi purifié sont dissous dans un solvant approprié, qui peut contenir un conservateur antimicrobien, pour obtenir une solution où le volume correspondant à 1 dose contient 25 µg de polyoside et qui est isotonique au sang (250-350 mosmol/kg).

Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Stérilité** (*2.6.1*). Effectuez l'essai de stérilité en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage physicochimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à 85 pour cent ni supérieure à 115 pour cent de la teneur voulue.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti dans des récipients stériles dans des conditions aseptiques. Les récipients sont ensuite fermés de façon à empêcher toute contamination.

Seul un lot final qui est conforme à l'essai des endotoxines bactériennes décrit ci-après et aux essais décrits ci-après sous Identification, Essai et Activité peut être libéré. Si les essais de

formaldéhyde libre et de conservateur antimicrobien ont été réalisés sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

**Endotoxines bactériennes**. La teneur en endotoxines du vaccin à examiner, déterminée par une méthode appropriée (*2.6.14*), n'est pas supérieure à la limite approuvée pour le produit considéré.

CARACTÈRES

Liquide limpide, incolore, exempt de particules visibles.

IDENTIFICATION

Effectuez un essai d'identification par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 6,5 à 7,5.

**Groupements *O*-acétyle** : 0,085 µmol (± 25 pour cent) de groupements *O*-acétyle par dose de 25 µg de polyoside.

*Solution à examiner*. Introduisez 3 mL du vaccin typhoïdique polyosidique dans chacun de 3 tubes (1 témoin, 2 essais).

*Solutions de référence*. Dissolvez 0,150 g de *chlorure d'acétylcholine R* dans 10 mL d'*eau R* (solution mère contenant 15 g de chlorure d'acétylcholine par litre). Diluez extemporanément 0,5 mL de la solution mère à 50 mL avec de l'*eau R* (solution de référence contenant l'équivalent de 150 µg de chlorure d'acétylcholine par millilitre). Dans 10 tubes, introduisez respectivement 2 fois 0,1 mL (essai et témoin), 2 fois 0,2 mL (essai et témoin), 2 fois 0,5 mL (essai et témoin), 2 fois 1,0 mL (essai et témoin), 2 fois 1,5 mL (essai et témoin) de la solution de référence.

Préparez un blanc à partir de 3 mL d'*eau R*.

Complétez le volume dans chaque tube à 3 mL avec de l'*eau R*. Ajoutez 0,5 mL d'un mélange de 1 volume d'*eau R* et de 2 volumes d'*acide chlorhydrique dilué R* à chacun des tubes témoins et au blanc. A tous les tubes, ajoutez 1,0 mL de *solution alcaline d'hydroxylamine R*. Laissez en contact 2 min exactement. Ajoutez 0,5 mL d'un mélange de 1 volume d'*eau R* et de 2 volumes d'*acide chlorhydrique dilué R* à chacun des tubes contenant une solution essai. A tous les tubes, ajoutez 0,5 mL d'une solution de *chlorure ferrique R* à 200 g/L dans l'*acide chlorhydrique 0,2 M*. Agitez vigoureusement les tubes bouchés pour éliminer les bulles.

Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 540 nm en utilisant le blanc comme liquide de compensation. Pour chaque essai, retranchez la valeur de l'absorbance du témoin correspondant. Portez sur un graphique les différences d'absorbance calculées des 5 solutions de référence en fonction des quantités de chlorure d'acétylcholine qui y sont contenues, puis lisez sur la courbe d'étalonnage la quantité de chlorure d'acétylchloline dans la solution à examiner pour chacun des volumes testés. Calculez la moyenne des 2 valeurs.

1 mole de chlorure d'acétylcholine (181,7 g) correspond à 1 mole d'*O*-acétyle (43,05 g).

**Formaldéhyde libre** (*2.4.18*) : au maximum 0,2 g/L.

**Conservateur antimicrobien**. Le cas échéant, déterminez la teneur en conservateur antimicrobien par un dosage physicochimique approprié. La teneur n'est pas inférieure à la teneur minimale qui s'est avérée efficace et elle n'est pas supérieure à 115 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette. Si le phénol a été utilisé pendant la préparation, la teneur ne dépasse pas 2,5 g/L (*2.5.15*).

**Stérilité** (*2.6.1*). Le vaccin typhoïdique polyosidique satisfait à l'essai de stérilité.

ACTIVITÉ

Effectuez un dosage du polyoside Vi par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) en utilisant comme référence un polyoside purifié. La teneur estimée en polyoside Vi du vaccin typhoïdique polyosidique n'est pas inférieure à 80 pour cent ni supérieure à 120 pour cent de la quantité indiquée sur l'étiquette. Les limites de confiance ($P$ = 0,95) de la teneur estimée ne sont pas inférieures à 80 pour cent ni supérieures à 120 pour cent.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nombre de microgrammes de polyoside par dose humaine (25 µg),
– la quantité totale de polyoside dans le récipient.

**04/2009:1055**

# VACCIN TYPHOÏDIQUE VIVANT, ORAL, SOUCHE Ty 21a

## Vaccinum febris typhoidis vivum perorale (stirpe Ty 21a)

DÉFINITION

Le vaccin typhoïdique vivant, oral, souche Ty 21a est une préparation cryodesséchée de *Salmonella typhi* souche Ty 21a vivante, cultivée dans un milieu approprié. Lorsque le vaccin est présenté sous forme de capsules, il satisfait à la monographie *Capsules (0016)*.

PRODUCTION

*CHOIX DE LA SOUCHE VACCINALE*

La caractéristique principale de la souche est l'absence de l'enzyme uridine-diphosphate-galactose-4-épimérase accompagnée d'une réduction de 50 pour cent à 90 pour cent des activités galactoperméase, galactokinase et de galactose-1-phosphate uridyl-transférase. Quelles que soient les conditions de culture, la souche ne contient pas d'antigène Vi. La souche présente une réaction d'agglutination vis-à-vis d'un sérum anti-O:9 uniquement si elle a été cultivée sur un milieu contenant du galactose. La souche contient l'antigène flagellaire H:d et ne produit pas de sulfure d'hydrogène sur milieu gélosé-fer de Kligler. La souche est non virulente pour la souris. Lorsque la souche Ty 21a est cultivée sur un milieu contenant 1 pour cent de galactose, il se produit une lyse des cellules.

*LOTS DE SEMENCE*

La production du vaccin est effectuée selon un système de lot de semence. Les lots de semence de travail sont préparés par une seule subculture du lot de semence primaire. Le vaccin final représente au maximum 4 subcultures réalisées à partir du vaccin d'origine sur lequel ont été effectués les examens de laboratoire et les essais cliniques qui ont démontré que la souche est acceptable.

Seul un lot de semence primaire qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation des lots de semence de travail.

**Métabolisme du galactose**. Dans un dosage spectrophotométrique, la souche Ty 21a, comparée à la souche Ty 2, ne présente pas au niveau du cytoplasme d'activité uridine-diphosphate-galactose-4-épimérase.

**Biosynthèse de lipopolyoside**. Les lipopolyosides sont extraits par le phénol à chaud puis examinés par chromatographie d'exclusion. La souche Ty 21a cultivée sur un milieu sans galactose présente uniquement le lipopolyoside du type R (« rugueux »).

**Caractéristiques sérologiques**. La souche Ty 21a cultivée sur un milieu synthétique sans galactose ne présente pas de réaction d'agglutination vis-à-vis d'un immunosérum spécifique anti-O:9. Quelles que soient les conditions de culture, la souche Ty 21a ne présente pas de réaction d'agglutination vis-à-vis d'un immunosérum anti-Vi. La souche Ty 21a présente une réaction d'agglutination vis-à-vis d'un immunosérum anti-H:d flagellaire.

**Marqueurs biochimiques**. La souche Ty 21a ne produit pas de sulfure d'hydrogène sur milieu gélosé-fer de Kligler, ce qui la différencie des autres souches de *S. typhi* galactose-épimérase négatives.

**Croissance**. Cultivées sur un milieu contenant 1 pour cent de galactose, les cellules de la souche Ty 21a sont lysées.

*CULTURE ET RÉCOLTE*

Les bactéries provenant du lot de semence de travail sont multipliées dans une culture préliminaire et une subculture est effectuée avant la croissance sur un milieu approprié contenant 0,001 pour cent de galactose, à 30 °C pendant 13 h à 15 h. Les bactéries sont récoltées. La récolte doit être exempte de microorganismes étrangers.

Seule une récolte unique qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée dans la préparation de la récolte cryodesséchée.

**pH**. Le pH de la culture est de 6,8 à 7,5.

**Densité optique**. La densité optique de la culture mesurée à 546 nm est de 6,5 à 11,0. Avant d'effectuer la mesure, diluez la culture afin d'obtenir une lecture comprise entre 0,1 et 0,5 et corrigez la valeur mesurée pour tenir compte de la dilution.

**Identification**. Les bactéries cultivées sur un milieu gélosé contenant 1 pour cent de galactose et du bleu de bromothymol forment des colonies concaves bleu pâle qui sont transparentes en raison de la lyse des cellules. Il ne se forme pas de colonies jaunes (indiquant une fermentation du galactose).

*RÉCOLTE CRYODESSÉCHÉE*

La récolte est mélangée à un stabilisant approprié, puis cryodesséchée par un procédé qui assure la survie d'au moins 10 pour cent des bactéries, jusqu'à une teneur en eau démontrée favorable à la stabilité du vaccin. Le vaccin ne contient pas de conservateur antimicrobien.

Seule une récolte cryodesséchée qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée dans la préparation du vrac final.

**Identification**. Les bactéries cultivées sur un milieu gélosé contenant 1 pour cent de galactose et du bleu de bromothymol forment des colonies concaves bleu pâle qui sont transparentes en raison de la lyse des cellules. Il ne se forme pas de colonies jaunes (indiquant une fermentation du galactose).

**Dénombrement des bactéries vivantes**. Le nombre de *S. typhi* souche Ty 21a vivantes n'est pas inférieur à $1 \times 10^{11}$ par gramme.

**Eau** (*2.5.12*). Déterminée par semi-microdosage, la teneur en eau est de 1,5 pour cent à 4,0 pour cent.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé dans des conditions appropriées par mélange d'une ou de plusieurs récoltes cryodesséchées à des excipients appropriés.

Seul un vrac final qui satisfait à l'essai ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Dénombrement des bactéries vivantes**. Le nombre de *S. typhi* souche Ty 21a vivantes n'est pas inférieur à $40 \times 10^9$ par gramme.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti dans des conditions appropriées dans des capsules gastro-résistantes ou dans des récipients appropriés.

Seul un lot final qui est conforme à chacun des essais décrits sous Identification, Essai et Dénombrement des bactéries vivantes peut être libéré, sous réserve que le nombre de bactéries vivantes soit de $4 \times 10^9$ par unité de prise.

IDENTIFICATION

Les bactéries isolées à partir du vaccin à examiner, cultivées sur un milieu gélosé contenant 1 pour cent de galactose et du bleu de bromothymol forment des colonies concaves bleu pâle qui sont transparentes en raison de la lyse des cellules. Il ne se forme pas de colonies jaunes (indiquant une fermentation du galactose).

ESSAI

**Contamination bactérienne et fongique** (*2.6.12*, *2.6.13*). Utilisez des milieux sélectifs appropriés. Déterminez le nombre de microorganismes viables totaux par dénombrement sur plaque de gélose. Le nombre de germes contaminants ne dépasse pas $10^2$ bactéries et 20 champignons par unité de prise. Aucune bactérie pathogène, notamment *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, et aucune salmonelle autre que la souche Ty 21a ne sont mises en évidence.

**Eau** (*2.5.12*). Déterminée par semi-microdosage sur le contenu de la capsule ou du récipient, la teneur en eau est de 1,5 pour cent à 4,0 pour cent.

DÉNOMBREMENT DES BACTÉRIES VIVANTES

Homogénéisez le contenu d'au moins 5 unités de prise dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L à 4 °C. Utilisez à cet effet un agitateur en chambre froide et suffisamment de billes de verre pour qu'elles émergent de la solution. Immédiatement après l'homogénéisation, diluez la suspension de façon appropriée dans une solution réfrigérée et inoculez le milieu gélosé à l'infusion de coeur-cerveau ; incubez à 36 ± 1 °C pendant 20 h à 36 h. Chaque unité de prise contient au minimum $2 \times 10^9$ *S. typhi* souche Ty 21a vivantes.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- le nombre minimal de bactéries vivantes par unité de prise,
- que le vaccin est pour usage oral seulement.

**01/2011:0648**

# VACCIN VARICELLEUX VIVANT

## Vaccinum varicellae vivum

DÉFINITION

Le vaccin varicelleux vivant est une préparation cryodesséchée obtenue à partir de la souche atténuée appropriée de l'herpèsvirus humain 3. Le vaccin, reconstitué immédiatement avant l'emploi d'après les indications figurant sur l'étiquette, se présente sous forme d'un liquide limpide qui peut être coloré en raison de la présence d'un indicateur de pH.

PRODUCTION

La production du vaccin est basée sur un système de lot de semence viral et un système de banque de cellules. Il aura été démontré que ces systèmes donnent de façon constante des vaccins varicelleux vivants d'un pouvoir immunogène et d'une innocuité adéquats pour l'homme. Le virus dans le vaccin final ne devra pas avoir subi de passage dans des cultures cellulaires, au-delà d'un nombre défini de passages approuvé par l'Autorité compétente, à partir du virus original isolé.

La neurovirulence potentielle de la souche vaccinale est considérée lors du développement préclinique, sur la base des données épidémiologiques disponibles concernant la neurovirulence et le neurotropisme, principalement celles pour le type sauvage du virus. A la lumière de ces considérations, une analyse de risque est effectuée. Si nécessaire, et selon les disponibilités, un essai est effectué sur la souche vaccinale en utilisant un modèle animal qui différencie le type sauvage du virus atténué ; les essais sur les souches d'atténuation intermédiaire peuvent également être requis.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

*SUBSTRAT POUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS*

Le virus est multiplié dans des lignées de cellules diploïdes humaines (*5.2.3*).

Vaccins

*LOT DE SEMENCE*

La souche de l'herpèsvirus humain 3 utilisée sera identifiée comme étant la souche appropriée par des données historiques y compris des informations sur son origine et sa manipulation ultérieure. Le virus ne devra en aucun cas avoir subi un passage dans une lignée continue de cellules. Les lots de semence sont préparés dans le même type de cellules que celles utilisées pour la production du vaccin final. Les lots de semence de virus sont préparés en quantités importantes et conservés à des températures inférieures à – 20 °C s'ils sont cryodesséchés ou inférieures à – 60 °C s'ils ne le sont pas.

Seul un lot de semence qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la multiplication du virus.

**Identification**. Le lot de semence primaire et le lot de semence de travail sont identifiés comme contenant l'herpèsvirus humain 3 par un essai de séroneutralisation en culture cellulaire, à l'aide d'anticorps spécifiques.

**Concentration en virus**. La concentration en virus infectieux dans les lots de semence primaire et de travail est déterminée comme prescrit sous Dosage, afin de s'assurer de la régularité de la production.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Le lot de semence de travail satisfait aux exigences pour les lots de semence des vaccins viraux vivants ; utilisez 50 mL dans l'essai effectué sur cultures cellulaires.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

Toutes les manipulations effectuées sur la banque de cellules et les cultures cellulaires dérivées sont conduites dans des conditions aseptiques dans des locaux où ne sont pas manipulés simultanément d'autres cellules ou d'autres virus. Un sérum animal approuvé (à l'exclusion du sérum humain) peut être utilisé dans la composition des milieux de culture. Il est démontré que le sérum et la trypsine utilisés dans la préparation des suspensions de cellules et des milieux de culture sont exempts d'agents étrangers. Le milieu de culture cellulaire peut contenir un indicateur de pH, tel que le rouge de phénol, et des antibiotiques approuvés à la plus faible concentration efficace. Il est souhaitable d'utiliser un substrat exempt d'antibiotiques pendant la production. 5 pour cent, mais au minimum 50 mL, des cultures cellulaires utilisées pour la production de vaccin sont gardés comme cellules témoins non ensemencées. Les cellules infectées provenant d'une même récolte sont lavées, dégagées de la surface du support et mélangées. La suspension de cellules est lysée par traitement aux ultrasons.

Seule une récolte de virus qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée dans la préparation du vrac final.

**Identification**. La récolte de virus est identifiée comme contenant l'herpèsvirus humain 3 par un essai de séroneutralisation en culture cellulaire, à l'aide d'anticorps spécifiques.

**Concentration en virus**. La concentration en virus dans les récoltes de virus est déterminée comme prescrit sous Dosage afin de s'assurer de la régularité de la production et de déterminer la dilution à utiliser dans la préparation du vrac final.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Utilisez 50 mL dans l'essai effectué sur cultures cellulaires.

**Cellules témoins**. Les cellules témoins de la culture cellulaire de production dont dérive la récolte unique satisfont à un essai d'identification et à l'essai des agents étrangers (*2.6.16*).

*VRAC FINAL*

Les récoltes de virus qui satisfont aux essais prescrits ci-dessus sont mélangées et clarifiées afin d'éliminer les cellules. Un stabilisant approprié peut être ajouté et le mélange de récoltes peut être dilué de façon appropriée.

Seul un vrac final qui satisfait à l'essai ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Contamination bactérienne et fongique**. Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*), effectué en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable et cryodesséché jusqu'à une teneur en eau dont il est démontré qu'elle favorise la stabilité du vaccin. Les récipients sont alors fermés pour éviter la contamination et l'introduction d'humidité.

Seul un lot final qui satisfait à l'essai de l'eau et à chacun des essais décrits ci-après sous Identification, Essai et Dosage peut être libéré. Si l'essai de sérum-albumine bovine a été effectué avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, il peut ne pas être effectué sur le lot final.

**Eau** (*2.5.12*). Déterminée par semi-microdosage, la teneur en eau n'est pas supérieure à la quantité approuvée par l'Autorité compétente et pour laquelle la stabilité du vaccin a été démontrée.

## IDENTIFICATION

Lorsque le vaccin reconstitué d'après les indications figurant sur l'étiquette est mélangé à des anticorps spécifiques de l'herpèsvirus humain 3, il n'infecte plus des cultures cellulaires sensibles.

## ESSAI

**Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin reconstitué satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*).

**Sérum-albumine bovine** : au maximum 0,5 µg par dose humaine, déterminé par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

## DOSAGE

Titrez le virus infectieux du vaccin en utilisant au moins 3 flacons séparés. Titrez en triple 1 flacon de préparation de référence appropriée de virus pour valider chaque titrage. La concentration en virus de la préparation de référence est suivie à l'aide d'une carte de contrôle et un titre est établi par chaque laboratoire à partir des données historiques. Si une préparation de référence du fabricant est utilisée, sa relation avec la Préparation Biologique de Référence appropriée de la Pharmacopée Européenne est établie et contrôlée à intervalles réguliers. Calculez la concentration individuelle en virus pour chaque flacon de vaccin et pour chaque échantillon répliqué de la préparation de référence ainsi que les concentrations en virus combinées correspondantes en utilisant les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple). La concentration combinée estimée en virus pour les 3 flacons de vaccin n'est pas inférieure à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

L'essai n'est pas valable si :

– l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration estimée en virus de la préparation de référence pour les 3 échantillons répliqués combinés est supérieur à ± 0,3 log UFP,

– la concentration en virus de la préparation de référence diffère de plus de 0,5 log UFP par rapport au titre établi.

L'essai est répété si l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration en virus combinée du vaccin est supérieur à ± 0,3 log UFP ; seules les données provenant de titrages valides sont combinées par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple) pour le calcul de la concentration en virus de l'échantillon. L'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration en virus combinée n'est pas supérieur à ± 0,3 log UFP.

Le *vaccin varicelleux vivant PBR* convient comme préparation de référence.

Vaccins

Dans les cas justifiés et autorisés, des titrages de conceptions différentes peuvent être utilisés, ce qui peut impliquer l'application de critères de validité ou d'acceptation différents. Cependant, le vaccin doit être conforme, s'il est contrôlé comme décrit ci-dessus.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– la souche du virus utilisée pour la préparation du vaccin,
– le type et l'origine des cellules utilisées pour la préparation du vaccin,
– la concentration minimale en virus,
– que le contact entre le vaccin et les désinfectants doit être évité.

**04/2008:0537**

# VACCIN VIVANT DE LA FIÈVRE JAUNE

## Vaccinum febris flavae vivum

DÉFINITION

Le vaccin vivant de la fièvre jaune est une préparation cryodesséchée de la souche 17D du virus de la fièvre jaune (virus amaril), cultivée dans l'oeuf de poule embryonné. Le vaccin, reconstitué immédiatement avant l'emploi d'après les indications figurant sur l'étiquette, se présente sous la forme d'un liquide limpide.

PRODUCTION

La production du vaccin est basée sur un système de lot de semence virale dont il a été démontré qu'il donne de façon constante un vaccin vivant de la fièvre jaune de pouvoir immunogène et d'innocuité acceptables pour l'homme.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait, s'il lui était appliqué, à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), modifié comme suit pour l'essai chez le cobaye : injectez 10 doses humaines par cobaye à 2 sites d'injection différents et observez les animaux pendant 21 jours.

*Préparation de référence*. Dans l'essai de neurotropisme, un lot de vaccin reconnu pour avoir des propriétés satisfaisantes chez l'homme est utilisé comme préparation de référence.

*SUBSTRAT POUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS*

Le virus du lot de semence primaire et du lot de semence de travail, ainsi que pour tous les lots de vaccin, est obtenu par culture dans des tissus d'embryons de poulet provenant d'un élevage de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*).

*LOT DE SEMENCE*

La souche 17D est identifiée par des données historiques y compris des informations sur son origine et sa manipulation ultérieure. Les lots de semence de virus sont préparés en grandes quantités et conservés à une température inférieure à – 60 °C. Les lots de semence primaire et de travail ne contiennent aucune protéine humaine, ni sérum ajouté.

Sauf exception justifiée et autorisée, le virus dans le vaccin final est à un niveau de passage entre 204 et 239 à partir de l'isolat d'origine de la souche 17D. Le lot de semence de travail est séparé du lot de semence primaire par un seul passage. Le lot de semence de travail est utilisé sans passage intermédiaire pour inoculer les tissus utilisés dans la production d'un lot de vaccin afin d'assurer que le vaccin ne contienne pas de virus ayant subi plus d'un passage à partir d'un lot de semence qui a satisfait à tous les essais d'innocuité.

Seul un lot de semence qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la multiplication du virus.

**Identification**. L'identité virale des lots de semence primaire et de travail est vérifiée par un essai de séroneutralisation en culture cellulaire, effectué à l'aide d'anticorps spécifiques.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Chaque lot de semence primaire satisfait aux essais suivants :

– essai chez le cobaye (comme décrit dans le chapitre *2.6.16* sous Lot de semence),
– stérilité bactérienne et fongique (comme décrit dans le chapitre *2.6.16* sous Lot de semence et récoltes de virus),
– mycoplasmes (comme décrit dans le chapitre *2.6.16* sous Lot de semence et récoltes de virus).

**Virus de la leucose aviaire** (*2.6.24*). Chaque lot de semence primaire satisfait à l'essai de recherche des virus de la leucose aviaire.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Chaque lot de semence de travail satisfait aux essais suivants :

– essai chez la souris adulte (inoculation intrapéritonéale seulement) (comme décrit dans le chapitre *2.6.16* sous Lot de semence),
– essai chez le cobaye (comme décrit dans le chapitre *2.6.16* sous Lot de semence),
– stérilité bactérienne et fongique (comme décrit dans le chapitre *2.6.16* sous Lot de semence et récoltes de virus),
– mycoplasmes (comme décrit dans le chapitre *2.6.16* sous Lot de semence et récoltes de virus),
– mycobactéries (comme décrit dans le chapitre *2.6.16* sous Lot de semence et récoltes de virus),
– recherche d'autres agents étrangers sur culture cellulaire (comme décrit dans le chapitre *2.6.16* sous Lot de semence et récoltes de virus),
– virus aviaires (comme décrit dans le chapitre *2.6.16* sous Lot de semence et récoltes de virus).

**Virus de la leucose aviaire** (*2.6.24*). Chaque lot de semence de travail satisfait à l'essai de recherche des virus de la leucose aviaire.

**Epreuves sur le singe**. Les lots de semence primaire et de travail satisfont aux épreuves suivantes de virémie (viscérotropisme), de pouvoir immunogène et de neurotropisme chez le singe.

Des singes du genre *Macaca* réceptifs au virus de la fièvre jaune sont utilisés. Il doit être démontré que, au moment de l'injection du virus de semence, ils sont non-immuns contre la fièvre jaune ; ils doivent être en bonne santé et ne doivent pas avoir reçu antérieurement d'inoculation intracérébrale ou intrarachidienne. De plus, ils ne doivent pas avoir reçu, par d'autres voies, d'inoculation de virus neurotropes ou d'antigènes apparentés au virus de la fièvre jaune. Au moins 10 singes seront utilisés pour chaque épreuve.

Utilisez pour l'épreuve une dose de 0,25 mL contenant l'équivalent d'au moins 5000 $DL_{50}$ souris et d'au plus 50 000 $DL_{50}$ souris, déterminé par un titrage en virus infectieux et à l'aide de la relation établie entre la concentration en virus et la $DL_{50}$ souris (voir sous Concentration en virus). Injectez la dose d'épreuve, sous anesthésie, dans un lobe frontal de chaque singe et maintenez les animaux en observation pendant au moins 30 jours.

*Virémie (Viscérotropisme)*. Le viscérotropisme se traduit par la quantité de virus dans le sérum. Prélevez du sang sur chacun des singes d'épreuve, les 2$^{e}$, 4$^{e}$ et 6$^{e}$ jours après l'inoculation et préparez du sérum à partir de chaque échantillon. Préparez des dilutions aux 1/10, 1/100 et 1/1000 et inoculez chaque dilution à un groupe d'au moins 6 récipients de cultures cellulaires utilisées pour la détermination de la concentration en virus. Le lot de semence satisfait à l'essai si la quantité de virus dans 0,03 mL de sérum ne dépasse en aucun cas l'équivalent de 500 $DL_{50}$ souris et si dans un seul cas au plus, elle dépasse 100 $DL_{50}$ souris.

*Pouvoir immunogène*. Prélevez du sang sur chacun des singes 30 jours après l'inoculation de la dose d'épreuve et préparez du sérum à partir de chaque échantillon. Le lot de semence satisfait à l'essai si au moins 90 pour cent des singes de l'épreuve sont

Vaccins

devenus immuns, l'immunité étant déterminée par l'examen de leur sérum au moyen de l'essai de neutralisation du virus de la fièvre jaune décrit ci-après.

Il a été démontré qu'à faible dilution (par exemple, 1/10), certains sérums contiennent des inhibiteurs non spécifiques qui modifient cette épreuve ; si tel est le cas, le sérum sera traité de manière à éliminer ces substances inhibitrices. Des dilutions d'au moins 1/10, 1/40 et 1/160 de sérum de chacun des singes sont mélangées à un volume égal de virus vaccinal 17D à une dilution qui permette d'obtenir un nombre optimal de plages avec la méthode de titrage utilisée. Incubez les mélanges sérum-virus dans un bain-marie à 37 °C pendant 1 h puis refroidissez dans un bain d'eau glacée. Introduisez chaque mélange sérum-virus dans une série de 4 boîtes de cultures cellulaires à raison de 0,2 mL par boîte puis procédez comme pour la détermination de la concentration en virus. En parallèle, inoculez 10 boîtes de la même manière avec la même quantité de virus plus un volume égal d'une dilution à 1/10 de sérum de singe n'ayant pas d'anticorps neutralisant le virus de la fièvre jaune. A la fin de la période d'observation, comparez le nombre moyen de plages dans les boîtes ayant reçu du virus plus du sérum non immun et le nombre moyen de plages dans celles qui ont reçu du virus plus des dilutions du sérum de chaque singe. La proportion de singes de l'épreuve dont le sérum, à la dilution de 1/10, ne réduit pas de 50 pour cent le nombre de plages, ne doit pas dépasser 10 pour cent.

*Neurotropisme.* Le neurotropisme est évalué à partir des signes cliniques d'encéphalite, de l'incidence des manifestations cliniques et des lésions histologiques, par comparaison des singes d'épreuve avec 10 singes auxquels a été injectée la préparation de référence. Le lot de semence n'est acceptable que si rien, dans l'apparition et la durée de la réaction fébrile ou dans les signes cliniques d'encéphalite et les constatations anatomopathologiques, n'indique un changement des propriétés du virus.

Evaluation clinique

Les singes sont examinés quotidiennement pendant 30 jours, par du personnel familiarisé avec les signes cliniques de l'encéphalite chez les primates (les animaux peuvent si nécessaire être sortis de leur cage pour permettre la recherche de signes de faiblesse motrice ou de spasticité). Le lot de semence n'est pas acceptable si l'incidence de signes sévères d'encéphalite (paralysie, incapacité à se tenir debout même avec stimulation) ou la mortalité est plus élevée chez les singes d'épreuve que chez ceux ayant reçu le vaccin de référence. Ces signes, ainsi que d'autres symptômes d'encéphalite tels que la parésie, l'incoordination, la léthargie, les tremblements ou la spasticité, sont évalués selon une échelle numérique. Une note est attribuée chaque jour à chaque singe sur la base de l'échelle numérique suivante :

- niveau 1 : poil hirsute, perte d'appétit,
- niveau 2 : timbre aigu, inactivité, ralentissement des mouvements,
- niveau 3 : grands frissons, tremblements, incoordination, faiblesse des membres,
- niveau 4 : incapacité à se tenir debout, paralysie des membres ou mort (la note 4 est attribuée à tout singe mort depuis le jour de la mort jusqu'au jour 30).

La note clinique attribuée à chaque singe est la moyenne de ses notes journalières. La note clinique attribuée au lot de semence est la moyenne des notes individuelles des singes. Le lot de semence n'est pas acceptable si la moyenne des notes cliniques est significativement plus élevée ($P$ = 0,95) dans le groupe des singes d'épreuve que dans celui des singes ayant reçu la préparation de référence. Il convient en outre, pour décider de l'acceptabilité du lot de semence, d'apprécier spécifiquement le cas des animaux présentant des symptômes inhabituellement sévères.

Evaluation histologique

Des coupes sont réalisées à 5 niveaux de l'encéphale :

- bloc I : corps strié au niveau du chiasma optique,
- bloc II : thalamus au niveau des corps mamillaires,
- bloc III : mésencéphale au niveau des tubercules quadrijumeaux antérieurs,
- bloc IV : protubérance annulaire et cervelet au niveau des olives protubérantielles,
- bloc V : bulbe rachidien et cervelet au milieu des olives bulbaires.

Le renflement lombaire et le renflement cervical de la moelle épinière sont chacun divisés en 6 blocs. Après inclusion de ces blocs dans de la paraffine, des coupes de 15 µm sont préparées et colorées avec de la gallocyanine. Une évaluation des lésions est effectuée sur chaque demi-coupe de la moelle et sur les structures composantes de chaque demi-coupe de l'encéphale, selon l'échelle numérique suivante :

- niveau 1 - minimal : petits infiltrats inflammatoires en foyer, en nombre compris entre 1 et 3 ; dégénérescence ou perte d'un petit nombre de neurones ;
- niveau 2 - moyen : infiltrats inflammatoires en foyer, en nombre égal ou supérieur à 4 ; dégénérescence ou perte de neurones affectant un tiers des cellules au maximum ;
- niveau 3 - sévère : infiltration inflammatoire (diffuse ou en foyer) modérée ; dégénérescence ou perte de neurones affectant deux tiers des cellules au maximum ;
- niveau 4 - massif : réaction inflammatoire variable, mais souvent sévère ; dégénérescence ou perte de neurones affectant plus de 90 pour cent des cellules.

Il a été constaté que l'inoculation intracérébrale du vaccin de la fièvre jaune à des singes entraîne des lésions histologiques dans différentes formations anatomiques du système nerveux central, avec une fréquence et une sévérité variables (I. S. Levenbook *et al.*, *Journal of Biological Standardization*, 1987, 15, 305-313). Il est possible, sur la base de ces 2 indicateurs, de classer les structures anatomiques en aires cibles, aires épargnées et aires discriminantes. Les aires cibles sont celles qui présentent les lésions spécifiques sévères chez la majorité des singes, indépendamment du degré de neurovirulence du lot de semence. Les aires épargnées sont celles qui ne présentent que des lésions spécifiques minimales, et chez une minorité de singes. Les aires discriminantes sont celles où est observée, avec les lots de semence possédant un degré élevé de neurovirulence, une augmentation significative de la fréquence des lésions spécifiques sévères. Le tableau suivant donne la liste des aires discriminantes et des aires cibles chez le macaque cynomolgue et le macaque rhésus.

| Type de singe | Aires discriminantes | Aires cibles |
|---|---|---|
| *Macaca cynomolgus* | Pallidum | Substantia nigra |
| | Putamen | |
| | Noyau thalamique antéro-médian | |
| | Noyau thalamique latéral | |
| *Macaca rhesus* | Noyau caudé | Substantia nigra |
| | Pallidum | Renflement cervical |
| | Putamen | Renflement lombaire |
| | Noyau thalamique antéro-médian | |
| | Noyau thalamique latéral | |
| | Renflement cervical | |
| | Renflement lombaire | |

Les notes attribuées aux aires discriminantes et aux aires cibles servent de base pour l'évaluation finale du lot de semence. Une note est calculée pour chaque singe à partir de la somme des

Vaccins

notes attribuées à chaque aire cible de chaque demi-coupe, divisée par le nombre d'aires examinées. Une note séparée est calculée de la même manière pour les aires discriminantes.

Des notes moyennes sont calculées de 2 façons pour le groupe d'épreuve : (1) en divisant par le nombre de singes la somme des notes obtenues par tous les singes pour les aires discriminantes et (2) en divisant par le nombre de singes la somme des notes obtenues par tous les singes pour les aires cibles et les aires discriminantes. Ces 2 notes moyennes servent de critère pour décider de l'acceptabilité du lot de semence. Celui-ci n'est pas acceptable si l'une des deux notes moyennes est significativement plus élevée ($P$ = 0,95) que celle obtenue pour la préparation de référence.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

La manipulation des oeufs embryonnés est effectuée dans des conditions d'asepsie, dans un endroit où aucun autre agent infectieux ni cellules ne sont manipulés en même temps. Au moins 2 pour cent des oeufs, mais au minimum 20 oeufs et au maximum 80, sont conservés comme oeufs témoins non ensemencés. Après inoculation et incubation à une température contrôlée, seuls les embryons vivants et normaux sont récoltés. Au moment de la récolte, les oeufs témoins non ensemencés sont traités de la même manière que les oeufs ensemencés pour obtenir la pulpe embryonnaire témoin. L'âge de l'embryon au moment de la récolte du virus, calculé à partir de la première introduction dans la couveuse, n'est pas supérieur à 12 jours. Après homogénéisation et clarification par centrifugation, l'extrait de pulpe embryonnaire est soumis aux épreuves décrites ci-après et conservé à une température égale ou inférieure à – 70 °C jusqu'à traitement ultérieur. Les récoltes virales qui satisfont aux essais prescrits peuvent être réunies. Aucune protéine d'origine humaine n'est ajoutée à la suspension virale à aucun stade de la production. Si des stabilisants sont ajoutés, il doit être démontré qu'ils n'ont aucune propriété antigénique ni sensibilisante pour l'homme.

Seule une récolte unique qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée dans la préparation du vrac final.

**Identification**. L'identité virale de la récolte unique est vérifiée par un essai de séroneutralisation en culture cellulaire, effectué à l'aide d'anticorps spécifiques.

**Contamination bactérienne et fongique**. La récolte unique satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*), effectué en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Mycoplasmes** (*2.6.7*). La récolte unique satisfait à l'essai des mycoplasmes, effectué en utilisant 10 mL.

**Mycobactéries** (*2.6.2*). Un échantillon de 5 mL de récolte unique est soumis à l'essai pour détecter la présence de *Mycobacterium spp.* par des méthodes de culture reconnues sensibles pour la détection de ces organismes.

**Pulpe embryonnaire des oeufs témoins**. L'extrait des embryons témoins ne présente aucun signe de la présence éventuelle d'agents étrangers dans les essais décrits ci-après.

*Recherche d'agents étrangers sur cultures cellulaires*. Inoculez un échantillon de 5 mL de pulpe embryonnaire des oeufs témoins à des cultures cellulaires continues de rein simien et de cellules humaines ainsi qu'à des cellules primaires de fibroblastes d'embryons de poulet. Faites incuber les cellules à 36 ± 1 °C et observez-les pendant 14 jours. La pulpe embryonnaire des oeufs témoins satisfait à l'essai s'il n'y a aucun signe de la présence d'agents étrangers. L'essai n'est valable que si au moins 80 pour cent des cultures cellulaires demeurent viables.

*Virus aviaire*. A raison de 0,1 mL d'inoculum par oeuf, inoculez la pulpe embryonnaire des oeufs témoins par voie allantoïdienne à un groupe de 10 oeufs embryonnés EOPS (*5.2.2*), âgés de 9-11 jours ; dans le vitellus à un groupe de 10 oeufs embryonnés EOPS (*5.2.2*), âgés de 5-7 jours. Faites incuber les oeufs pendant 7 jours. Le lot de pulpe embryonnaire des oeufs témoins satisfait à l'essai si les liquides allantoïdiens et vitellins ne présentent aucun signe d'agents hémagglutinants, et si les embryons et les membranes chorio-allantoïdiennes examinés pour déceler toute pathologie macroscopique se révèlent normaux. L'essai n'est valable que si au moins 80 pour cent des oeufs inoculés survivent pendant les 7 jours d'observation.

**Concentration en virus**. Afin de calculer la dilution nécessaire pour préparer le vrac final, chaque récolte unique est titrée comme décrit sous Dosage.

*VRAC FINAL*

Les récoltes uniques qui satisfont aux essais prescrits sont mélangées et clarifiées de nouveau. Une détermination de la teneur en azote protéique est effectuée. Un stabilisant approprié peut être ajouté et le mélange de récoltes dilué de façon appropriée.

Seul un vrac final qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Contamination bactérienne et fongique**. Le vrac final est conforme à l'essai de stérilité (*2.6.1*), effectué en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Teneur en azote protéique** : au maximum 0,25 mg par dose humaine unitaire avant addition éventuelle d'un stabilisant.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable et cryodesséché jusqu'à une teneur en eau dont il est démontré qu'elle favorise la stabilité du vaccin. Les récipients sont alors fermés pour éviter la contamination et l'introduction d'humidité.

Seul un lot final conforme à l'essai suivant de stabilité thermique et à chacun des essais décrits sous Identification, Essai et Dosage peut être libéré. Si l'essai d'ovalbumine a été effectué avec de bons résultats sur le vrac final, il peut ne pas être effectué sur le lot final.

**Stabilité thermique**. Maintenez des échantillons du lot final de vaccin cryodesséché à l'état sec à 37 °C pendant 14 jours. Selon les modalités décrites sous Dosage, déterminez la concentration en virus du vaccin après chauffage et effectuez en parallèle le titrage d'un échantillon de vaccin non chauffé. La différence entre la concentration en virus du vaccin non chauffé et celle du vaccin après chauffage n'est pas supérieure à 1,0 log. La concentration en virus du vaccin après chauffage n'est pas inférieure au nombre d'unités formant plages correspondant à 3,0 log $DL_{50}$ souris par dose humaine.

## IDENTIFICATION

Lorsque le vaccin reconstitué d'après les indications figurant sur l'étiquette est mélangé à un immunosérum spécifique du virus de la fièvre jaune, sa capacité d'infecter des cultures sensibles est significativement réduite.

## ESSAI

**Ovalbumine** : au maximum 5 μg d'ovalbumine par dose humaine unitaire, déterminé par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

**Eau** (*2.5.12*) : au maximum 3,0 pour cent.

**Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin reconstitué satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*).

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 5 UI par dose humaine unitaire.

## DOSAGE

Titrez le virus infectieux en cultures cellulaires en utilisant au moins 3 flacons séparés de vaccin. Titrez en triple le contenu d'un flacon de préparation de référence appropriée de virus pour valider chaque titrage. La concentration en virus de la préparation de référence est suivie à l'aide d'une carte de contrôle et un titre est établi par chaque laboratoire à partir des données historiques. Calculez la concentration individuelle en virus pour chaque flacon de vaccin et pour chaque échantillon répliqué de la préparation de référence ainsi que les concentrations en virus combinées correspondantes

en utilisant les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple). La concentration en virus pour les 3 flacons de vaccin combinés n'est pas inférieure au nombre d'unités formant plages équivalant à 3,0 log $DL_{50}$ souris par dose humaine. La relation entre la $DL_{50}$ souris et les unités formant plages est établie par chaque laboratoire et approuvée par l'Autorité compétente.

L'essai n'est pas valable si :

– l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration estimée en virus de la préparation de référence pour les 3 échantillons répliqués combinés est supérieur à ± 0,3 log UFP ;

– la concentration en virus de la préparation de référence diffère de plus de 0,5 log UFP par rapport à la teneur établie.

L'essai est répété si l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration en virus combinée du vaccin est supérieur à ± 0,3 log UFP ; seules les données provenant de titrages valides sont combinées par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple) pour le calcul de la concentration en virus de l'échantillon. L'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration en virus combinée n'est pas supérieur à ± 0,3 log UFP.

Dans les cas justifiés et autorisés, des titrages de conceptions différentes peuvent être utilisés, ce qui peut impliquer l'application de critères de validité ou d'acceptation différents. Cependant, le vaccin doit être conforme s'il est contrôlé comme décrit ci-dessus.

La technique présentée ci-après, ou toute autre technique appropriée peut être utilisée pour déterminer la $DL_{50}$ souris.

*Méthode proposée pour la détermination de la $DL_{50}$ souris*

*$DL_{50}$ souris* : la $DL_{50}$ souris est la quantité de suspension virale établie statistiquement qui inoculée par voie intracérébrale à des souris de 4-6 semaines appartenant à une souche hautement sensible, est capable de produire une encéphalite spécifique fatale chez 50 pour cent de ces animaux.

A partir du vaccin reconstitué, on prépare une série de dilutions de raison appropriée dans le diluant pour virus de la fièvre jaune (solution d'*albumine bovine R* à 7,5 g/L dans la *solution saline tamponnée phosphate pH 7,4 R* ou bien tout autre diluant démontré également capable de maintenir le pouvoir infectieux du virus).

Des souris appartenant à une souche hautement sensible et âgées de 4-6 semaines reçoivent, sous anesthésie, 0,03 mL des dilutions de vaccin par voie intracérébrale. Des groupes d'au moins 6 souris sont utilisés pour chaque dilution, et la série de dilutions doit couvrir l'intervalle de mortalité de 0-100 pour cent. Les injections aux souris sont effectuées dès que les dilutions ont été préparées. Les souris sont mises en observation pendant 21 jours et toutes les souris mortes sont consignées. Il n'est tenu compte dans les calculs que des survivantes et des mortes dues à des infections typiques de la fièvre jaune. Les souris paralysées le 21$^{e}$ jour de l'observation sont comptées comme survivantes.

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– la souche de virus utilisée pour la préparation du vaccin,

– que le vaccin vivant de la fièvre jaune est préparé sur embryons de poulet,

– la concentration minimale en virus,

– que le contact entre le vaccin et les antiseptiques est à éviter.

**04/2008:0164**

# VACCIN VIVANT DE LA VARIOLE

## Vaccinum variolae vivum

## DÉFINITION

Le vaccin vivant de la variole est une préparation liquide ou cryodesséchée du virus vivant de la vaccine cultivé *in ovo* dans la membrane d'embryons de poulet, dans des cultures cellulaires ou en infectant la peau d'animaux vivants.

La présente monographie s'applique aux vaccins produits à partir de souches d'efficacité confirmée chez l'homme, en particulier celles qui ont été utilisées pour l'éradication de la variole, comme par exemple la souche Lister (parfois appelée souche Lister/Elstree) et la souche du New York City Board of Health (NYCBOH). Elle ne s'applique pas à des souches non réplicatives telles que la souche du virus modifié d'Ankara (MVA).

## PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit être établi que le procédé de production utilisé donne de façon reproductible des vaccins varioliques dont l'innocuité et le pouvoir immunogène chez l'homme sont satisfaisants. Il doit être établi que la souche utilisée produit des lésions cutanées typiques de la vaccine chez l'homme. La production est basée sur un système de lot de semence.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

La préparation internationale de référence du vaccin variolique convient comme préparation de référence pour le titrage en virus.

*SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DES VIRUS*

**Animaux employés pour la production de vaccins d'origine cutanée**. Si le vaccin est préparé sur la peau d'animaux, on utilise des animaux appartenant à une espèce approuvée par l'Autorité compétente, en bonne santé, maintenus en colonies fermées ou sous surveillance intensive, et n'ayant jamais servi à aucune expérience. Seuls des animaux sensibles à des infections du virus de la vaccine par inoculation dermique sont utilisés pour la production du vaccin.

Les animaux sont logés dans des cages aussi espacées que possible, dans une animalerie bien construite et suffisamment aérée. Les précautions nécessaires sont prises pour éviter toute infection croisée d'une cage à l'autre. Pas plus de 1 animal de grande taille n'est installé par stalle. Pas plus de 2 animaux de petite taille ne sont installés par cage et tout échange d'animaux entre les cages doit être évité. Avant d'être utilisés, les animaux sont maintenus par groupes en quarantaine dans le pays de production du vaccin pendant une période d'au moins 6 semaines.

Si, à un moment quelconque de la période de quarantaine, le taux global de mortalité du groupe atteint 5 pour cent, aucun des animaux du groupe ne sera utilisé pour la production du vaccin.

Même après la fin de la quarantaine, les groupes sont isolés en permanence dans les mêmes conditions jusqu'au moment de l'utilisation des animaux. Lorsque le dernier animal d'un groupe a été utilisé, le local ayant servi à loger ce groupe est soigneusement nettoyé et décontaminé avant d'accueillir un nouveau groupe.

Les animaux destinés à recevoir l'inoculum sont anesthésiés et examinés minutieusement. Tout animal présentant une lésion pathologique n'est pas utilisé pour la préparation d'un lot de semence ou d'un vaccin, pas plus que ne le sont les autres

Vaccins

animaux du groupe en quarantaine concerné, à moins qu'il ne soit évident que leur emploi ne compromettra pas l'innocuité du produit.

Les mesures prophylactiques et diagnostiques adoptées pour exclure la présence de maladies infectieuses doivent être approuvées par l'Autorité compétente. Ces mesures peuvent varier en fonction de l'espèce des animaux utilisés et des maladies auxquelles ces animaux risquent d'être exposés dans le pays de production du vaccin. Le risque de propagation de maladies aux pays vers lesquels le vaccin est susceptible d'être expédié doit aussi être pris en considération. Des maladies comme la fièvre aphteuse, la brucellose, la fièvre Q, la tuberculose ou la dermatomycose doivent toujours faire l'objet d'une attention particulière, mais il peut être nécessaire de considérer des maladies comme l'ecthyma contagieux (orf), la fièvre charbonneuse, la peste bovine, la septicémie hémorragique, la fièvre de la vallée du Rift ou autres.

**Oeufs embryonnés**. Les oeufs embryonnés utilisés pour la production sont obtenus à partir d'un élevage exempt de microorganismes pathogènes spécifiés (*5.2.2*).

**Cellules diploïdes humaines, lignées cellulaires continues**. Les cellules diploïdes humaines et les lignées cellulaires continues satisfont aux exigences relatives aux substrats cellulaires (*5.2.3*).

**Cellules primaires d'embryons de poulet**. Les cellules primaires d'embryons de poulet sont issues d'un élevage exempt de microorganismes pathogènes spécifiés (*5.2.2*).

**Cellules rénales primaires de lapin**. Seuls des lapins sains issus d'un élevage fermé et approuvé par l'Autorité compétente sont utilisés comme source. Les animaux, de préférence âgés de 2-4 semaines, sont contrôlés pour garantir l'absence de microorganismes pathogènes spécifiés ou des anticorps correspondants.

Si de nouveaux animaux sont introduits dans l'élevage, ils sont maintenus en quarantaine pendant au moins 2 mois et il est vérifié qu'ils sont exempts de microorganismes pathogènes spécifiés. Les animaux destinés à fournir des reins n'ont jamais servi à aucune expérience, notamment celles impliquant l'utilisation d'agents infectieux. Une recherche de virus de zoonoses et des marqueurs de contamination est effectuée à intervalles réguliers sur l'élevage.

Au moment de l'établissement de l'élevage, tous les animaux sont contrôlés afin de déterminer l'absence d'anticorps dirigés contre de possibles contaminants viraux connus pour leur capacité à infecter les humains ou leur capacité à se répliquer *in vitro* dans des cellules d'origine humaine. Un essai de recherche de rétrovirus par une méthode sensible de transcription inverse puis réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) est également effectué. Des essais de recherche de rétrovirus par les techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) peuvent également être utilisés.

Une fois l'élevage établi, il est contrôlé en effectuant des essais sur un groupe représentatif d'au moins 5 pour cent des animaux, qui sont saignés à intervalles appropriés (par exemple, tous les mois). De plus, l'élevage est contrôlé pour déceler la présence de microorganismes pathogènes, comme les mycobactéries, les levures et moisissures et les mycoplasmes. Le programme de contrôle est établi de façon à garantir que tous les animaux seront vérifiés sur une période donnée.

Tout animal qui meurt est examiné pour déterminer la cause de la mort. Si la présence d'un agent infectieux responsable de la mort est établie au sein de l'élevage, la production du vaccin de la variole est interrompue.

Au moment du prélèvement des reins, les animaux sont examinés afin de déceler la présence d'anomalies et, en cas de résultat positif, les animaux ne sont pas utilisés pour la production du vaccin.

Chacune des cultures de contrôle issues d'un même groupe d'animaux utilisés pour produire une récolte unique de virus doit demeurer identifiable comme telle jusqu'à la fin de tous les essais, notamment les essais des agents étrangers.

Vaccins

*LOT DE SEMENCE*

L'identité de l'isolat de virus de la vaccine utilisée pour le lot de semence primaire est attestée par des documents indiquant notamment son origine et les essais de caractérisation utilisés. Les virus provenant du lot de semence de travail doivent présenter les mêmes caractéristiques que la souche utilisée pour préparer le lot de semence primaire. Le nombre de passages exigés pour produire des récoltes uniques à partir de l'isolat d'origine doit être limité et approuvé par l'Autorité compétente. Le vaccin doit être produit à partir du lot de semence de travail, avec un minimum de passages intermédiaires.

La production de cultures cellulaires et la sélection clonale (par exemple purification sur plaque) pouvant entraîner une altération des caractéristiques du virus, le virus de la semence primaire doit être caractérisé aussi complètement que possible en comparant, par exemple, le profil d'innocuité et les caractéristiques biologiques de la souche avec ceux de l'isolat parental. La caractérisation doit comprendre les étapes suivantes :

– des analyses antigéniques à l'aide d'immunosérums et/ou d'anticorps monoclonaux ;
– des études biologiques comme la détermination du titre infectieux, le dosage sur membrane chorio-allantoïdienne (dosage CAM), le rendement *in vitro* et les caractéristiques de la croissance *in vivo* sur un modèle animal approprié ;
– des analyses génétiques comme la cartographie de restriction/le transfert d'ADN (technique de Southern), des analyses par PCR et des études de séquençage limité ;
– la stabilité phénotypique et génétique lors du passage dans le substrat ;
– des essais de neurovirulence et des études de pouvoir immunogène.

Les essais de caractérisation sont également effectués sur chaque lot de semence de travail et sur 3 lots de vaccin issus du premier lot de semence de travail pour vérifier la stabilité génétique de la souche vaccinale.

Seule une semence virale qui satisfait aux exigences suivantes peut être utilisée pour la multiplication du virus.

**Identification**. Chaque semence de travail est identifiée comme semence du virus de la vaccine à l'aide d'anticorps spécifiques et d'essais moléculaires. Des essais appropriés sont effectués pour exclure la présence du virus de la variole et d'autres orthopoxvirus.

**Concentration en virus**. Déterminé par dosage CAM ou par un titrage *in vitro* validé approprié (titrage par la méthode des plages ou titrage de la $DICC_{50}$). La concentration en virus constitue la base à partir de laquelle est fixée la quantité de virus utilisée dans l'essai de neurovirulence.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Si le lot de semence de travail est produit sur des oeufs embryonnés, des cellules diploïdes humaines ou une lignée cellulaire continue, il satisfait aux exigences relatives aux lots de semence pour vaccins viraux. De plus, les lots de semence produits sur des oeufs embryonnés et les lots de semence produits sur des cultures de cellules primaires satisfont aux exigences mentionnées ci-après.

Si les essais prescrits ne peuvent être effectués parce que la neutralisation complète du virus de semence n'est pas possible, le lot de semence peut être dilué selon un facteur de dilution identique à celui utilisé dans les inoculums pour la production du vaccin avant de rechercher les virus étrangers. Des essais spécifiques supplémentaires pour la recherche de virus étrangers utilisant des techniques validées d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) ou des méthodes immunochimiques (*2.7.1*) peuvent être envisagés. Si la méthode par épifluorescence en culture cellulaire pour la détection des mycoplasmes (*2.6.7*) ne peut pas être effectuée, elle est remplacée par un essai d'amplification des acides nucléiques.

De plus, les lots de semence destinés à une production sur oeufs embryonnés ou en culture cellulaire doivent être contrôlés afin de rechercher tout transfert d'agents étrangers potentiels

à partir de la semence originale. Etant donné qu'il est peu probable que le détail complet de tous les passages subis par la semence originale soit connu et qu'il est possible que plusieurs espèces aient été utilisées, ces essais supplémentaires doivent au moins couvrir les agents étrangers posant problème.

La biocharge des lots de semence primaire et de travail préparés sur la peau d'animaux doit être limitée par des contrôles méticuleux des installations, du personnel, des animaux utilisés pour la production et par des essais spécifiques sur les semences. Cependant, il peut être difficile de garantir que les lots de semence préparés sur peau d'animaux soient totalement exempts d'agents étrangers et il faudra envisager des procédures de production permettant de les éliminer ou de les réduire. De tels lots doivent satisfaire aux exigences indiquées ci-après. L'absence d'agents pathogènes humains spécifiques doit être confirmée par des procédures d'essais supplémentaires, comme par exemple des cultures bactériennes ou fongiques, une culture virale, des essais des agents viraux par amplification des acides nucléiques (*2.6.21*).

**Neurovirulence**. La neurovirulence des lots de semence primaire et de travail est évaluée en utilisant un modèle animal approprié, sur singes ou sur souris, par exemple. L'isolat parent est utilisé comme semence de comparaison. Si l'isolat d'origine n'est pas disponible à cet effet, des matières équivalentes peuvent être utilisées.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

**VACCIN PRODUIT SUR ANIMAUX VIVANTS**

Avant inoculation, les animaux doivent être nettoyés et maintenus par la suite dans des stalles parfaitement propres jusqu'au prélèvement de la vaccine. Pendant 5 jours avant l'inoculation et pendant l'incubation, les animaux doivent être maintenus sous surveillance vétérinaire, ils doivent ne présenter aucun signe de maladie et leur température rectale est enregistrée quotidiennement. En cas de hausse anormale de la température ou si un quelconque signe clinique de maladie est observé, la production du vaccin à partir du groupe d'animaux concerné doit être suspendue jusqu'à détermination de la cause.

L'inoculation du virus de semence se fait sur des parties de l'animal qui ne risquent pas d'être souillées par l'urine ou les excréments. La surface utilisée pour l'inoculation doit être rasée et nettoyée de façon à obtenir des conditions aussi proches que possible de l'asepsie chirurgicale. Si une substance antiseptique nuisible au virus est utilisée lors du nettoyage, elle doit être éliminée par un rinçage minutieux à l'eau stérile avant l'inoculation. Pendant l'inoculation, la surface exposée de l'animal non utilisée pour l'inoculation doit être recouverte d'une couverture stérile. L'expérience montre que la surface ventrale des animaux femelles est appropriée pour l'inoculation et qu'il est plus approprié de procéder à l'inoculation sur les flancs des animaux mâles.

Avant de prélever la vaccine, tout antibiotique doit être éliminé et la zone inoculée doit être nettoyée. Les surfaces non inoculées doivent être recouvertes d'une couverture stérile. Avant la récolte, les animaux doivent être euthanasiés et exsanguinés pour éviter les mélanges importants de vaccine avec le sang. La vaccine de chaque animal doit être prélevée séparément en prenant toutes les précautions d'asepsie. Tous les animaux utilisés pour la production du vaccin doivent faire l'objet d'une autopsie. Si une maladie systémique ou généralisée autre que la variole est mise en évidence, la vaccine provenant de cet animal doit être détruite. Si la maladie est considérée comme transmissible, la récolte issue de l'ensemble du groupe d'animaux exposés doit être détruite, sauf exception justifiée et autorisée.

**VACCIN PRODUIT SUR OEUFS**

Toute manipulation d'oeufs embryonnés se fait dans des conditions d'asepsie dans une zone où ne sont pas manipulés d'autres agents infectieux ou cellules au même moment. Après inoculation et incubation à une température contrôlée, seuls sont recueillis les embryons de poulet vivants et appropriés. L'âge des embryons au moment de la récolte du virus est calculé à partir de l'introduction initiale de l'oeuf dans l'incubateur et ne doit pas dépasser 12 jours. Après homogénéisation et clarification par centrifugation, l'extrait de pulpe embryonnaire est contrôlé selon les spécifications ci-après et maintenu à une température inférieure ou égale à − 70 °C jusqu'à la prochaine manipulation. Les récoltes virales qui satisfont aux essais prescrits peuvent être réunies. A aucun stade de la production n'est ajoutée de protéine humaine à la suspension virale. Si des stabilisants sont ajoutés, il doit être démontré qu'ils n'ont aucune propriété antigénique ni sensibilisante pour l'homme.

Seule une récolte unique qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée dans la préparation du vrac final.

**Oeufs témoins**. Les oeufs témoins satisfont aux essais des agents étrangers (*2.6.16*). Un échantillon de 2 pour cent des oeufs embryonnés non inoculés (au moins 20 et pas plus de 50) de chacun des lots utilisés pour la production du vaccin est incubé sous les mêmes conditions que les oeufs inoculés. Au moment de la récolte virale, les oeufs non inoculés subissent le même traitement que les oeufs inoculés.

**Stérilité** (*2.6.1*). La récolte virale satisfait à l'essai de stérilité. Utilisez 10 mL pour chaque milieu.

**VACCIN PRODUIT SUR CULTURES CELLULAIRES (CELLULES PRIMAIRES D'EMBRYONS DE POULET, CELLULES RÉNALES PRIMAIRES DE LAPIN, CELLULES DIPLOÏDES HUMAINES OU LIGNÉES CELLULAIRES CONTINUES)**

Toutes les manipulations effectuées sur la banque de cellules et les cultures cellulaires dérivées sont conduites dans des conditions d'asepsie, dans un local où d'autres cellules ne sont pas manipulées en même temps pendant la production. Un sérum animal approprié (à l'exclusion du sérum humain) peut être utilisé dans la composition des milieux de culture cellulaire, mais le milieu final utilisé pour maintenir la croissance cellulaire pendant la multiplication virale ne doit pas contenir de sérum animal. Il est démontré que le sérum et la trypsine utilisés dans la préparation des suspensions cellulaires et des milieux de culture sont exemps d'agents étrangers. Le milieu de culture cellulaire peut contenir un indicateur de pH tel que le rouge de phénol, et des antibiotiques appropriés à la plus faible concentration efficace. Il est souhaitable d'utiliser un substrat exempt d'antibiotiques pendant la production. Le jour de l'inoculation avec le lot de semence de travail de virus, conservez 5 pour cent au moins ou 1000 mL, en choisissant la valeur la plus petite, des cultures cellulaires utilisées pour la production du vaccin, comme cultures cellulaires non infectées (cellules témoins) ; des exigences particulières données ci-après s'appliquent aux cellules témoins si le vaccin est produit sur des cellules rénales primaires de lapin.

Après que les cellules productrices ont été mises en contact avec le lot de semence de travail du virus, les cultures cellulaires infectées sont maintenues à une température déterminée et la récolte du virus est effectuée après une période d'incubation appropriée.

Seule une récolte unique satisfaisant aux exigences ci-après peut être utilisée pour la préparation du mélange monovalent de récoltes.

**Cellules témoins**. Les cellules témoins de la culture cellulaire de production dont est issue la récolte virale satisfont à un essai d'identification et aux exigences des agents étrangers (*2.6.16*), ou, si des cellules rénales primaires de lapins sont utilisées, aux essais spécifiques prescrits ci-après. L'essai n'est valable que si la proportion de cultures de cellules témoins rejetées avant la fin de la période d'observation ne dépasse pas 20 pour cent.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). La récolte unique satisfait aux essais des agents étrangers. Il peut être difficile de parvenir à la neutralisation complète du virus de la vaccine si la concentration en virus est élevée. Dans ce cas, des essais spécifiques comme des essais par amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) ou des essais immunochimiques (*2.7.1*) peuvent se substituer aux essais non spécifiques sur culture cellulaire ou sur oeufs. Par souci d'économie de réactifs biologiques comme les

Vaccins

immunosérums neutralisant la vaccine, les essais des agents étrangers peuvent être effectués sur le vrac final plutôt que sur les récoltes uniques.

*Vaccin préparé sur cellules primaires d'embryon de poulet.* La présence d'adénovirus et de rétrovirus aviaires tels que le virus de la leucose aviaire est recherchée dans un échantillon d'un mélange de liquides provenant des cultures témoins. De plus, un volume équivalent à 100 doses humaines de vaccin ou 10 mL, en choisissant la quantité la plus importante, prélevé dans chaque mélange de virus neutralisé est soumis à un essai sur un groupe d'oeufs embryonnés par voie d'inoculation allantoïdienne et un échantillon semblable est soumis à un essai sur un groupe d'oeufs distinct par voie d'inoculation vitelline. Dans les deux cas, utilisez 0,5 mL d'inoculum par oeuf. Le mélange de virus satisfait à l'essai si aucun signe de la présence d'un quelconque agent étranger n'est décelé après 3-7 jours.

*Vaccin préparé sur cultures de cellules rénales primaires de lapin.* Les exigences particulières suivantes s'appliquent à la multiplication, à la récolte et au contrôle du virus. Le jour de l'inoculation du virus du lot de semence de travail, un échantillon d'au moins 30 mL du mélange des liquides est prélevé sur les cultures cellulaires des reins de chaque groupe d'animaux utilisés pour préparer la suspension de cellules primaires. Le mélange de liquides est introduit dans ces cultures cellulaires de façon que la dilution du mélange ne dépasse pas 1:4. Les cultures sont mises en incubation à 34-36 °C et gardées en observation pendant au moins 4 semaines. Au cours de cette période, et après au minimum 2 semaines d'incubation, au moins 1 repiquage du liquide provenant de chacune de ces cultures est effectué. Ces subcultures sont également gardées en observation pendant 2 semaines. L'essai n'est valable que si la proportion de cultures rejetées ne dépasse pas 20 pour cent. Si la présence d'un agent étranger est décelée, l'ensemble des cultures cellulaires n'est pas utilisé pour la production de vaccin.

– *Cultures cellulaires témoins.* Des cultures préparées le jour de l'inoculation du virus du lot de semence de travail à partir de 25 pour cent des suspensions cellulaires provenant des reins de chaque groupe d'animaux sont conservées comme témoins. Ces cultures cellulaires témoins sont incubées dans les mêmes conditions que les cultures ensemencées pendant au moins 2 semaines. L'essai n'est valable que si la proportion de cultures cellulaires témoins rejetées pour des raisons non spécifiques n'excède pas 20 pour cent.

– *Recherche de virus hémadsorbants.* Au moment de la récolte, ou au plus tard 4 jours après l'ensemencement des cultures de production avec le virus du lot de semence de travail, un échantillon de 4 pour cent des cultures cellulaires témoins est examiné pour déceler la présence de virus hémadsorbants par addition d'érythrocytes de cobaye.

– *Recherche d'autres agents étrangers.* Au moment de la récolte, ou au plus tard 7 jours après l'ensemencement des cultures de production avec le virus du lot de semence de travail, un échantillon d'au moins 20 mL du mélange de liquides de chaque groupe de cultures témoins est examiné pour déceler la présence d'autres agents étrangers.

– *Essais effectués sur les récoltes uniques neutralisées provenant de cultures de cellules rénales primaires de lapin.* Des essais supplémentaires sur des cultures de cellules primaires préparées à partir d'un groupe d'animaux différents de ceux utilisés pour la production sont effectués pour chaque récolte unique neutralisée.

*MÉLANGE DE RÉCOLTES*

Seul un mélange de récoltes qui satisfait aux exigences ci-après et se situe dans les limites approuvées pour le produit peut être utilisé pour la préparation du lot final.

**Identité**. Le virus de la vaccine présent dans le mélange de récoltes est identifié par des méthodes sérologiques qui peuvent être complétées par des méthodes moléculaires. Il peut être utile d'effectuer des essais moléculaires tels que le polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou le séquençage partiel, notamment des séquences terminales d'ADN qui présentent la plus grande variation entre les souches de virus de la vaccine.

**Concentration en virus**. La concentration en virus de la vaccine du mélange de récoltes est déterminée par un essai sur membrane chorio-allantoïdienne d'oeuf de poulet (dosage CAM) ou sur cultures cellulaires. Une préparation de référence est parallèlement dosée dans le même système pour valider le titrage du mélange de récoltes. La concentration en virus constitue la base à partir de laquelle est fixée la quantité de virus utilisée dans l'essai de neurovirulence sur souris.

**Régularité des caractéristiques virales**. Des essais capables de déterminer que les caractéristiques phénotypiques et génétiques du virus de la vaccine présent dans le mélange de récoltes ou dans le vrac final sont utilisés afin de garantir que le virus vaccinal n'a pas subi de modification lors de sa multiplication dans le système des cultures de production. La semence primaire ou une préparation équivalente doit être utilisée comme comparatif dans ces essais, et le comparateur et les essais utilisés doivent être approuvés par l'Autorité compétente.

**Neurovirulence**. La neurovirulence du mélange de récoltes est évaluée par rapport à une semence originale de comparaison (ou un équivalent) par inoculation par voie intracérébrale à des souriceaux. Il peut être utile d'effectuer d'autres essais pour distinguer les lots acceptables de ceux qui ne le sont pas.

**ADN résiduel**. Si les virus sont cultivés sur des lignées cellulaires continues, le mélange de récoltes doit être examiné pour déceler la présence d'ADN résiduel. Il doit être établi que le procédé de production présente un niveau d'ADN cellulaire inférieur à 10 ng par dose humaine.

**Contamination bactérienne et fongique**. A l'exception des vaccins préparés sur peaux d'animaux, le vrac final satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*), effectué en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

**Mycoplasmes** (*2.6.7*). A l'exception des vaccins préparés sur peaux d'animaux, le vrac final satisfait à l'essai des mycoplasmes, effectué en utilisant 10 mL.

*VRAC FINAL*

Une concentration minimale en virus pour la libération du produit est établie de manière à garantir que, au vu des données de stabilité, la concentration minimale spécifiée sur l'étiquette sera présente à la fin de la période de validité.

VACCIN PRODUIT SUR ANIMAUX VIVANTS

Le mélange de récoltes est centrifugé. Si le vaccin est destiné à une présentation sous forme liquide, le traitement visant à réduire la présence d'agents étrangers peut consister à ajouter du glycérol ou un autre diluant approprié, avec ou sans substance antimicrobienne, et à le conserver temporairement à une température appropriée. Si le vaccin est destiné à une présentation sous forme desséchée, le traitement peut consister à ajouter une substance antimicrobienne appropriée. Les exigences spéciales ci-après s'appliquent au vaccin en vrac et concernent les vaccins produits sur animaux vivants.

Seul un vrac final qui satisfait aux exigences suivantes peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Dénombrement bactérien total** : uniquement pour les vaccins d'origine cutanée, au maximum 50 par millilitre, déterminé par dénombrement sur plaques en utilisant un volume approprié du vrac final.

***Escherichia coli***. Des échantillons d'au moins 1 mL d'une dilution au 1/100 du vrac final sont cultivés sur des plaques d'un milieu approprié permettant de différencier *E. coli* des autres bactéries. Les plaques sont placées en incubation à 35-37 °C pendant 48 h. Si la présence d'*E. coli* est décelée, le vrac final est rejeté ou subit un traitement supplémentaire, sous réserve de l'approbation de l'Autorité compétente.

**Streptocoques hémolytiques, staphylocoques à coagulase positive ou tout autre microorganisme pathogène connu pour être nuisible à l'homme par vaccination**. Des échantillons d'au

moins 1 mL d'une dilution au 1/100 du vrac final sont cultivés sur une gélose au sang. Les plaques sont placées en incubation à 35-37 °C pendant 48 h. Si la présence de microorganismes est décelée, le vrac final est rejeté.

***Bacillus anthracis***. Toute colonie observée sur l'une des plaques et morphologiquement semblable au *B. anthracis* est examinée. En cas d'absence de motilité des organismes présents dans la colonie, des essais supplémentaires sont effectués pour confirmer le caractère d'une culture de *B. anthracis*, y compris des essais du pouvoir pathogène chez des animaux appropriés. Si la présence de *B. anthracis* est avérée, le vrac final et tout autre vrac associé sont rejetés. Des essais moléculaires validés supplémentaires peuvent être effectués.

***Clostridium tetani* et autres bactéries anaérobies sporulées pathogènes** . Un volume total d'au moins 10 mL du vrac final est réparti en quantités égales dans 10 tubes contenant chacun au moins 10 mL d'un milieu approprié pour la culture de microorganismes anaérobies. Les tubes sont placés à 65 °C pendant 1 h afin de réduire la teneur en organismes non sporulés, puis ils sont incubés à 35-37 °C sous des conditions permettant d'entretenir l'anaérobiose pendant au moins 1 semaine. Un repiquage du liquide provenant de chaque tube ou plaque présentant des signes de croissance est effectué sur des plaques recouvertes d'un milieu approprié. Les tubes et subcultures en plaques sont incubés à la même température, sous des conditions permettant d'entretenir l'anaérobiose. Toutes les colonies d'organismes anaérobies sont examinées et identifiées, et si la présence de *C. tetani* ou d'autres bactéries anaérobies sporulées pathogènes est avérée le vrac final est rejeté.

**VACCIN PRODUIT SUR OEUFS**

Le mélange de récoltes est clarifié et peut être purifié.

**VACCIN PRODUIT SUR CULTURES CELLULAIRES (FIBROBLASTES PRIMAIRES D'EMBRYONS DE POULET, CELLULES DIPLOÏDES HUMAINES OU LIGNÉES CELLULAIRES CONTINUES)**

Le mélange de récoltes est clarifié pour éliminer les cellules et peut être purifié.

*LOT FINAL*

Seul un lot final qui est conforme à la spécification de la concentration minimale en virus pour la libération des lots, à l'essai ci-après de stabilité thermique et à chacun des essais décrits ci-après sous Identification, Essai et Dosage peut être libéré. Si les essais des conservateurs antimicrobiens, de teneur en protéine, de sérum-albumine bovine et de l'ovalbumine ont été effectués avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

**Stabilité thermique**. Des récipients représentatifs finals du vaccin sont incubés à une température élevée pour une durée définie.

En ce qui concerne les produits liquides, les conditions de l'essai et les exigences sont approuvées par l'Autorité compétente.

En ce qui concerne les vaccins cryodesséchés, maintenez au minimum 3 flacons du lot final à l'état sec à 37 ± 1 °C pendant 28 jours. La teneur totale en virus dans les 3 flacons traités est déterminée selon les modalités décrites sous Dosage en parallèle à celle de 3 flacons maintenus à la température de conservation recommandée. Une préparation de référence appropriée est également incluse afin de valider chaque dosage. Le vaccin satisfait à l'essai si la perte en titre après exposition à une température élevée n'est pas supérieure à 1,0 log unités infectieuses par dose humaine et si la concentration en virus après exposition à une température élevée n'est pas inférieure à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

## IDENTIFICATION

Le virus de la vaccine est identifié par une méthode appropriée.

## ESSAI

**Conservateur antimicrobien**. Dans les cas appropriés, déterminez la quantité de conservateur antimicrobien par une méthode chimique appropriée. La teneur n'est pas inférieure à la valeur efficace minimale ni supérieure à 115 pour cent de la quantité indiquée sur l'étiquette.

**Phénol** (*2.5.15*) : au maximum 0,5 pour cent, si du phénol est utilisé.

**Teneur en protéine**. La teneur en protéine de chaque lot de répartition est déterminée si elle ne l'a pas été sur le vrac final, et se situe dans les limites approuvées par l'Autorité compétente.

**Sérum-albumine bovine** : au maximum 50 ng par dose humaine unitaire, déterminé par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), si de la sérum-albumine bovine est utilisée pour la culture cellulaire.

**Ovalbumine**. Pour les vaccins produits sur oeufs embryonnés, la teneur en ovalbumine se situe dans les limites approuvées par l'Autorité compétente.

**Humidité résiduelle**. La teneur en humidité résiduelle de chaque lot final de vaccins cryodesséchés se situe dans les limites approuvées par l'Autorité compétente.

**Dénombrement bactérien**. Dans le cas de vaccins d'origine cutanée, examinez le vaccin par des méthodes microscopiques et de culture appropriées pour les microorganismes pathogènes chez l'homme et, en particulier, les streptocoques hémolytiques, les staphylocoques, les organismes sporulés pathogènes, notamment *B. anthracis*, et *E. coli*. Le vaccin est exempt de ces contaminants. Le nombre total de bactéries non pathogènes ne dépasse pas 50 par millilitre.

**Stérilité** (*2.6.1*). A l'exception des vaccins d'origine cutanée, le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*). Le vaccin satisfait à la spécification approuvée par l'Autorité compétente.

## DOSAGE

Reconstituez le vaccin si nécessaire et déterminez le titre en virus infectieux en utilisant au moins 3 flacons séparés de vaccin. Titrez en triple le contenu d'un flacon de préparation de référence appropriée de virus pour valider chaque titrage. La concentration en virus de la préparation de référence est suivie à l'aide d'une carte de contrôle et un titre est établi par chaque laboratoire à partir des données historiques. Calculez la concentration individuelle en virus pour chaque flacon de vaccin et pour chaque échantillon répliqué de la préparation de référence ainsi que les concentrations en virus combinées correspondantes en utilisant les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple). La concentration en virus pour les 3 flacons de vaccins combinés n'est pas inférieure à 8,0 log unités formant foyer par millilitre ou l'équivalent validé en unités formant plage ou en doses infectieuses en culture cellulaire 50 pour cent, sauf si un titre plus faible est justifié par des études cliniques.

L'essai n'est pas valable si :

- l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration estimée en virus de la préparation de référence pour les 3 échantillons répliqués est supérieur à ± 0,5 log unités infectieuses ;
- la concentration en virus de la préparation de référence diffère de plus de 0,5 log unités infectieuses par rapport à la teneur établie.

L'essai est répété si l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration en virus combinée du vaccin est supérieur à ± 0,5 log unités infectieuses ; seules les données provenant de titrages valides sont combinées par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple) pour le calcul de la concentration en virus de l'échantillon. L'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration en virus combinée n'est pas supérieure à ± 0,5 log unités infectieuses.

Vaccins

Dans les cas justifiés et autorisés, des titrages de conceptions différentes peuvent être utilisés, ce qui peut impliquer l'application de critères de validité ou d'acceptation différents. Cependant, le vaccin doit être conforme s'il est contrôlé comme décrit ci-dessus.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– la désignation de la souche du virus de la vaccine,
– la quantité minimale de virus par millilitre,
– le substrat utilisé pour la préparation du vaccin,
– la nature et la quantité de stabilisant, de conservateur ou d'additif présents dans le vaccin et/ou dans le diluant.

**04/2008:0538**

# VACCIN VIVANT DES OREILLONS

## Vaccinum parotitidis vivum

DÉFINITION

Le vaccin vivant des oreillons est une préparation cryodesséchée obtenue à partir d'une souche atténuée appropriée du virus des oreillons. Le vaccin, reconstitué immédiatement avant l'emploi d'après les indications figurant sur l'étiquette, se présente sous forme d'un liquide limpide qui peut être coloré en raison de la présence d'un indicateur de pH.

PRODUCTION

La production du vaccin est basée sur un système de lot de semence virale et, dans le cas où il est préparé sur cellules diploïdes humaines, sur un système de banque de cellules. Il aura été démontré que ces systèmes donnent de façon constante des vaccins des oreillons vivants d'un pouvoir immunogène et d'une innocuité adéquats pour l'homme. Sauf exception justifiée et autorisée, le virus dans le vaccin final n'aura pas subi plus de passages depuis le lot de semence primaire que le vaccin qui a satisfait aux essais cliniques d'innocuité et d'efficacité.

La neurovirulence potentielle de la souche vaccinale est considérée lors du développement préclinique, sur la base des données épidémiologiques disponibles concernant la neurovirulence et le neurotropisme, principalement celles pour le type sauvage du virus. A la lumière de ces considérations, une analyse de risque est effectuée. Si nécessaire, et selon les disponibilités, un essai est effectué sur la souche vaccinale en utilisant un modèle animal qui différencie le type sauvage du virus atténué ; les essais sur les souches d'atténuation intermédiaire peuvent également être requis.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

*SUBSTRAT POUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS*

Le virus est multiplié dans des cellules diploïdes humaines (*5.2.3*) ou dans des cellules d'embryons de poulet ou dans la cavité amniotique d'embryons de poulet, provenant dans les deux cas d'un élevage exempt de microorganismes pathogènes spécifiés (*5.2.2*).

*LOT DE SEMENCE*

La souche de virus des oreillons utilisée sera identifiée par des données historiques y compris des informations sur son origine et sa manipulation ultérieure. Les lots de semence virale sont préparés en quantités importantes et conservés à des températures inférieures à – 20 °C s'ils sont cryodesséchés ou inférieures à – 60 °C s'ils ne le sont pas.

Seul un lot de semence qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la multiplication du virus.

**Identification**. L'identité virale des lots de semence primaire et de travail est vérifiée par un essai de séroneutralisation en culture cellulaire, effectué à l'aide d'anticorps spécifiques.

**Concentration en virus**. La concentration en virus dans les lots de semence primaire et de travail est déterminée afin de s'assurer de la régularité de la production.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Le lot de semence de travail satisfait aux exigences pour les lots de semence.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

Toutes les manipulations effectuées sur la banque de cellules et les cultures cellulaires dérivées sont conduites dans des conditions d'asepsie, dans un local où d'autres cellules ne sont pas manipulées pendant la production. Un sérum animal approprié (à l'exclusion du sérum humain) peut être utilisé dans la composition des milieux de culture. Il est démontré que le sérum et la trypsine utilisés dans la préparation des suspensions de cellules et des milieux de culture sont exempts d'agents étrangers. Le milieu de culture cellulaire peut contenir un indicateur de pH, tel que le rouge de phénol, et des antibiotiques appropriés à la plus faible concentration efficace. Il est souhaitable d'utiliser un substrat exempt d'antibiotiques pendant la production. 500 mL au moins des cultures cellulaires de production sont gardés comme cellules témoins non ensemencées. Si le vaccin est produit sur embryons de poulet, gardez comme oeufs témoins non ensemencés 2 pour cent des oeufs, si ce nombre est supérieur à 20, ou 20 oeufs au moins. Les suspensions de virus sont recueillies au moment approprié pour la souche de virus utilisée.

Seule une récolte unique qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée dans la préparation du vrac final.

**Identification**. L'identité virale de la récolte unique est vérifiée par un essai de séroneutralisation en culture cellulaire, effectué à l'aide d'anticorps spécifiques.

**Concentration en virus**. La concentration en virus dans la récolte unique est déterminée comme prescrit sous Dosage afin de s'assurer de la régularité de la production et de déterminer la dilution à utiliser dans la préparation du vrac final.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). La récolte unique satisfait aux essais des agents étrangers.

**Cellules témoins ou oeufs témoins**. Si des cellules diploïdes humaines sont utilisées pour la production, les cellules témoins satisfont à un essai d'identification ; les cellules témoins et les oeufs témoins satisfont aux essais des agents étrangers (*2.6.16*).

*VRAC FINAL*

Les récoltes uniques qui satisfont aux essais prescrits ci-dessus sont mélangées et clarifiées afin d'éliminer les cellules. Un stabilisant approprié peut être ajouté et le mélange de récoltes est dilué de façon appropriée.

Seul un vrac final qui satisfait à l'essai ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Contamination bactérienne et fongique**. Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*), effectué en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Une concentration minimale en virus pour la libération du vaccin est établie à l'aide des données de stabilité de manière à s'assurer qu'en fin de période de validité, la concentration minimale en virus indiquée sur l'étiquette sera présente dans le vaccin.

Seul un lot final qui est conforme à la spécification de la concentration minimale en virus pour la libération des lots, à l'essai ci-après de stabilité thermique et à chacun des essais décrits ci-après sous Identification et Essai peut être libéré. Si l'essai de sérum-albumine bovine et, dans les cas appropriés, l'essai de l'ovalbumine ont été effectués avec de bons résultats sur le vrac final, ils peuvent ne pas être effectués sur le lot final.

**Stabilité thermique**. Maintenez au minimum 3 flacons du lot final de vaccin cryodesséché à l'état sec à 37 ± 1 °C pendant 7 jours. Selon les modalités décrites sous Dosage, déterminez la concentration en virus du vaccin après chauffage et effectuez en parallèle le titrage du vaccin conservé à la température de

Vaccins

conservation recommandée. La concentration en virus du vaccin après chauffage n'est pas inférieure de plus de 1,0 log à la valeur obtenue avec le vaccin non chauffé.

IDENTIFICATION

Lorsque le vaccin reconstitué d'après les indications de l'étiquette est mélangé à des anticorps spécifiques du virus des oreillons, il n'infecte plus des cultures cellulaires sensibles.

ESSAI

**Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin reconstitué satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*).

**Sérum-albumine bovine**. Déterminez la teneur en sérum-albumine bovine par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La teneur n'est pas supérieure à 50 ng par dose humaine unitaire.

**Ovalbumine**. Si le vaccin a été préparé sur embryons de poulet, déterminez la teneur en ovalbumine par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La teneur n'est pas supérieure à 1 µg d'ovalbumine par dose humaine unitaire.

**Eau** (*2.5.12*). Déterminée par semi-microdosage, la teneur en eau n'est pas supérieure à 3,0 pour cent.

DOSAGE

Titrez le virus infectieux du vaccin, en utilisant au moins 3 flacons séparés de vaccin et en ensemençant un nombre approprié de cupules pour chaque étape de dilution.
Titrez en triple le contenu d'un flacon de préparation de référence appropriée de virus pour valider chaque titrage.
La concentration en virus de la préparation de référence est suivie à l'aide d'une carte de contrôle et un titre est établi par chaque laboratoire à partir des données historiques. Si une préparation de référence du fabricant est utilisée, sa relation avec la Préparation Biologique de Référence de la Pharmacopée Européenne appropriée est établie et contrôlée à intervalles réguliers. Calculez la concentration individuelle en virus pour chaque flacon de vaccin et pour chaque échantillon répliqué de la préparation de référence ainsi que les concentrations en virus combinées correspondantes en utilisant les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple). La concentration combinée estimée en virus pour les 3 flacons de vaccin n'est pas inférieure à celle indiquée sur l'étiquette ; la concentration minimale en virus indiquée sur l'étiquette n'est pas inférieure à 3,7 log $DICC_{50}$ par dose humaine.
L'essai n'est pas valable si :

– l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration estimée en virus de la préparation de référence pour les 3 échantillons répliqués combinés est supérieur à ± 0,3 log $DICC_{50}$ ;
– la concentration en virus de la préparation de référence diffère de plus de 0,5 log $DICC_{50}$ par rapport à la teneur établie.

L'essai est répété si l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration en virus combinée du vaccin est supérieur à ± 0,3 log $DICC_{50}$ ; seules les données provenant de titrages valides sont combinées par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple) pour le calcul de la concentration en virus de l'échantillon. L'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration en virus combinée n'est pas supérieur à ± 0,3 log $DICC_{50}$.

Le *vaccin vivant des oreillons PBR* convient comme préparation de référence.

Dans les cas justifiés et autorisés, des titrages de conceptions différentes peuvent être utilisés, ce qui peut impliquer l'application de critères de validité ou d'acceptation différents. Cependant, le vaccin doit être conforme s'il est contrôlé comme décrit ci-dessus.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– la souche de virus utilisée pour la préparation du vaccin,
– soit que le vaccin a été préparé sur embryons de poulet, soit le type et l'origine des cellules utilisées pour la préparation du vaccin,
– la concentration minimale en virus,
– que le contact entre le vaccin et les désinfectants doit être évité.

**01/2009:2418**

# VACCIN VIVANT DU ZONA

## Vaccinum zonae vivum

DÉFINITION

Le vaccin vivant du zona est une préparation cryodesséchée obtenue à partir de la souche atténuée appropriée de l'herpèsvirus humain 3. Le vaccin, reconstitué immédiatement avant l'emploi d'après les indications figurant sur l'étiquette, se présente sous forme d'un liquide limpide ou légèrement opalescent, d'une suspension sensiblement blanche ou d'un liquide jaune pâle qui peut être coloré en raison de la présence d'un indicateur de pH. Il est destiné à la vaccination des adultes.

PRODUCTION

La production du vaccin est basée sur un système de lot de semence viral et un système de banque de cellules. Il aura été démontré que ces systèmes donnent de façon constante des vaccins vivants du zona d'un pouvoir immunogène et d'une innocuité adéquats pour l'homme. Le virus dans le vaccin final ne devra pas avoir subi de passage dans des cultures cellulaires, au-delà d'un nombre défini de passages approuvé par l'Autorité compétente, à partir du virus original isolé.

La neurovirulence potentielle de la souche vaccinale est considérée lors du développement préclinique, basée sur les données épidémiologiques disponibles concernant la neurovirulence et le neurotropisme, principalement celles pour le type sauvage du virus. A la lumière de ces considérations, une analyse de risque est effectuée. Si nécessaire, et selon les disponibilités, un essai est effectué sur la souche vaccinale en utilisant un modèle animal qui différencie le type sauvage du virus atténué ; des essais sur les souches d'atténuation intermédiaire peuvent également être requis.

Le procédé de production fait l'objet d'une validation permettant de démontrer que le produit satisferait à l'essai de toxicité anormale des immunosérums et vaccins pour usage humain (*2.6.9*), s'il lui était appliqué.

*SUBSTRAT POUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS*

Le virus est multiplié dans des lignées de cellules diploïdes humaines (*5.2.3*).

*LOT DE SEMENCE*

La souche de l'herpèsvirus humain 3 sera identifiée comme étant la souche appropriée par des données historiques y compris des informations sur son origine et sa manipulation ultérieure. Le virus ne devra en aucun cas avoir subi un passage dans une lignée continue de cellules. Les lots de semence sont préparés dans le même type de cellules que celles utilisées pour la production du vaccin final. Les lots de semence de virus sont préparés en quantités importantes et conservés à des températures inférieures à – 20 °C s'ils sont cryodesséchés ou inférieures à – 60 °C s'ils ne le sont pas.

Seul un lot de semence qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la multiplication du virus.

**Identification**. Le lot de semence primaire et le lot de semence de travail sont identifiés comme contenant l'herpèsvirus humain 3 par un essai de séroneutralisation en culture cellulaire, à l'aide d'anticorps spécifiques.

**Concentration en virus**. La concentration en virus infectieux dans le lot de semence primaire et le lot de semence de travail est déterminée comme prescrit sous Dosage, afin de s'assurer de la régularité de la production.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Le lot de semence de travail satisfait aux exigences pour les lots de semence des vaccins viraux vivants ; utilisez 50 mL dans l'essai effectué sur cultures cellulaires.

*MULTIPLICATION ET RÉCOLTE*

Toutes les manipulations effectuées sur la banque de cellules et les cultures cellulaires dérivées sont conduites dans des conditions aseptiques dans des locaux où ne sont pas manipulés simultanément d'autres cellules ou d'autres virus. Du sérum animal approuvé (mais non humain) peut être utilisé dans les milieux de culture. Il est démontré que le sérum et la trypsine utilisés dans la préparation des suspensions de cellules et des milieux sont exempts d'agents étrangers. Le milieu de culture cellulaire peut contenir un indicateur de pH, tel que le rouge de phénol, et des antibiotiques approuvés à la plus faible concentration efficace. Il est souhaitable d'utiliser un substrat exempt d'antibiotiques pendant la production. 5 pour cent, mais au minimum 50 mL, des cultures cellulaires utilisées pour la production de vaccin sont gardés comme cellules témoins non ensemencées. Les cellules infectées provenant d'une même récolte sont lavées, dégagées de la surface du support et mélangées. La suspension de cellules est lysée par traitement aux ultrasons.

Seule une récolte de virus qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée dans la préparation du vrac final.

**Identification**. La récolte de virus est identifiée comme contenant l'herpèsvirus humain 3 par un essai de séroneutralisation en culture cellulaire, à l'aide d'anticorps spécifiques.

**Concentration en virus**. La concentration en virus dans les récoltes de virus est déterminée comme prescrit sous Dosage afin de s'assurer de la régularité de la production et de déterminer la dilution à utiliser dans la préparation du vrac final.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Utilisez 50 mL dans l'essai effectué sur cultures cellulaires.

**Cellules témoins**. Les cellules témoins de la culture cellulaire de production dont dérive la récolte unique satisfont à un essai d'identification et à l'essai des agents étrangers (*2.6.16*).

*VRAC FINAL*

Les récoltes de virus qui satisfont aux essais prescrits ci-dessus sont mélangées et clarifiées afin d'éliminer les cellules. Un stabilisant approprié peut être ajouté et le mélange de récoltes peut être dilué de façon appropriée.

Seul un vrac final qui satisfait à l'essai ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Contamination bactérienne et fongique**. Effectuez l'essai de stérilité (*2.6.1*) en utilisant 10 mL pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles à fermeture inviolable et cryodesséché jusqu'à une teneur en eau dont il est démontré qu'elle favorise la stabilité du vaccin. Les récipients sont alors fermés pour éviter la contamination et l'introduction d'humidité.

Seul un lot final qui satisfait à l'essai Eau et à chacun des essais décrits ci-après sous Identification, Essai et Dosage peut être libéré. Si l'essai de sérum-albumine bovine a été effectué avec des résultats satisfaisants sur le vrac final, il peut ne pas être effectué sur le lot final.

**Eau** (*2.5.12*). Déterminée par semi-microdosage, la teneur en eau n'est pas supérieure à la quantité approuvée par l'Autorité compétente et pour laquelle la stabilité du vaccin a été démontrée.

## IDENTIFICATION

Lorsque le vaccin reconstitué d'après les indications figurant sur l'étiquette est mélangé à des anticorps spécifiques de l'herpèsvirus humain 3, il n'infecte plus des cultures cellulaires sensibles.

## ESSAI

**Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin reconstitué satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*).

**Sérum-albumine bovine** : au maximum 0,65 µg par dose humaine, déterminé par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

## DOSAGE

Titrez le virus infectieux du vaccin en utilisant au moins 3 flacons séparés. Titrez en triple 1 flacon de préparation de référence appropriée du virus pour valider chaque titrage. La concentration en virus de la préparation de référence est suivie à l'aide d'une carte de contrôle et un titre est établi par chaque laboratoire à partir des données historiques. Calculez la concentration individuelle en virus pour chaque flacon de vaccin et pour chaque échantillon répliqué de la préparation de référence ainsi que les concentrations en virus combinées correspondantes en utilisant les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple). La concentration combinée estimée en virus pour les 3 flacons de vaccin n'est pas inférieure à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

L'essai n'est pas valable si :

- l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration estimée en virus de la préparation de référence pour les 3 échantillons répliqués combinés est supérieur à ± 0,3 log UFP ;
- la concentration en virus de la préparation de référence diffère de plus de 0,5 log UFP par rapport au titre établi.

L'essai est répété si l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration en virus combinée du vaccin est supérieur à ± 0,3 log UFP ; seules les données provenant de titrages valides sont combinées par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple) pour le calcul de la concentration en virus de l'échantillon. L'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration en virus combinée n'est pas supérieur à ± 0,3 log UFP.

Dans des cas justifiés et autorisés, des titrages de conceptions différentes peuvent être utilisés, ce qui peut impliquer l'application de critères de validité ou d'acceptation différents. Cependant, le vaccin doit être conforme, s'il est contrôlé comme décrit ci-dessus.

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- la souche du virus utilisé pour la préparation du vaccin,
- le type et l'origine des cellules utilisées pour la préparation du vaccin,
- la concentration minimale en virus,
- que le contact entre le vaccin et les désinfectants doit être évité,
- que le vaccin ne doit pas être administré aux femmes enceintes.

**04/2009:2417**

# VACCIN VIVANT ORAL À ROTAVIRUS

## Vaccinum rotaviri vivum perorale

## DÉFINITION

Le vaccin vivant oral à rotavirus est une préparation d'un ou de plusieurs sérotypes viraux appropriés, cultivée dans un substrat cellulaire approuvé et présentée dans une forme adaptée à l'administration orale.

Le vaccin se présente sous la forme d'un liquide limpide ou d'une préparation cryodesséchée à reconstituer immédiatement avant emploi, d'après les indications figurant sur l'étiquette, pour obtenir un liquide légèrement trouble. Le vaccin prêt à l'emploi peut être coloré en raison de la présence d'un indicateur de pH.

PRODUCTION

*DISPOSITIONS GÉNÉRALES*

Il doit avoir été démontré que les souches vaccinales et le procédé de production utilisés permettent d'obtenir de façon reproductible des vaccins comparables à celui dont l'efficacité clinique et l'innocuité chez l'homme ont été démontrées. Le vaccin est formulé de manière à éviter une inactivation par les sucs gastriques. Dans le cas d'un vaccin cryodesséché, la capacité antiacide du solvant et sa stabilité doivent être établies.

La production du vaccin est basée sur un système de lot de semence virale et un système de banque cellulaire. Sauf exception justifiée et autorisée, le virus dans le vaccin final n'aura pas subi plus de passages depuis le lot de semence primaire que le vaccin qui a satisfait aux essais cliniques d'innocuité et d'efficacité.

Si la production comprend des étapes de purification, la réduction d'impuretés et résidus sélectionnés, liés au procédé de fabrication, tels que les protéines résiduelles issues de la cellule hôte, de l'ADN cellulaire résiduel, des endotoxines, du sérum bovin, de la trypsine ou des antibiotiques est suivie pour établir la régularité du procédé de purification.

*PRÉPARATION DE RÉFÉRENCE*

Une préparation de référence appropriée, représentative des lots de vaccin dont l'efficacité a été démontrée lors d'essais cliniques, est établie en vue d'une utilisation lors des essais de détermination de la concentration en virus. Les différences de composition et de caractéristiques des vaccins à rotavirus impliquent l'établissement d'une préparation de référence spécifique pour chacun de ces vaccins.

*SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

Le virus est multiplié dans une lignée de cellules appropriée (*5.2.3*).

*LOTS DE SEMENCE*

La (ou les) souche(s) de rotavirus utilisée(s) doivent être identifiées par des données historiques y compris des informations sur leur origine et leur manipulation ultérieure (méthode d'atténuation comprise), l'indication éventuelle d'un clonage biologique avant génération du lot de semence primaire, des informations sur leur séquence génétique, sur la stabilité phénotypique et génotypique des lots de semence primaire et de travail en cas de passages jusqu'au niveau de la récolte unique, et sur le niveau de passage auquel l'atténuation chez l'homme a été démontrée par des essais cliniques. Les lots de semence de virus sont conservés à des températures inférieures à − 20 °C s'ils sont cryodesséchés ou inférieures à − 60 °C s'ils ne le sont pas.

Seul un lot de semence qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé pour la multiplication du virus.

**Identification**. L'appartenance des lots de semence primaire et de travail au type de rotavirus exigé est démontrée par un titrage immunologique utilisant des anticorps spécifiques ou par un essai d'identité moléculaire comme l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide de l'ARN, l'hybridation ARN-ARN ou la cartographie par enzymes de restriction des séquences génétiques codant VP7 amplifiées par une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR).

**Concentration en virus**. La concentration en virus des lots de semence primaire et de travail est déterminée afin de s'assurer de la régularité de la production. Les méthodes directes basées sur une culture cellulaire et les techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) comme la quantification de la réplication virale en culture cellulaire par PCR peuvent être utilisées.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Chaque lot de semence de travail satisfait aux exigences relatives aux lots de semence de virus.

*MULTIPLICATION DU VIRUS, RÉCOLTE UNIQUE, MÉLANGE MONOVALENT DE RÉCOLTES*

Toutes les manipulations effectuées sur la banque de cellules et les cultures cellulaires dérivées sont conduites dans des conditions d'asepsie, dans un local où ne sont pas manipulées d'autres cellules. Un sérum animal approprié (à l'exclusion du sérum humain) peut être utilisé dans la composition des milieux de culture, mais le milieu final utilisé pour maintenir la croissance cellulaire pendant la multiplication virale ne doit pas contenir de sérum animal. Il est démontré que le sérum et la trypsine utilisés dans la préparation des suspensions cellulaires et des milieux de culture sont exempts d'agents étrangers. Le milieu de culture cellulaire peut contenir un indicateur de pH tel que le rouge de phénol, et des antibiotiques appropriés à la plus faible concentration efficace. Il est souhaitable d'utiliser un substrat exempt d'antibiotiques pendant la production.

*CULTURE VIRALE INTERMÉDIAIRE CONSERVÉE*

En cas d'inoculation d'une culture virale intermédiaire conservée, préparée à partir du lot de semence de travail, le jour de l'inoculation, conservez au moins 5 pour cent ou 500 mL, en choisissant la quantité la plus grande, des cultures cellulaires utilisées comme cultures cellulaires non infectées (cellules témoins). Les cultures virales intermédiaires conservées sont recueillies au moment approprié pour la souche de virus utilisée et conservées à des températures inférieures à − 60°C.

Seule une culture virale intermédiaire conservée satisfaisant aux exigences ci-après peut être utilisée pour la multiplication du virus.

**Identification**. Chaque culture virale intermédiaire conservée est identifiée selon le type de rotavirus par un titrage immunologique à l'aide d'anticorps spécifiques ou par un essai d'identité moléculaire comme ceux utilisant les techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*).

**Contamination bactérienne et fongique**. Chaque culture virale intermédiaire conservée satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

**Concentration en virus**. La concentration en virus de chaque culture virale intermédiaire conservée est déterminée comme prescrit sous Activité, afin de s'assurer de la régularité de la production. Les méthodes directes basées sur une culture cellulaire ainsi que les techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) comme la quantification de la réplication virale en culture cellulaire par PCR peuvent être utilisées.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Chaque culture virale intermédiaire conservée satisfait aux essais des agents étrangers.

**Cellules témoins**. Les cellules témoins de la culture cellulaire de production dont dérive chaque culture virale intermédiaire conservée satisfont à un essai d'identification et à l'essai des agents étrangers (*2.6.16*).

*MULTIPLICATION DU VIRUS ET RÉCOLTE UNIQUE*

Le jour de l'inoculation avec le lot de semence de travail de virus ou la culture virale intermédiaire conservée, conservez des cultures cellulaires utilisées dans la production du vaccin comme cultures cellulaires non infectées (cellules témoins). Si la technologie de bioréacteur est utilisée, la taille et la manipulation de l'échantillon cellulaire à examiner sont approuvées par l'Autorité compétente. Les suspensions de virus sont recueillies au moment approprié pour la souche de virus utilisée.

Seule une récolte unique de virus satisfaisant aux exigences ci-après peut être utilisée pour le traitement ultérieur.

**Contamination bactérienne et fongique**. Chaque récolte unique de virus satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

**Cellules témoins**. Les cellules témoins de la culture cellulaire de production dont dérive chaque récolte unique satisfont à un essai d'identification et à l'essai des agents étrangers (*2.6.16*).

*MÉLANGE MONOVALENT DE RÉCOLTES*

Les mélanges monovalents de récoltes sont préparés par mélange de plusieurs récoltes uniques du même type viral. S'il n'est pas préparé de mélange monovalent de récoltes, les essais ci-après sont effectués sur chaque récolte unique.

Seule une récolte unique, ou un mélange monovalent de récoltes, qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisé dans la préparation de la récolte monovalente purifiée.

**Identification**. Chaque récolte unique ou mélange monovalent de récoltes est identifié(e) par type de rotavirus par un titrage immunologique utilisant des anticorps spécifiques ou par un essai d'identité moléculaire comme ceux utilisant les techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*).

**Contamination bactérienne et fongique**. Chaque récolte unique ou mélange monovalent de récoltes satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

**Concentration en virus**. La concentration en virus de chaque récolte unique ou mélange monovalent de récoltes est déterminée comme prescrit sous Activité, afin de s'assurer de la régularité de la production. Les méthodes directes basées sur une culture cellulaire ainsi que les techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) comme la quantification de la réplication virale en culture cellulaire par PCR peuvent être utilisées.

**Agents étrangers** (*2.6.16*). Chaque récolte unique ou mélange monovalent de récoltes satisfait aux essais des agents étrangers.

*RÉCOLTE MONOVALENTE PURIFIÉE*

La récolte monovalente purifiée est préparée à partir d'une récolte unique ou d'un mélange monovalent de récoltes. La récolte unique ou le mélange monovalent de récoltes est clarifié pour éliminer les débris cellulaires et peut être purifié.

Seule une récolte monovalente purifiée qui satisfait aux essais ci-après peut être utilisée dans la préparation du vrac final.

**Contamination bactérienne et fongique**. La récolte monovalente purifiée satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*). Utilisez 10 mL pour chaque milieu.

**Concentration en virus**. La concentration en virus de la récolte monovalente purifiée est déterminée comme prescrit sous Activité, afin de s'assurer de la régularité de la production. Les méthodes directes basées sur une culture cellulaire ainsi que les techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*) comme la quantification de la réplication virale en culture cellulaire par PCR peuvent être utilisées.

**ADN cellulaire résiduel** : au maximum 100 μg d'ADN cellulaire par dose humaine pour les virus cultivés sur des lignées cellulaires continues.

*VRAC FINAL*

Le vrac final est préparé à partir d'une ou de plusieurs récoltes monovalentes purifiées déclarées satisfaisantes. Il peut contenir plusieurs des types viraux. Des stabilisants appropriés peuvent être ajoutés.

Seul un vrac final qui satisfait à l'essai ci-après peut être utilisé dans la préparation du lot final.

**Contamination bactérienne et fongique**. Le vrac final satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*). Utilisez 10 mL de préparation pour chaque milieu.

*LOT FINAL*

Le vrac final est réparti aseptiquement dans des récipients stériles. Il peut être cryodesséché jusqu'à une teneur en eau dont il est démontré qu'elle favorise la stabilité du vaccin. Les récipients sont alors fermés pour éviter la contamination et l'introduction d'humidité.

Pour chaque type de virus, une concentration minimale en virus approuvée pour la libération du vaccin est établie à l'aide des données relatives à la stabilité, de manière à s'assurer qu'en fin de période de validité, la concentration minimale en virus indiquée sur l'étiquette sera présente dans le vaccin.

Dans le cas de vaccins cryodesséchés, des essais d'identité, de pH, de volume, de stérilité et de teneur en composants-clés sont effectués sur le solvant.

Seul un lot final qui satisfait à l'essai de stabilité thermique ci-après et à chacun des essais décrits sous Identification, Essai et Activité peut être libéré.

**Stabilité thermique**. Sauf exception justifiée et autorisée, l'essai de stabilité thermique s'applique. Maintenez au moins 3 échantillons du lot final de vaccin à une température élevée pendant une période de temps définie, sous des conditions jugées appropriées pour le produit considéré, selon la décision de l'Autorité compétente. Estimez en parallèle la concentration en virus des récipients non chauffés et chauffés à l'aide de la méthode utilisée sous Activité. La concentration en virus des récipients ayant été chauffés ne décroît pas, pendant la période de chauffage, d'une quantité supérieure à la quantité approuvée. Dans le cas d'un vaccin multivalent, s'il n'est pas observé de différence significative de perte en virus entre les sérotypes, la perte peut être basée sur la concentration totale en virus.

## IDENTIFICATION

Il est démontré, par un titrage immunologique utilisant des anticorps spécifiques ou par un essai d'identité moléculaire, que le vaccin contient les rotavirus de chacun des types indiqués sur l'étiquette. La technique de PCR, si elle est utilisée pour le titrage sous Activité, peut servir d'essai d'identité.

## ESSAI

**Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité (*2.6.1*).

**Eau** (*2.5.12*) : au maximum 3,0 pour cent pour chaque lot final de vaccin cryodesséché.

## ACTIVITÉ

Le titrage d'activité du vaccin à rotavirus est effectué par inoculation de dilutions du vaccin à des cultures cellulaires appropriées et évaluation de la concentration en rotavirus, soit par l'observation des surfaces infectées d'un tapis cellulaire, soit par la comparaison de la capacité du vaccin à produire l'ARN viral suite à l'infection des cellules avec la capacité correspondante d'une préparation de référence approuvée.

*Pour le titrage basé sur l'observation des surfaces infectées d'un tapis cellulaire*, déterminez le titre en virus infectieux en utilisant au moins 3 récipients séparés de vaccin. Titrez en triple le contenu de 1 récipient de préparation de référence appropriée de virus pour valider chaque titrage. Si le vaccin contient plusieurs types de rotavirus, chacun d'eux fait l'objet d'un titrage séparé, par une méthode de spécificité appropriée. La concentration en virus de la préparation de référence est vérifiée à l'aide de cartes de contrôle et un titre est établi par chaque laboratoire sur la base de données historiques.

Calculez la concentration individuelle en virus pour chaque récipient de vaccin et pour chaque échantillon répliqué de la préparation de référence, ainsi que les concentrations en virus combinées correspondantes, en utilisant les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple).

Le titrage n'est pas valable si :

– l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration estimée en virus de la préparation de référence pour les 3 échantillons répliqués combinés est supérieure à ± 0,3 log $DICC_{50}$ (ou une valeur équivalente exprimée avec une unité adaptée à la méthode utilisée sous Activité),
– la concentration en virus de la préparation de référence diffère de plus de 0,5 log $DICC_{50}$ (ou une valeur équivalente exprimée avec une unité adaptée à la méthode utilisée sous Activité) par rapport à la teneur établie.

Le titrage est répété si l'intervalle de confiance ($P$ = 0,95) de la concentration en virus combinée du vaccin est supérieure à ± 0,3 log $DICC_{50}$ (ou une valeur équivalente exprimée avec une unité adaptée à la méthode utilisée sous Activité) ; seules les données générées par des titrages valides sont combinées

par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple) pour le calcul de la concentration en virus de l'échantillon. L'intervalle de confiance (*P* = 0,95) de la concentration en virus combinée n'est pas supérieur à ± 0,3 log $DICC_{50}$ (ou une valeur équivalente exprimée avec une unité adaptée à la méthode utilisée sous Activité).

Dans des cas justifiés et autorisés, des conceptions différentes peuvent être utilisées pour le titrage, ce qui peut impliquer l'application de critères de validité et d'acceptation différents. Le vaccin devra cependant être conforme si l'essai décrit ci-dessus est utilisé.

*Pour le titrage basé sur la comparaison de la capacité du vaccin à produire l'ARN viral* suite à l'infection des cellules avec la capacité correspondante d'une préparation de référence approuvée, un nombre approprié de cultures cellulaires sur une plaque de microtitrage est infecté en parallèle par des dilutions en série du vaccin à examiner et de la préparation de référence. Après incubation pour permettre la réplication du virus, l'ARN viral est, dans chaque puits individuel, libéré des cellules et quantifié par des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*), comme la technique de transcription inverse suivie de réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) en temps réel.

En utilisant au moins 3 récipients séparés de vaccin, procédez à un titrage par comparaison à un récipient de la préparation de référence titré en triple.

Calculez la concentration en virus individuelle pour chaque récipient de vaccin par comparaison à la préparation de référence ainsi que les concentrations en virus combinées correspondantes, en utilisant les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple).

L'estimation combinée de la concentration en virus pour les 3 récipients de vaccin n'est pas inférieure à celle indiquée sur l'étiquette.

L'essai n'est valable que si :

– le témoin externe négatif pour la technique d'amplification des acides nucléiques est clairement négatif,
– le témoin externe positif pour la technique d'amplification des acides nucléiques est clairement positif,
– la matrice témoin négatif (cellules non infectées) est clairement négative,
– la matrice témoin positif (cellules surchargée en ARN viral) est clairement positive,
– l'analyse statistique montre que les courbes dose-réponse ont une pente significative et ne révèle aucune déviation de la linéarité ni du parallélisme.

L'essai est répété si l'intervalle de confiance (*P* = 0,95) de la concentration en virus combinée du vaccin est supérieure à ± 0,3 log unités infectieuses ; seules les données générées par des dosages valides sont combinées par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple) pour le calcul de la concentration en virus de l'échantillon. L'intervalle de confiance (*P* = 0,95) de la concentration en virus combinée n'est pas supérieur à ± 0,3 log unités infectieuses.

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le ou les types de rotavirus contenus dans le vaccin,
– la quantité minimale de chaque type du virus contenue dans 1 dose humaine unitaire,
– la nature du substrat cellulaire utilisé pour la préparation du vaccin,
– que le vaccin ne doit pas être injecté.

Vaccins

Vaccins

# VACCINS POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

**01/2008:0360**

# VACCIN BOTULINIQUE POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Vaccinum Clostridii botulini ad usum veterinarium

1. DÉFINITION

Le vaccin botulinique pour usage vétérinaire est préparé à partir de cultures convenables de *Clostridium botulinum* type C ou D ou du mélange de ces types. La culture ou son filtrat ou un mélange des deux est inactivé pour éliminer l'effet toxique en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des animaux contre le botulisme.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

*C. botulinum* utilisé pour la production est multiplié dans un milieu liquide approprié.
La préparation peut être adsorbée, précipitée ou concentrée. Elle peut être additionnée d'un adjuvant approprié et cryodesséchée.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis à vis des animaux auxquels il est destiné.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-5) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

*L'identification, les essais et le titrage de l'activité prescrits ci-après s'appliquent à la préparation liquide et à la préparation cryodesséchée, reconstituée d'après les indications figurant sur l'étiquette.*

3-1. **Identification**. Le vaccin stimule la formation d'anticorps dirigés contre le type ou les types de *C. botulinum* entrant dans la composition du vaccin lorsqu'il est injecté à des animaux dépourvus de ces anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062).*

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 animaux appartenant à l'une des espèces auxquelles le vaccin est destiné et qui n'ont pas été vaccinés contre *C. botulinum*. Administrez à chacun d'eux, par une voie recommandée, 2 fois la plus forte dose de vaccin recommandée. Observez les animaux au moins une fois par jour pendant 7 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Toxicité résiduelle**. Utilisez 5 souris pesant 17-22 g. Injectez 0,5 mL du vaccin par voie sous-cutanée à chacune d'elles. Observez les souris au moins une fois par jour pendant 7 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-5. **Activité**.

Utilisez des souris blanches, en bonne santé, provenant d'un élevage homogène, pesant chacune 18-20 g.

Utilisez comme dose d'épreuve une quantité de toxine de *C. botulinum* du même type que celui qui a été utilisé dans la préparation du vaccin, correspondant à 25 doses paralysantes 50 pour cent, la dose paralysante 50 pour cent représentant la quantité de toxine qui, inoculée aux souris par voie intrapéritonéale, entraîne la paralysie de la moitié des animaux au cours d'une période d'observation de 7 jours. Si 2 types de *C. botulinum* ont été utilisés dans la préparation du vaccin, effectuez le titrage pour chacun d'eux.

Diluez le vaccin à examiner au 1:8 dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L. Administrez par voie sous-cutanée et par sujet, 0,2 mL de cette dilution à 20 souris. Après 21 jours, inoculez la dose d'épreuve par voie intrapéritonéale à chaque souris vaccinée et à chacune des 10 souris qui servent de témoins. Observez les souris pendant 7 jours. Notez le nombre de souris qui présentent des signes de botulisme. L'essai n'est valable que si tous les animaux témoins présentent ces signes pendant la période d'observation. Le vaccin satisfait à l'essai si 80 pour cent au moins des souris vaccinées sont protégées.

4. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le ou les type(s) de *C. botulinum* à partir duquel ou desquels le vaccin a été préparé,
– s'il s'agit d'une anatoxine ou d'un vaccin préparé à partir de la culture entière inactivée ou d'un mélange des deux.

**01/2008:0361**

# VACCIN DE CLOSTRIDIUM CHAUVOEI POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Vaccinum Clostridii chauvoei ad usum veterinarium

1. DÉFINITION

Le vaccin de Clostridium chauvoei pour usage vétérinaire est préparé à partir de cultures convenables d'une ou de plusieurs souches appropriées de *Clostridium chauvoei*. La culture entière est inactivée pour éliminer l'effet toxique en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des animaux contre les maladies causées par *C. chauvoei*.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

*C. chauvoei* utilisé pour la production est multiplié dans un milieu liquide approprié. Les cultures inactivées peuvent être additionnées d'un adjuvant approprié.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis à vis des animaux auxquels il est destiné.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le vaccin protège des animaux réceptifs contre l'infection due à *C. chauvoei*. L'essai d'activité peut également servir à l'identification.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 animaux appartenant à l'une des espèces auxquelles le vaccin est destiné et qui n'ont pas été vaccinés contre *C. chauvoei*. Administrez à chacun d'eux, par

Vaccins

une voie recommandée et en un seul point, 2 fois la plus forte dose recommandée de vaccin. Observez les animaux au moins une fois par jour pendant 7 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Activité**

Administrez par voie sous-cutanée à au moins 10 cobayes en bonne santé pesant chacun 350-450 g une quantité du vaccin qui n'est pas supérieure à la dose minimale indiquée sur l'étiquette comme première dose. 28 jours plus tard, administrez aux mêmes animaux une quantité de vaccin qui n'est pas supérieure à la dose minimale indiquée sur l'étiquette comme seconde dose. 14 jours après la seconde vaccination, inoculez respectivement par voie intramusculaire à chaque cobaye vacciné et à 5 cobayes qui servent de témoins une dose appropriée d'une culture virulente ou d'une suspension de spores de *C. chauvoei* activée, si nécessaire, par une substance activatrice telle que le chlorure de calcium.

Le vaccin satisfait à l'essai si 10 pour cent au maximum des cobayes vaccinés meurent d'une infection due à *C. chauvoei* pendant une période d'observation de 5 jours et si tous les témoins meurent d'une infection due à *C. chauvoei* dans les 48 h qui suivent l'épreuve ou dans les 72 h si une suspension de spores a servi de préparation d'épreuve. Si plus de 10 pour cent mais pas plus de 20 pour cent des animaux vaccinés meurent, répétez l'essai. Le vaccin satisfait à l'essai si 10 pour cent au maximum des animaux vaccinés du second groupe meurent pendant une période d'observation de 5 jours et si tous les témoins du second groupe meurent dans les 48 h qui suivent l'épreuve ou dans les 72 h si une suspension de spores a servi de préparation d'épreuve. Afin d'éviter une souffrance inutile suite à l'épreuve virulente, les animaux moribonds sont euthanasiés et il est alors considéré qu'ils sont morts d'une infection due à *C. chauvoei.*

**01/2010:0362**

# VACCIN DE CLOSTRIDIUM NOVYI (TYPE B) POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Vaccinum Clostridii novyi B ad usum veterinarium

1. DÉFINITION

Le vaccin de Clostridium novyi (type B) pour usage vétérinaire est préparé à partir d'une culture d'une souche convenable de *Clostridium novyi* (type B) en milieu liquide.

La culture entière ou son filtrat ou un mélange des 2 est inactivé pour éliminer l'effet toxique en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des animaux et/ou pour la protection passive de leur progéniture contre les maladies causées par *C. novyi* (type B).

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

*C. novyi* (type B) utilisé pour la production est multiplié dans un milieu liquide approprié. Les anatoxines ou les cultures inactivées obtenues peuvent être additionnées d'un adjuvant approprié, si nécessaire après concentration.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis à vis des animaux auxquels il est destiné. Dans ce dernier cas, il convient de démontrer pour chaque espèce cible que le vaccin, lorsqu'il est administré selon le schéma recommandé, induit une réponse immunitaire (par exemple, induction d'anticorps) en conformité avec les indications données pour le produit.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Toxicité résiduelle**. Un essai de détoxification est effectué immédiatement après le procédé de détoxification et, lorsqu'il y a un risque de réversibilité à la toxine, un 2^e^ essai est effectué à un stade aussi avancé que possible de la préparation du vaccin. L'essai de toxicité résiduelle (section 3-4) peut ne pas être effectué par le fabricant.

2-3-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-5) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale.

Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité et qui a été démontré satisfaisant en ce qui concerne le pouvoir immunogène chez la ou les espèces cibles. L'essai suivant peut être effectué après qu'il a été établi qu'il y a une corrélation satisfaisante avec l'essai décrit sous Activité (section 3-5).

Vaccinez des lapins comme décrit sous Activité et préparez des échantillons de sérum. Déterminez le taux d'anticorps dirigés contre la toxine alpha de *C. novyi* dans les sérums individuels, par une méthode appropriée telle qu'une méthode immunochimique (*2.7.1*) ou par neutralisation en culture cellulaire. Utilisez un sérum de référence homologue étalonné en Unités Internationales d'antitoxine alpha de *C. novyi*. Le *sérum composé de lapin anticlostridies PBR* convient comme sérum de référence.

Le vaccin satisfait à l'essai si le taux d'anticorps n'est pas inférieur à celui trouvé pour un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité et qui a été démontré satisfaisant en ce qui concerne le pouvoir immunogène chez la ou les espèces cibles.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le vaccin induit la formation d'antitoxine novyi alpha lorsqu'il est injecté à des animaux qui ne possèdent pas cette antitoxine.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 animaux appartenant à l'une des espèces auxquelles le vaccin est destiné et qui n'ont pas été vaccinés contre *C. novyi* (type B). Administrez à chacun d'eux, par une voie recommandée, 2 fois la plus forte dose recommandée de vaccin. Observez les animaux au moins 1 fois par jour pendant au moins 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Toxicité résiduelle**. Utilisez 5 souris pesant chacune 17-22 g. Administrez à chacune d'elles, par voie sous-cutanée, 0,5 mL du vaccin. Observez les animaux au moins 1 fois par jour pendant 7 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-5. **Activité**

Administrez par voie sous-cutanée et par sujet à au moins 10 lapins en bonne santé, âgés de 3-6 mois, une quantité de vaccin qui n'est pas supérieure à la dose minimale indiquée sur l'étiquette comme première dose. 21-28 jours plus tard, administrez aux mêmes animaux une quantité de vaccin qui n'est pas supérieure à la dose minimale indiquée sur l'étiquette comme 2^de^ dose. 10-14 jours après la 2^de^ vaccination, saignez les lapins et mélangez les sérums.

Le vaccin satisfait à l'essai si l'activité du mélange des sérums récoltés n'est pas inférieure à 3,5 UI/mL.

L'Unité Internationale correspond à l'activité neutralisante spécifique à l'égard de la toxine alpha de *C. novyi*, contenue dans une quantité donnée de l'étalon international constitué par du sérum desséché de cheval immunisé. La correspondance entre l'Unité Internationale et la préparation étalon internationale est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

L'activité du mélange de sérums prélevés sur lapins est évaluée par détermination de la quantité permettant d'assurer la protection de souris ou d'autres animaux appropriés contre les effets toxiques d'une dose donnée de toxine alpha de *C. novyi*. Cette dose est comparée avec une quantité d'une préparation de référence d'immunosérum Clostridium novyi alpha, étalonnée en Unités Internationales, nécessaire pour assurer la même protection. Le titrage biologique exige l'emploi d'une préparation appropriée de toxine alpha de *C. novyi* destinée à servir de toxine d'épreuve. La dose de la toxine d'épreuve est déterminée par rapport à la préparation de référence ; l'activité du sérum à examiner est déterminée par rapport à l'activité de la préparation de référence à l'aide de la toxine d'épreuve.

Le *sérum composé de lapin anticlostridies PBR* convient comme sérum de référence.

3-5-1. *Préparation de la toxine d'épreuve*. Préparez la toxine d'épreuve en milieu liquide à partir du filtrat stérile d'une culture de 5 jours environ de *C. novyi* type B et desséchez-la par une méthode appropriée. Choisissez la toxine d'épreuve en déterminant sur souris la dose L+/10 et la $DL_{50}$, la période d'observation étant de 72 h.

La toxine alpha appropriée contient au moins 1 dose L+/10 dans 0,05 mg et au moins 10 $DL_{50}$ dans 1 dose L+/10.

3-5-2. *Détermination de la dose d'épreuve de toxine*. Préparez une solution de la préparation de référence dans un liquide approprié de façon que son activité soit de 1 UI/mL. Préparez une solution de toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon que 1 mL en contienne une quantité exactement connue, par exemple 1 mg. Préparez des mélanges de solution de la préparation de référence et de solution de toxine d'épreuve de façon qu'ils contiennent chacun 1,0 mL de solution de la préparation de référence (1 UI) et une quantité variable de la solution de toxine d'épreuve, puis complétez chaque mélange au même volume final de 2,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer les mélanges à température ambiante pendant 60 min. Utilisez pour chaque mélange un groupe d'au moins 2 souris pesant chacune 17-22 g. Injectez à chacune d'elles, par voie intramusculaire ou sous-cutanée, 0,2 mL du mélange attribué à son groupe. Observez les souris pendant 72 h. Si toutes les souris meurent, la quantité de toxine présente dans 0,2 mL du mélange dépasse la dose d'épreuve. Si aucune des souris ne meurt, la quantité de toxine présente dans 0,2 mL de mélange est inférieure à la dose d'épreuve. Préparez de nouveaux mélanges de façon qu'ils contiennent chacun dans 2,0 mL, 1,0 mL de solution de la préparation de référence (1 UI) et une quantité variable de solution de toxine d'épreuve appartenant à une série dont chaque concentration diffère l'une de l'autre de 20 pour cent au plus, et qui recouvre le point final présumé. Laissez reposer les mélanges à température ambiante pendant 60 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles, par voie intramusculaire ou sous-cutanée, 0,2 mL du mélange attribué à son groupe. Observez les souris pendant 72 h. Répétez la détermination au moins 1 fois et additionnez les résultats des essais effectués avec les mélanges de même composition, de façon à obtenir une série de totaux dont chacun représente la mortalité due à un mélange d'une composition donnée.

La dose d'épreuve de toxine correspond à la quantité présente dans 0,2 mL du mélange qui provoque la mort de la moitié des souris auxquelles il a été inoculé.

3-5-3. *Détermination de l'activité du sérum prélevé sur lapins*

*Essai préliminaire.* Dissolvez une quantité de la toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon que 1,0 mL contienne 10 doses d'épreuve (solution de la toxine d'épreuve). Préparez une série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et du sérum à examiner de façon qu'ils contiennent chacun 1,0 mL de solution de toxine d'épreuve et une quantité variable du sérum à examiner. Complétez chaque mélange au même volume final de 2,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer les mélanges à température ambiante pendant 60 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles, par voie intramusculaire ou sous-cutanée, 0,2 mL du mélange attribué à son groupe. Observez les souris pendant 72 h. Si aucune souris ne meurt, 0,2 mL du mélange contient plus de 0,1 UI. Si toutes les souris meurent, 0,2 mL du mélange contient moins de 0,1 UI.

*Essai définitif.* Préparez une série de mélanges de solution de toxine d'épreuve et du sérum à examiner de façon qu'ils contiennent chacun dans 2,0 mL, 1,0 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable du sérum à examiner appartenant à une série dont chaque concentration diffère l'une de l'autre de 20 pour cent au plus, et qui recouvre le point final présumé, quantités déterminées dans l'essai préliminaire. Préparez d'autres mélanges de solution de toxine d'épreuve et de solution de la préparation de référence de façon qu'ils contiennent chacun dans 2,0 mL, 1,0 mL de solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de solution de la préparation de référence afin de vérifier la dose d'épreuve de toxine. Laissez reposer les mélanges à température ambiante pendant 60 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 souris pour chaque mélange et procédez comme indiqué dans l'essai préliminaire.

Le mélange à examiner qui contient 0,1 UI dans 0,2 mL est celui qui provoque la mort du même ou presque du même nombre de souris que le mélange de référence contenant 0,1 UI dans 0,2 mL. Répétez la détermination au moins 1 fois et calculez la moyenne des résultats significatifs. L'essai n'est valable que si le résultat obtenu avec la préparation de référence ne diffère pas de plus de 20 pour cent de la valeur escomptée.

Les limites de confiance ($P = 0,95$) sont estimées comme suit :

– 85 pour cent et 114 pour cent lorsque 2 animaux sont utilisés par dose,
– 91,5 pour cent et 109 pour cent lorsque 4 animaux sont utilisés par dose,
– 93 pour cent et 108 pour cent lorsque 6 animaux sont utilisés par dose.

4. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– s'il s'agit d'une anatoxine ou d'un vaccin préparé à partir de la culture entière inactivée ou d'un mélange des 2,
– pour chaque espèce cible, la réponse immunitaire induite par le vaccin (par exemple, production d'anticorps, protection contre l'infection ou contre la maladie).

**01/2008:0363**

# VACCIN DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Vaccinum Clostridii perfringentis ad usum veterinarium

1. DÉFINITION

Le vaccin de Clostridium perfringens pour usage vétérinaire est préparé à partir de cultures de souches convenables de *Clostridium perfringens* type B, de *C. perfringens* type C ou de *C. perfringens* type D, ou d'une combinaison de ces types en milieu liquide.

Les cultures entières ou leurs filtrats ou un mélange des deux sont inactivés pour éliminer leur effet toxique en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des animaux et/ou pour la protection passive de leur progéniture contre les maladies causées par *C. perfringens*.

Vaccins

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

*C. perfringens* utilisé pour la production est multiplié dans un milieu liquide approprié. Les anatoxines ou les cultures inactivées obtenues peuvent être additionnées d'un adjuvant approprié.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis à vis des animaux auxquels il est destiné. Dans ce dernier cas, il convient de démontrer pour chaque espèce cible que le vaccin, lorsqu'il est administré selon le schéma recommandé, induit une réponse immunitaire (par exemple, induction d'anticorps) en conformité avec les indications données pour le produit.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Toxicité résiduelle**. Un essai de détoxification est effectué immédiatement après le procédé de détoxification et, lorsqu'il y a un risque de réversibilité à la toxine, un deuxième essai est effectué à un stade aussi avancé que possible de la préparation du vaccin. L'essai de toxicité résiduelle (section 3-4) peut ne pas être effectué par le fabricant.

2-3-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-5) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale.

Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité et qui a été démontré satisfaisant en ce qui concerne le pouvoir immunogène chez la ou les espèces cibles. L'essai suivant peut être effectué après qu'il a été établi qu'il y a une corrélation satisfaisante avec l'essai décrit sous Activité (section 3-5).

Vaccinez des lapins comme décrit sous Activité et préparez des échantillons de sérum. Déterminez le taux d'anticorps dirigés contre la toxine bêta ou la toxine epsilon de *C. perfringens*, dans les sérums individuels, par une méthode appropriée telle qu'une méthode immunochimique (*2.7.1*) ou par neutralisation en culture cellulaire. Utilisez un sérum de référence homologue étalonné en Unités Internationales d'antitoxine bêta ou epsilon de *C. perfringens*. Le *sérum composé de lapin anticlostridies PBR* convient comme sérum de référence.

Le vaccin satisfait à l'essai si le ou les taux d'anticorps ne sont pas inférieurs à celui ou ceux trouvés pour un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité et qui a été démontré satisfaisant en ce qui concerne le pouvoir immunogène chez la ou les espèces cibles.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**

*Type B.* Le vaccin induit la formation d'antitoxines bêta et epsilon lorsqu'il est injecté à des animaux qui ne possèdent pas ces antitoxines.

*Type C.* Le vaccin induit la formation d'antitoxine bêta lorsqu'il est injecté à des animaux qui ne possèdent pas cette antitoxine.

*Type D.* Le vaccin induit la formation d'antitoxine epsilon lorsqu'il est injecté à des animaux qui ne possèdent pas cette antitoxine.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 animaux appartenant à l'une des espèces auxquelles le vaccin est destiné et qui n'ont pas été vaccinés contre *C. perfringens*. Administrez à chacun d'eux, par une voie recommandée, 2 fois la plus forte dose recommandée de vaccin. Observez les animaux au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Toxicité résiduelle**. Utilisez 5 souris pesant chacune de 17-22 g. Injectez à chacune d'elles, par voie sous-cutanée, 0,5 mL du vaccin. Observez les animaux au moins une fois par jour pendant 7 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-5. **Activité**

Administrez par voie sous-cutanée et par sujet à au moins 10 lapins en bonne santé, âgés de 3 à 6 mois, une quantité de vaccin qui n'est pas supérieure à la dose minimale indiquée sur l'étiquette comme première dose. 21 à 28 jours plus tard, administrez aux mêmes animaux une quantité de vaccin qui n'est pas supérieure à la dose minimale indiquée sur l'étiquette comme seconde dose. 10 à 14 jours après la seconde vaccination, saignez les lapins et mélangez les sérums.

*Type B.* Le vaccin satisfait à l'essai si l'activité du mélange des sérums récoltés n'est pas inférieure à 10 UI d'antitoxine bêta ni à 5 UI d'antitoxine epsilon par millilitre.

*Type C.* Le vaccin satisfait à l'essai si l'activité du mélange des sérums récoltés n'est pas inférieure à 10 UI d'antitoxine bêta par millilitre.

*Type D.* Le vaccin satisfait à l'essai si l'activité du mélange des sérums récoltés n'est pas inférieure à 5 UI d'antitoxine epsilon par millilitre.

3-5-1. *Etalon international d'immunosérum Clostridium perfringens bêta*

L'Unité Internationale correspond à l'activité neutralisante spécifique à l'égard de la toxine bêta de *C. perfringens* contenue dans une quantité donnée de l'étalon international constitué par du sérum desséché de cheval immunisé. La correspondance entre l'Unité Internationale et la préparation étalon internationale est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

3-5-2. *Etalon international d'immunosérum Clostridium perfringens epsilon*

L'Unité Internationale correspond à l'activité neutralisante spécifique à l'égard de la toxine epsilon de *C. perfringens* contenue dans une quantité donnée de l'étalon international constitué par du sérum desséché de cheval immunisé. La correspondance entre l'Unité Internationale et la préparation étalon internationale est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

L'activité du mélange de sérums prélevés sur lapins est évaluée par détermination de la quantité permettant d'assurer la protection de souris ou d'autres animaux appropriés contre les effets toxiques d'une dose donnée de toxine bêta ou de toxine epsilon de *C. perfringens*. Cette quantité est comparée à celle d'une préparation de référence d'immunosérum Clostridium perfringens bêta ou epsilon suivant le cas, étalonnée en Unités Internationales, nécessaire pour assurer la même protection. Le titrage biologique exige l'emploi d'une préparation appropriée de toxine bêta ou de toxine epsilon de *C. perfringens*, destinée à servir de toxine d'épreuve. La dose de toxine d'épreuve est déterminée par rapport à la préparation de référence appropriée ; l'activité du sérum à examiner est déterminée par rapport à l'activité de la préparation de référence appropriée à l'aide de la toxine d'épreuve appropriée.

Le *sérum composé de lapin anticlostridies PBR* convient comme sérum de référence.

3-5-3. *Préparation de la toxine d'épreuve*. Préparez la toxine d'épreuve en milieu liquide à partir du filtrat stérile d'une culture jeune de *C. perfringens* type B, C ou D suivant le cas et

desséchez-la par une méthode appropriée. Utilisez une toxine bêta ou epsilon suivant le cas. Choisissez la toxine d'épreuve en déterminant sur souris la dose L+ et la $DL_{50}$ pour la toxine bêta et la dose L+/10 et la $DL_{50}$ pour la toxine epsilon, la période d'observation étant de 72 h.

La toxine bêta appropriée contient au moins une dose L+ dans 0,2 mg et au moins 25 $DL_{50}$ dans une dose L+. La toxine epsilon appropriée contient au moins une dose L+/10 dans 0,005 mg et au moins 20 $DL_{50}$ dans une dose L+/10.

3-5-4. *Détermination de la dose d'épreuve de toxine*. Préparez une solution de la préparation de référence dans un liquide approprié de façon qu'elle contienne 5 UI/mL dans le cas de la préparation de référence d'immunosérum Clostridium perfringens bêta et 0,5 UI/mL dans le cas de la préparation de référence d'immunosérum Clostridium perfringens epsilon. Préparez une solution de la toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon que 1 mL en contienne une quantité exactement connue, par exemple 10 mg dans le cas de la toxine bêta et par exemple 1 mg dans le cas de la toxine epsilon. Préparez des mélanges de solution de la préparation de référence et de solution de toxine d'épreuve de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de solution de préparation de référence et une quantité variable de solution de toxine d'épreuve, puis complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer les mélanges à température ambiante, pendant 30 min. Utilisez pour chaque mélange un groupe d'au moins 2 souris pesant chacune de 17-22 g. Injectez à chacune d'elles, par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, 0,5 mL du mélange attribué à son groupe. Observez les souris pendant 72 h. Si toutes les souris meurent, la quantité de toxine présente dans 0,5 mL du mélange dépasse la dose d'épreuve. Si aucune des souris ne meurt, la quantité de toxine présente dans 0,5 mL du mélange est inférieure à la dose d'épreuve. Préparez de nouveaux mélanges de façon qu'ils contiennent chacun dans 5,0 mL, 2,0 mL de solution de préparation de référence et une quantité variable de solution de toxine d'épreuve appartenant à une série dont chaque concentration diffère l'une de l'autre de 20 pour cent au plus et qui recouvre le point final présumé. Laissez reposer les mélanges à température ambiante, pendant 30 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, 0,5 mL du mélange attribué à son groupe. Observez les souris pendant 72 h. Répétez la détermination au moins une fois et additionnez les résultats des essais effectués avec les mélanges de même composition, de façon à obtenir une série de totaux dont chacun représente la mortalité due à un mélange donné.

La dose d'épreuve de toxine correspond à la quantité présente dans 0,5 mL du mélange qui provoque la mort de la moitié des souris auxquelles il a été inoculé.

3-5-5. *Détermination de l'activité du sérum prélevé sur lapins*

*Essai préliminaire.* Dissolvez une quantité de la toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon que 2,0 mL contiennent 10 doses d'épreuve (solution de la toxine d'épreuve). Préparez une série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et du sérum à examiner de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de solution de toxine d'épreuve et une quantité variable du sérum à examiner. Complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer les mélanges à température ambiante, pendant 30 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles, par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, 0,5 mL du mélange attribué à son groupe. Observez les souris pendant 72 h. Si aucune souris ne meurt, 0,5 mL du mélange contient plus de 1 UI d'antitoxine bêta ou 0,1 UI d'antitoxine epsilon et si toutes les souris meurent, 0,5 mL du mélange contient moins de 1 UI d'antitoxine bêta ou 0,1 UI d'antitoxine epsilon.

*Essai définitif.* Préparez une série de mélanges de solution de toxine d'épreuve et du sérum à examiner de façon qu'ils contiennent chacun dans 5,0 mL, 2,0 mL de solution de toxine d'épreuve et une quantité variable du sérum à examiner appartenant à une série dont chaque concentration diffère l'une de l'autre de 20 pour cent au plus et qui recouvre le point final présumé, quantités déterminées dans l'essai préliminaire. Préparez d'autres mélanges de solution de toxine d'épreuve et de solution de la préparation de référence de façon qu'ils contiennent chacun dans 5,0 mL, 2,0 mL de solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de préparation de référence afin de vérifier la dose d'épreuve de toxine. Laissez reposer les mélanges à température ambiante, pendant 30 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 souris pour chaque mélange et procédez comme indiqué dans l'essai préliminaire.

*Antitoxine bêta.* Le mélange à examiner qui contient 1 UI dans 0,5 mL est celui qui provoque la mort du même ou presque du même nombre de souris que le mélange de référence contenant 1 UI dans 0,5 mL.

*Antitoxine epsilon.* Le mélange à examiner qui contient 0,1 UI dans 0,5 mL est celui qui provoque la mort du même ou presque du même nombre de souris que le mélange de référence contenant 0,1 UI dans 0,5 mL. Répétez la détermination au moins une fois et calculez la moyenne de tous les résultats significatifs. L'essai n'est valable que si le résultat obtenu avec la préparation de référence ne diffère pas de plus de 20 pour cent de la valeur escomptée.

Les limites de confiance ($P = 0,95$) sont estimées comme suit :

- 85 pour cent et 114 pour cent lorsque 2 animaux sont utilisés par dose,
- 91,5 pour cent et 109 pour cent lorsque 4 animaux sont utilisés par dose,
- 93 pour cent et 108 pour cent lorsque 6 animaux sont utilisés par dose.

4. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- s'il s'agit d'une anatoxine ou d'un vaccin préparé à partir de la culture entière inactivée ou d'un mélange des deux,
- pour chaque espèce cible, la réponse immunitaire induite par le vaccin (par exemple, production d'anticorps, protection contre l'infection ou contre la maladie).



**01/2008:0364**

# VACCIN DE CLOSTRIDIUM SEPTICUM POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Vaccinum Clostridii septici ad usum veterinarium

1. DÉFINITION

Le vaccin de Clostridium septicum pour usage vétérinaire est préparé à partir d'une culture d'une souche convenable de *Clostridium septicum* en milieu liquide.

La culture entière ou son filtrat ou un mélange des deux est inactivé pour éliminer l'effet toxique en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des animaux et/ou pour la protection passive de leur progéniture contre les maladies causées par *C. septicum*.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

*C. septicum* utilisé pour la production est multiplié dans un milieu liquide approprié. L'anatoxine ou les cultures inactivées obtenues peuvent être additionnées d'un adjuvant approprié.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*
Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis à vis des animaux auxquels il est destiné. Dans ce dernier cas, il convient de démontrer pour chaque espèce cible que le vaccin, lorsqu'il est administré selon le schéma recommandé, induit une réponse immunitaire (par exemple, induction d'anticorps) en conformité avec les indications données pour le produit.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Toxicité résiduelle**. Un essai de détoxification est effectué immédiatement après le procédé de détoxification et, lorsqu'il y a un risque de réversibilité à la toxine, un deuxième essai est effectué à un stade aussi avancé que possible de la préparation du vaccin. L'essai de toxicité résiduelle (section 3-4) peut ne pas être effectué par le fabricant.

2-3-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-5) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale.

Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité et qui a été démontré satisfaisant en ce qui concerne le pouvoir immunogène chez la ou les espèces cibles. L'essai suivant peut être effectué après qu'il a été établi qu'il y a une corrélation satisfaisante avec l'essai décrit sous Activité (section 3-5).

Vaccinez des lapins comme décrit sous Activité et préparez des échantillons de sérum. Déterminez le taux d'anticorps dirigés contre la toxine de *C. septicum* dans les sérums individuels, par une méthode appropriée telle qu'une méthode immunochimique (*2.7.1*) ou par neutralisation en culture cellulaire. Utilisez un sérum de référence homologue étalonné en Unités Internationales d'antitoxine de *C. septicum*. Le *sérum composé de lapin anticlostridries PBR* convient comme sérum de référence. Le vaccin satisfait à l'essai si le taux d'anticorps n'est pas inférieur à celui trouvé pour un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité et qui a été démontré satisfaisant en ce qui concerne le pouvoir immunogène chez la ou les espèces cibles.

Vaccins

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le vaccin induit la formation d'antitoxine de *C. septicum* lorsqu'il est injecté à des animaux qui ne possèdent pas cette antitoxine.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 animaux appartenant à l'une des espèces auxquelles le vaccin est destiné et qui n'ont pas été vaccinés contre *C. septicum*. Administrez à chacun d'eux, par une voie recommandée, 2 fois la plus forte dose de vaccin recommandée. Observez les animaux au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Toxicité résiduelle**. Utilisez 5 souris pesant chacune 17-22 g. Injectez à chacune d'elles, par voie sous-cutanée, 0,5 mL du vaccin. Observez les souris au moins une fois par jour pendant 7 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-5. **Activité**

Administrez par voie sous-cutanée et par sujet à au moins 10 lapins en bonne santé, âgés de 3 à 6 mois, une quantité de vaccin qui n'est pas supérieure à la dose minimale indiquée sur l'étiquette comme première dose. 21 à 28 jours plus tard, administrez aux mêmes animaux une quantité de vaccin qui n'est pas supérieure à la dose minimale indiquée sur l'étiquette comme seconde dose. 10 à 14 jours après la seconde vaccination, saignez les lapins et mélangez les sérums.

Le vaccin satisfait à l'essai si l'activité du mélange des sérums récoltés n'est pas inférieure à 2,5 UI d'antitoxine par millilitre.

L'Unité Internationale correspond à l'activité neutralisante spécifique à l'égard de la toxine de *C. septicum*, contenue dans une quantité donnée de l'étalon international constitué par du sérum desséché de cheval immunisé. La correspondance entre l'Unité Internationale et la préparation étalon internationale est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

L'activité du mélange de sérums prélevés sur lapins est évaluée par détermination de la quantité permettant d'assurer la protection de souris ou d'autres animaux appropriés contre les effets toxiques d'une dose donnée de toxine de *C. septicum*. Cette dose est comparée avec la quantité d'une préparation de référence d'immunosérum Clostridium septicum, étalonnée en Unités Internationales, nécessaire pour assurer la même protection. Le titrage biologique exige l'emploi d'une préparation appropriée de toxine de *C. septicum* destinée à servir de toxine d'épreuve. La dose de toxine d'épreuve est déterminée par rapport à la préparation de référence ; l'activité du sérum à examiner est déterminée par rapport à l'activité de la préparation de référence à l'aide de la toxine d'épreuve.

Le *sérum composé de lapin anticlostridries PBR* convient comme sérum de référence.

3-5-1. *Préparation de la toxine d'épreuve*. Préparez la toxine d'épreuve à partir du filtrat stérile d'une culture de 1 à 3 jours de *C. septicum* en milieu liquide et desséchez-la par une méthode appropriée. Choisissez la toxine d'épreuve en déterminant sur souris la dose L+/5 et la $DL_{50}$, la période d'observation étant de 72 h.

La toxine appropriée contient au moins une dose L+/5 dans 1,0 mg et au moins 10 $DL_{50}$ dans une dose L+/5.

3-5-2. *Détermination de la dose d'épreuve de toxine*. Préparez une solution de la préparation de référence dans un liquide approprié de façon qu'elle contienne 1,0 UI/mL. Préparez une solution de toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon que 1 mL en contienne une quantité exactement connue, par exemple 4 mg. Préparez des mélanges de la solution de préparation de référence et de solution de toxine d'épreuve de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de solution de la préparation de référence (2 UI) et une quantité variable de solution de toxine d'épreuve, puis complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer les mélanges à température ambiante, pendant 60 min. Utilisez pour chaque mélange un groupe d'au moins 2 souris pesant chacune 17-22 g. Injectez à chacune d'elles, par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, 0,5 mL du mélange attribué à son groupe. Observez les souris pendant 72 h. Si toutes les souris meurent, la quantité de toxine présente dans 0,5 mL du mélange dépasse la dose d'épreuve. Si aucune des souris ne meurt, la quantité de toxine présente dans 0,5 mL du mélange est inférieure à la dose d'épreuve. Préparez de nouveaux mélanges de façon qu'ils contiennent chacun dans 5,0 mL, 2,0 mL de solution de la préparation de référence (2 UI) et une quantité variable de solution de toxine d'épreuve appartenant à une série dont chaque concentration diffère l'une de l'autre de 20 pour cent au plus et qui recouvre le point final présumé. Laissez reposer les mélanges à température ambiante, pendant 60 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles, par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, 0,5 mL du mélange attribué à son groupe. Observez les souris pendant 72 h. Répétez la détermination au moins une fois et additionnez les résultats des essais effectués avec les mélanges de même composition, de façon à obtenir une série de totaux dont chacun représente la mortalité due à un mélange d'une composition donnée.

La dose d'épreuve de toxine correspond à la quantité présente dans 0,5 mL du mélange qui provoque la mort de la moitié des souris auxquelles il a été inoculé.

3-5-3. *Détermination de l'activité du sérum prélevé sur lapins*

*Essai préliminaire.* Dissolvez une quantité de la toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon que 2,0 mL contiennent 10 doses d'épreuve (solution de toxine d'épreuve). Préparez une série de mélanges de solution de toxine d'épreuve et du sérum à examiner de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de solution de toxine d'épreuve et une quantité variable du sérum à examiner. Complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer les mélanges à température ambiante, pendant 60 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles, par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, 0,5 mL du mélange attribué à son groupe. Observez les souris pendant 72 h. Si aucune souris ne meurt, 0,5 mL du mélange contient plus de 0,2 UI. Si toutes les souris meurent, 0,5 mL du mélange contient moins de 0,2 UI.

*Essai définitif.* Préparez une série de mélanges de solution de toxine d'épreuve et du sérum à examiner de façon qu'ils contiennent chacun dans 5,0 mL, 2,0 mL de solution de toxine d'épreuve et une quantité variable du sérum à examiner, appartenant à une série dont chaque concentration diffère l'une de l'autre de 20 pour cent au plus et qui recouvre le point final présumé, quantités déterminées dans l'essai préliminaire. Préparez d'autres mélanges de solution de toxine d'épreuve et de solution de la préparation de référence de façon qu'ils contiennent chacun dans 5,0 mL, 2,0 mL de solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de solution de la préparation de référence afin de vérifier la dose d'épreuve de toxine. Laissez reposer les mélanges à température ambiante, pendant 60 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 souris pour chaque mélange et procédez comme indiqué dans l'essai préliminaire. Le mélange à examiner qui contient 0,2 UI dans 0,5 mL est celui qui provoque la mort du même ou presque du même nombre de souris que le mélange de référence contenant 0,2 UI dans 0,5 mL. Répétez la détermination au moins une fois et calculez la moyenne de tous les résultats significatifs. L'essai n'est valable que si le résultat obtenu avec la préparation de référence ne diffère pas de plus de 20 pour cent de la valeur escomptée.

Les limites de confiance ($P$ = 0,95) sont estimées comme suit :

– 85 pour cent et 114 pour cent lorsque 2 animaux sont utilisés par dose,
– 91,5 pour cent et 109 pour cent lorsque 4 animaux sont utilisés par dose,
– 93 pour cent et 108 pour cent lorsque 6 animaux sont utilisés par dose.

4. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– s'il s'agit d'une anatoxine ou d'un vaccin préparé à partir de la culture entière inactivée ou d'un mélange des deux,
– pour chaque espèce cible, la réponse immunitaire induite par le vaccin (par exemple, production d'anticorps, protection contre l'infection ou contre la maladie).

**01/2008:0959**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA BRONCHITE INFECTIEUSE AVIAIRE

## Vaccinum bronchitidis infectivae aviariae inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la bronchite infectieuse aviaire est une préparation de une ou plusieurs souches appropriées de un ou plusieurs sérotypes de virus de la bronchite infectieuse aviaire, inactivés en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à la protection des oiseaux contre la chute qualitative ou quantitative de ponte ; dans le cas de vaccins destinés à protéger également contre les signes respiratoires, il est nécessaire d'effectuer, en plus de l'essai décrit sous Activité, un essai supplémentaire pour démontrer l'efficacité.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est cultivé sur oeufs embryonnés ou sur des cultures cellulaires. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Oeufs de poule embryonnés**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poule embryonnés, ils proviennent d'un élevage sain.

2-2-2. **Cultures cellulaires**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des cultures cellulaires, elles satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *LOTS DE SEMENCE*

2-3-1. **Agents étrangers**. Le lot de semence primaire satisfait à l'essai des agents étrangers dans les lots de semence (*2.6.24*). Lors de ces essais sur le lot de semence primaire, utilisez des organismes n'ayant pas subi, en début d'essai, plus de 5 passages depuis le lot de semence primaire.

2-4. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des oiseaux auxquels il est destiné.

L'essai décrit ci-après sous Pouvoir immunogène (section 2-4-1) peut être utilisé pour établir l'efficacité.

2-4-1. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des poulets provenant d'un élevage exempt de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*) et pour chacun des sérotypes présents dans le vaccin.

Utilisez pour chaque essai 4 groupes d'au moins 30 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*), traité comme suit :

Groupe A : témoins non vaccinés.

Groupe B : vaccinés avec le vaccin inactivé de la bronchite infectieuse aviaire.

Groupe C : vaccinés avec le vaccin vivant de la bronchite infectieuse aviaire et avec le vaccin inactivé de la bronchite infectieuse aviaire selon le schéma recommandé.

Groupe D : vaccinés avec le vaccin vivant de la bronchite infectieuse aviaire.

Surveillez la production et la qualité d'oeufs de tous les poulets depuis le début de la ponte jusqu'à au moins 4 semaines après l'épreuve virulente. Au moment du pic de ponte, administrez à tous les groupes une quantité de virus de la bronchite infectieuse aviaire, suffisante pour causer une chute de ponte ou une baisse de qualité pendant 3 semaines consécutives durant les 4 semaines qui suivent l'épreuve virulente. L'essai n'est valable que si dans le groupe A, il y a une chute de production d'oeufs, comparée au niveau normal noté avant l'épreuve virulente, d'au moins 35 pour cent dans le cas d'une épreuve avec une souche de type Massachusetts ; s'il est nécessaire d'effectuer l'épreuve avec une souche d'un autre sérotype pour laquelle il existe des données écrites qui démontrent que la souche ne produira pas une chute de ponte de 35 pour cent, l'épreuve doit produire une chute de ponte en rapport avec les données écrites et, dans tous les cas, d'au moins 15 pour cent. Le vaccin satisfait à l'essai s'il y a une amélioration significative dans la quantité ou la qualité de production d'oeufs du groupe C comparé au groupe D et du groupe B comparé au groupe A.

2-5. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-5-1. **Virus vivant résiduel**. Un essai d'enrichissement en virus infectieux résiduel de la bronchite infectieuse aviaire est effectué sur chaque lot d'antigène immédiatement après l'inactivation et sur le vaccin final en vrac ou, si le vaccin contient un adjuvant, sur l'antigène ou le mélange d'antigènes en vrac immédiatement avant l'addition d'adjuvant ; l'essai est effectué sur des oeufs de poule embryonnés provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) ou sur des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*), en choisissant le système le plus sensible pour la souche de virus vaccinal. La quantité de récolte virale inactivée utilisée correspond à au moins 10 doses de vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté.

2-5-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-6) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Administrez par voie intramusculaire 1 dose de vaccin à 10 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*), d'âge compris entre 2 semaines et l'âge minimal de vaccination indiqué ; maintenez 5 poulets de même origine comme témoins non vaccinés. Prélevez un échantillon de sérum sur chaque poulet juste avant l'administration du vaccin et après le délai défini lors de l'essai du vaccin de référence. Déterminez le titre en anticorps de chaque sérum et pour chaque sérotype contenu dans le vaccin, par un essai sérologique approprié, par exemple la séroneutralisation. L'essai n'est valable que si les échantillons de sérum prélevés sur les témoins non vaccinés et sur les poulets juste avant la vaccination ne contiennent pas d'anticorps spécifiques détectable. Le vaccin satisfait à l'essai si les taux d'anticorps obtenus ne sont pas inférieurs de façon significative à ceux obtenus avec un lot ayant donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le vaccin stimule la formation d'anticorps dirigés contre chaque sérotype de virus de la bronchite infectieuse aviaire présent dans le vaccin lorsqu'il est injecté à des poulets dépourvus de ces anticorps, et ces anticorps sont détectables par neutralisation du virus.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 10 poulets âgés de 14 à 28 jours et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez à chacun d'eux par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les poulets au moins une fois par jour pendant 21 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des poulets ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Virus vivant résiduel**. La recherche de virus vivant résiduel est effectuée pour confirmer l'inactivation du virus de la bronchite infectieuse aviaire.

A. Pour le vaccin préparé à partir de souches de virus adaptées à la croissance sur embryon, injectez les 2/5$^{e}$ d'une dose de vaccin dans la cavité allantoïdienne de 10 oeufs de poule embryonnés âgés de 9 à 11 jours provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*), et placez-les en incubation. Observez-les pendant 5 à 6 jours et recueillez séparément le liquide allantoïdien des oeufs contenant des embryons vivants et celui des oeufs contenant des embryons morts, à l'exception de ceux qui meurent dans les 24 h suivant l'injection. Examinez tous les embryons qui meurent au-delà des 24 h suivant l'injection ou qui survivent pendant 5 à 6 jours pour détecter d'éventuelles anomalies. Aucune mort ou anomalie imputable au vaccin n'est observée.

Injectez 0,2 mL du liquide allantoïdien recueilli sur les oeufs contenant des embryons vivants dans la cavité allantoïdienne de 10 oeufs de poule embryonnés âgés de 9 à 11 jours, provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) et 0,2 mL du liquide recueilli sur les oeufs contenant des embryons morts dans 10 oeufs semblables, et placez en incubation pendant 5 à 6 jours. Examinez tous les embryons qui meurent au-delà des 24 h suivant l'injection ou qui survivent pendant 5 à 6 jours pour détecter d'éventuelles anomalies. Si plus de 20 pour cent des embryons meurent pendant l'une ou l'autre des 2 phases de l'essai, répétez l'essai à partir de cette phase. Le vaccin satisfait à l'essai si aucune mort ou anomalie imputable au vaccin n'est observée.

B. Pour le vaccin préparé à partir de souches adaptées à la croissance sur culture cellulaire, inoculez 10 doses de vaccin à des cultures cellulaires appropriées. Si le vaccin contient un adjuvant huileux, éliminez celui-ci par une méthode appropriée. Faites incuber à 38 ± 1 °C pendant 7 jours. Effectuez un passage sur de nouvelles cultures cellulaires et faites incuber à 38 ± 1 °C pendant 7 jours. Le vaccin satisfait à l'essai si les cultures cellulaires ne présentent pas de signes d'infection.

3-5. **Agents étrangers**. Utilisez les poulets de l'essai d'innocuité. 21 jours après l'administration de la double dose de vaccin, injectez 1 dose de vaccin à chaque poulet, par la même voie. 2 semaines plus tard, recueillez des échantillons de sérum sur chaque poulet et effectuez des essais d'anticorps contre les agents suivants par les méthodes décrites dans le chapitre général *5.2.2. Elevages de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés pour la production et le contrôle de qualité des vaccins* : virus de l'encéphalomyélite aviaire, virus de la leucose aviaire, virus de la maladie des oeufs hardés, virus de la bursite infectieuse aviaire, virus de la laryngotrachéite infectieuse aviaire, virus de la grippe de type A, virus de la maladie de Marek, virus de la pseudopeste aviaire (maladie de Newcastle). Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne stimule pas la formation d'anticorps contre ces agents.

3-6. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai du Pouvoir immunogène (section 2-4-1) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

4. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique si la souche vaccinale est adaptée ou non à la croissance sur embryon ou sur culture cellulaire.

**01/2008:0960**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA BURSITE INFECTIEUSE AVIAIRE

## Vaccinum bursitidis infectivae aviariae inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la bursite infectieuse aviaire est une préparation d'une souche appropriée du virus de la bursite infectieuse aviaire, type 1, inactivé en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Le vaccin est destiné aux reproducteurs du poulet pour protéger leur descendance de la bursite infectieuse aviaire.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poule embryonnés ou en cultures cellulaires. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Oeufs de poule embryonnés**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poule embryonnés, ils proviennent d'élevage sains.

Vaccins

2-2-2. **Cultures cellulaires**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des cultures cellulaires, elles sont conformes aux spécifications pour les cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *LOTS DE SEMENCE*

2-3-1. **Agents étrangers**. Le lot de semence primaire satisfait à l'essai des agents étrangers dans les lots de semence (*2.6.24*). Lors de ces essais sur le lot de semence primaire, utilisez des organismes n'ayant pas subi, en début d'essai, plus de 5 passages depuis le lot de semence primaire.

2-4. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il est démontré que le vaccin possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des oiseaux auxquels il est destiné.

L'essai décrit ci-après sous Pouvoir immunogène (2-4-1) peut être utilisé pour établir l'efficacité.

2-4-1. **Pouvoir immunogène**. Effectuez un essai pour chacune des voies d'administration et des méthodes d'administration recommandées en utilisant dans chaque cas des poulets qui ont l'âge minimal recommandé pour la vaccination (proches de l'âge de ponte) et issus d'un élevage exempt de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*). La dose de vaccin administrée à chaque poulet ne contient pas plus de l'activité minimale qui sera indiquée sur l'étiquette.

Si un essai comportant une épreuve virulente doit être effectué, l'essai décrit ci-après peut être utilisé. Utilisez 2 groupes d'au moins 20 poules reproductrices, traités comme suit :

– groupe A : témoins non vaccinés ;
– groupe B : poules vaccinées avec le vaccin inactivé de la bursite infectieuse aviaire.

Des échantillons de sérum sont prélevés sur chaque poule témoin non vaccinée (groupe A) juste avant l'administration du vaccin, 4 à 6 semaines après l'injection, et au moment de la récolte des oeufs pour couvaison. Si un essai sérologique est utilisé pour la démonstration du pouvoir immunogène pour d'autres voies, les échantillons de sérum sont recueillis sur chaque poule vaccinée (groupe B) au moment de la récolte des oeufs pour couvaison. La réponse en anticorps est mesurée par un essai de séroneutralisation.

Les oeufs sont récoltés pour couvaison au moins 5 semaines après la vaccination et l'essai décrit ci-après est effectué sur des poulets âgés d'au moins 3 semaines provenant de cette récolte d'oeufs.

25 poulets provenant de poules vaccinées (du groupe B) et, comme témoins, 10 poulets du même élevage et du même âge provenant de poules non vaccinées (du groupe A) sont utilisés. Chacun d'eux reçoit par instillation oculaire une quantité d'une souche virulente du virus de la bursite infectieuse aviaire, suffisante pour produire des signes graves de la maladie, notamment des lésions de la bourse de Fabricius, chez tous les poulets non vaccinés. 3-4 jours après l'épreuve, la bourse de Fabricius est prélevée sur chaque poulet. Les bourses sont soumises à un examen histologique pour détecter tout signe d'infection et à un essai approprié afin de détecter la présence éventuelle d'antigène de la bursite infectieuse aviaire. Le vaccin satisfait à l'essai si au plus 3 des poulets provenant de poules du groupe B présentent des signes de bursite infectieuse aviaire. L'essai n'est valable que si tous les poulets provenant de poules du groupe A présentent des signes de bursite infectieuse aviaire.

S'il y a plus d'une voie d'administration recommandée, l'essai décrit sous Activité est effectué en même temps que l'essai du pouvoir immunogène décrit ci-dessus avec des groupes différents de poulets pour chaque voie recommandée. La réponse sérologique des poulets inoculés par des voies autres que celle utilisée dans l'essai du pouvoir immunogène n'est pas inférieure, de façon significative, à celle du groupe vacciné par cette voie.

2-5. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-5-1. **Virus vivant résiduel**. Pour confirmer l'inactivation, un essai d'enrichissement en virus infectieux résiduel de la bursite infectieuse aviaire est effectué sur chaque lot d'antigène immédiatement après l'inactivation ; l'essai est effectué sur des oeufs de poule embryonnés ou sur des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*), en choisissant le système le plus sensible pour la souche de virus vaccinal. La quantité de récolte virale inactivée utilisée dans cet essai correspond à au moins 10 doses de vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté.

2-5-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-6) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé est effectué, les critères d'acceptation étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Utilisez au moins 10 poulets, âgés de 14-28 jours et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Inoculez à chacun d'eux 1 dose de vaccin, par l'une des voies recommandées. Après 4-6 semaines, recueillez des échantillons de sérum sur chaque animal et sur 10 animaux témoins non vaccinés de même âge et de même origine. Mesurez la réponse en anticorps par un essai de séroneutralisation. L'essai n'est pas valable si le sérum des animaux non vaccinés contient des anticorps spécifiques. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre moyen en anticorps des sérums provenant d'animaux vaccinés est supérieur ou égal aux titres obtenus avec un lot ayant donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Pouvoir immunogène (section 2-4-1).

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le vaccin stimule la formation d'anticorps dirigés contre le virus de la bursite infectieuse aviaire, type 1, lorsqu'il est injecté à des poulets dépourvus de ces anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 10 poulets âgés de 14-28 jours, provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez à chaque poulet par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les animaux au moins 1 fois par jour pendant au moins 21 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun oiseau ne présente de signes cliniques notables de la maladie, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Virus vivant résiduel**. La recherche de virus vivant résiduel est effectuée pour confirmer l'inactivation du virus de la bursite infectieuse aviaire, type 1.

A. Pour le vaccin préparé à partir de souches de virus adaptées à la croissance sur embryon, administrez $2/5^{e}$ d'une dose dans la cavité allantoïdienne ou sur la membrane chorio-allantoïdienne de 10 oeufs de poules, âgés de 9-11 jours et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*), et placez-les en incubation. Observez-les au moins 1 fois par jour pendant 6 jours et recueillez séparément le liquide allantoïdien ou les membranes des oeufs contenant des embryons vivants, et le liquide allantoïdien ou les membranes des oeufs contenant des embryons morts, à l'exclusion de ceux qui meurent de causes non spécifiques dans les 24 h suivant l'injection.

Utilisez 10 oeufs, âgés de 9-11 jours et provenant d'un élevage EOPS, et injectez dans la cavité allantoïdienne ou sur la membrane chorio-allantoïdienne de chacun d'eux 0,2 mL du liquide allantoïdien ou des membranes chorio-allantoïdiennes broyées, recueillis sur les embryons vivants et à chacun de 10 autres oeufs semblables, 0,2 mL de liquide ou des membranes recueillis sur les embryons

Vaccins

morts et placez-les en incubation pendant 6 jours. Examinez chaque embryon pour détecter les lésions éventuelles dues à la bursite infectieuse aviaire.

Si plus de 20 pour cent des embryons meurent au cours d'une des parties de l'essai, répétez cette partie. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun signe de lésion de bursite infectieuse aviaire n'est détecté et si dans tout essai répété, au maximum 20 pour cent des embryons meurent de causes non spécifiques.

Des antibiotiques peuvent être utilisés dans l'essai pour empêcher toute infection bactérienne.

B. Pour le vaccin préparé à partir de souches adaptées à la croissance sur culture cellulaire, inoculez 10 doses de vaccin à des cultures cellulaires appropriées. Si le vaccin contient un adjuvant huileux, éliminez celui-ci par une méthode appropriée. Faites incuber à 38 ± 1 °C pendant 7 jours. Effectuez un passage sur de nouvelles cultures cellulaires et faites incuber à 38 ± 1 °C pendant 7 jours. Le vaccin satisfait à l'essai si les cultures cellulaires ne présentent pas de signes d'infection.

3-5. **Agents étrangers**. Utilisez 10 poulets âgés de 14-28 jours et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez à chacun de ces poulets par une voie recommandée une double dose de vaccin. 3 semaines plus tard, administrez 1 dose par la même voie. Recueillez des échantillons de sérum 2 semaines après sur chacun des poulets et effectuez des essais d'anticorps contre les agents suivants par les méthodes prescrites dans le chapitre général *5.2.2. Elevages de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés pour la production et le contrôle de qualité des vaccins* : virus de l'encéphalomyélite aviaire, virus de la leucose aviaire, virus de la maladie des oeufs hardés, virus de la bronchite infectieuse aviaire, virus de la laryngotrachéite infectieuse aviaire, virus de la grippe de type A, virus de la maladie de Marek, virus de la pseudopeste aviaire (maladie de Newcastle). Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne stimule pas la formation d'anticorps contre ces agents.

3-6. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-4-1) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

4. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique si la souche vaccinale est adaptée ou non à la croissance sur embryon ou sur culture cellulaire.

**01/2008:1101**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA CALICIVIROSE DU CHAT

## Vaccinum calicivirosis felinae inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la calicivirose du chat est une préparation soit d'une ou de plusieurs souches appropriées du calicivirus du chat, inactivées en maintenant des propriétés immunogènes appropriées, soit de fractions d'une ou de plusieurs souches du calicivirus du chat ayant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des chats contre la calicivirose du chat.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires. La récolte virale est inactivée ; le virus peut subir une fragmentation et les fragments être purifiés et concentrés. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des chats auxquels il est destiné.

L'essai décrit ci-après sous Pouvoir immunogène (section 2-3-1) peut être utilisé pour établir l'efficacité.

2-3-1. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des souches incorporées dans le vaccin et pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des chats âgés de 8-12 semaines. Le vaccin administré à chaque chat a une activité minimale.

Utilisez au moins 20 chats exempts d'anticorps dirigés contre le calicivirus du chat. Administrez le vaccin à au moins 10 chats, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 10 autres comme témoins. Après 4 semaines, soumettez tous les chats à une épreuve virulente en leur administrant par voie intranasale une quantité suffisante de suspension d'une forme virulente du calivirus du chat. Observez les chats au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de l'épreuve. Effectuez un lavage nasal chaque jour entre le 2$^{e}$ et le 14$^{e}$ jour afin de déterminer l'excrétion du virus. Relevez la température quotidiennement ainsi que les signes de maladie selon la grille de notation ci-après.

L'essai n'est pas valable si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, moins de 80 pour cent des chats témoins présentent des signes notables de la calicivirose du chat (fièvre, ulcères buccaux, troubles respiratoires). Le vaccin satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, la notation des chats vaccinés est inférieure de façon significative à celle des témoins.

| **Signes observés** | **Notation** |
|---|---|
| Mort | 10 |
| Etat dépressif | 2 |
| Température ≥ 39,5 °C | 1 |
| Température ≤ 37 °C | 2 |
| Ulcères (oraux ou du nez) | |
| – petits et peu nombreux | 1 |
| – importants et nombreux | 3 |
| Ecoulement nasal | |
| – léger | 1 |
| – important | 2 |
| Ecoulement oculaire | 1 |
| Perte de poids | 2 |
| Excrétion virale : | |
| ≤ 4 jours | 1 |
| 5-7 jours | 2 |
| > 7 jours | 3 |

2-4. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-4-1. **Virus vivant résiduel**. La recherche de calicivirus vivant résiduel est effectuée au moyen de 2 passages soit sur des cultures cellulaires du même type que celui qui a été utilisé dans la préparation du vaccin soit sur des cultures cellulaires démontrées au moins aussi sensibles ; la quantité de récolte virale inactivée utilisée dans cet essai correspond à au moins 25 doses de vaccin. La récolte virale inactivée satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté.

2-4-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-5) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé

approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Utilisez des groupes de 15 souris séronégatives. Administrez à chacune d'elles une moitié de la dose du vaccin et 7 jours plus tard, répétez l'administration. 21 jours après la première administration de vaccin, prélevez des échantillons de sang et déterminez le taux des anticorps dirigés contre le calicivirus du chat par un essai d'immunofluorescence pratiqué sur des mélanges de sérum de groupes de 3 souris. Le vaccin satisfait à l'essai si le taux d'anticorps n'est pas inférieur de façon significative à celui obtenu avec un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Injecté à des animaux exempts d'anticorps spécifiques dirigés contre le calicivirus du chat, le vaccin stimule la formation de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 chats âgés de 8-12 semaines, de préférence exempts d'anticorps dirigés contre le calicivirus du chat ou, dans des cas justifiés, utilisez des chats ayant un faible taux de ces anticorps, n'ayant pas été vaccinés contre la calicivirose du chat et pour lesquels l'administration du vaccin n'entraîne pas de réponse anamnestique. Administrez à chaque chat par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les chats au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des chats ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Inactivation**. Effectuez une recherche de calicivirus infectieux résiduel en utilisant 10 doses de vaccin et en faisant 2 passages soit sur des cultures cellulaires du même type que celui qui a été utilisé dans la préparation du vaccin soit sur des cultures cellulaires démontrées plus sensibles. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté. Si le vaccin contient un adjuvant qui interfère avec la réalisation de l'essai, séparez si possible l'adjuvant de la phase liquide par une méthode qui n'inactive pas le virus ni n'empêche autrement la détection de virus vivant.

3-5. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-1) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:2324**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA CHLAMYDIOSE DU CHAT

## Vaccinum chlamydiosidis felinae inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la chlamydiose du chat est une préparation d'une ou de plusieurs souches appropriées de *Chlamydophila felis*, inactivées par une méthode appropriée. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des chats.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

La semence est cultivée dans des oeufs de poules embryonnés provenant d'un élevage sain ou sur des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*). Si le vaccin contient plus d'une souche de la bactérie, les différentes souches sont cultivées et récoltées séparément. Les récoltes bactériennes sont inactivées par des méthodes validées appropriées. Les suspensions peuvent faire l'objet d'un traitement visant à fractionner les microorganismes, et les fractions peuvent être purifiées et concentrées. Le vaccin peut contenir des adjuvants.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant en ce qui concerne son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) chez les chats auxquels il est destiné.

L'essai ci-après du pouvoir immunogène (section 2-2-1) peut être utilisé lors de la démonstration de l'efficacité du vaccin.

2-2-1. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination, en utilisant dans chaque cas des chats qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination et qui sont exempts d'anticorps dirigés contre *C. felis*. Vaccinez 10 chats conformément au mode d'emploi et gardez 10 chats comme témoins. Au plus tard 4 semaines après la dernière administration du vaccin, administrez à chaque chat, par une voie appropriée, une quantité d'une souche virulente de *C. felis* suffisante pour provoquer chez des chats réceptifs des signes typiques de maladie, comme une conjonctivite et un écoulement nasal. Placez les chats en observation pendant 28 jours. Lorsqu'une réduction de l'excrétion de chlamydophila est revendiquée, effectuez un lavage nasal et/ou un écouvillonage conjonctival les 7$^{e}$, 14$^{e}$, 17$^{e}$, 21$^{e}$, 24$^{e}$ et 28$^{e}$ jours après l'épreuve virulente afin de déterminer l'excrétion de chlamydophila. La durée d'excrétion est réduite de façon significative chez les animaux vaccinés par rapport aux animaux témoins. Relevez quotidiennement la température et les signes cliniques selon une grille de notation appropriée. Le vaccin satisfait à l'essai si le score des chats vaccinés est inférieur de façon significative à celui des témoins.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Essai d'activité à effectuer sur chaque lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'activité (section 3-5) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Si l'essai n'est pas effectué sur un lot, une méthode alternative validée est utilisée, avec des critères d'acceptation fixés par rapport à un lot de vaccin ayant donné des résultats satisfaisants dans l'essai d'activité (section 3-5). L'essai ci-après peut être utilisé.

Injectez une dose appropriée par une voie appropriée à 5 animaux séronégatifs (chats ou animaux d'une autre espèce appropriée). Si le schéma de vaccination indiqué sur l'étiquette comporte une injection de rappel, un rappel de vaccination peut également être fait lors de cet essai s'il a été démontré que cela constitue un système d'essai de sensibilité appropriée. Avant la vaccination et à un temps donné habituellement compris entre 14 et 21 jours à compter de la dernière injection, effectuez un prélèvement sanguin sur chaque animal et préparez des échantillons de sérum. Déterminez séparément pour chaque sérum, par un essai approprié tel que le titrage immunologique à enzyme conjuguée (*2.7.1*), le titre en anticorps dirigés contre chaque souche indiquée sur l'étiquette. Le vaccin satisfait à l'essai si les taux d'anticorps obtenus ne sont pas significativement inférieurs à ceux obtenus avec un lot ayant donné des résultats satisfaisants dans l'essai d'activité (section 3-5).

2-3-2. **Endotoxines bactériennes**. Un essai des endotoxines bactériennes (*2.6.14*) est effectué sur le lot final ou, si la nature de l'adjuvant le rend impossible, sur l'antigène en vrac ou le mélange d'antigènes en vrac immédiatement avant l'addition de l'adjuvant. La quantité maximale acceptable en endotoxines bactériennes est la quantité obtenue sur un lot de vaccin ayant donné des résultats satisfaisants dans l'essai d'innocuité (section 3-4). La méthode choisie pour déterminer la quantité maximale acceptable en endotoxines bactériennes sera utilisée ultérieurement pour le contrôle de chaque lot.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le vaccin stimule la production d'anticorps dirigés contre chacune des souches de *C. felis* présentes dans le vaccin lorsqu'il est injecté à des animaux séronégatifs.

3-2. **Chlamydophila vivantes résiduelles**. Le vaccin satisfait à un essai approprié de recherche de chlamydophila vivantes résiduelles.

3-3. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-4. **Innocuité**. Utilisez 2 chats qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination et qui n'ont pas d'anticorps dirigés contre *C. felis*. Administrez à chaque chat, par une voie recommandée, une double dose de vaccin. Placez les chats en observation et examinez-les au moins 1 fois par jour pendant 2 semaines. Le vaccin satisfait à l'essai si les chats demeurent en bonne santé et s'il ne se produit aucune réaction locale ou générale anormale.

3-5. **Activité**. Le vaccin satisfait à l'essai du pouvoir immunogène (section 2-2-1).

**01/2008:0962**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA COLIBACILLOSE NÉONATALE DES PORCELETS

## Vaccinum colibacillosis fetus a partu recentis inactivatum ad suem

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la colibacillose néonatale des porcelets est une préparation à base de cultures d'une ou de plusieurs souches appropriées d'*Escherichia coli*, porteuses d'une ou de plusieurs adhésines ou entérotoxines. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des truies ou cochettes pour la protection passive de leurs nouveau-nés contre la colibacillose entérique et administrés par injection.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Les souches de *E. coli* utilisées pour la production du vaccin sont cultivées séparément dans un milieu approprié. Les cellules ou les toxines sont traitées de façon à les rendre inoffensives tout en maintenant des propriétés immunogènes appropriées et elles sont mélangées. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il est démontré que les souches de *E. coli* utilisées dans la préparation du vaccin sont satisfaisantes en ce qui concerne l'expression des antigènes et que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des truies et des cochettes auxquelles il est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Expression des antigènes (section 2-2-1.), Innocuité (2-2-2.) et Pouvoir immunogène (section 2-2-3.) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-2-1. **Expression des antigènes**. L'expression des antigènes qui suscitent une réponse immunitaire protectrice est vérifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) effectuée sur l'antigène obtenu à partir de chaque souche vaccinale dans les conditions utilisées pour la production du vaccin.

2-2-2. **Innocuité**

2-2-2-1. *Essais de laboratoire*. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination. Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin.

Pour chaque essai, utilisez au minimum 10 truies gestantes n'ayant pas été vaccinées contre la colibacillose. Administrez à chaque truie une double dose de vaccin, puis une dose après l'intervalle recommandé. Observez les truies au moins une fois par jour jusqu'à la mise bas. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 2 h, 4 h et 6 h après, puis journellement pendant 4 jours ; notez pour chaque truie l'augmentation maximale de température.

Le vaccin satisfait à l'essai si :

- aucune des truies ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin,
- l'augmentation moyenne de la température corporelle de toutes les truies n'est pas supérieure à 1,5 °C et aucune truie ne présente une augmentation supérieure à 2 °C,
- et aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-2-2-2. *Essais sur le terrain*. Evaluez l'innocuité sur les mêmes porcs que ceux utilisés pour les essais sur le terrain. Effectuez l'essai sur au moins 3 groupes d'au moins 20 porcs chacun, et autant de groupes témoins d'au moins 10 porcs. Examinez le site d'injection après la vaccination pour rechercher les réactions locales. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, au moment où une augmentation de la température corporelle a été constatée lors de l'essai 2-2-2-1. le cas échéant, puis journellement pendant les 2 jours suivant la vaccination ; notez pour chaque porc l'augmentation maximale de température.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des porcs ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin, si l'augmentation moyenne de la température corporelle de tous les porcs n'est pas supérieure à 1,5 °C et aucun porc ne présente une augmentation supérieure à 2 °C.

2-2-3. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai à l'aide d'une souche d'épreuve représentant chaque type d'antigène contre lequel le vaccin doit protéger : si une seule souche présentant tous les antigènes n'est pas disponible, répétez l'essai avec différentes souches d'épreuve.

Effectuez chaque essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées. Le vaccin administré à chaque cochette a une activité minimale.

Utilisez au moins 8 cochettes réceptives aux infections par *E. coli* et exemptes d'anticorps dirigés contre les antigènes indiqués sur l'étiquette. Administrez le vaccin au hasard à au moins 4 d'entre elles, au stade de gestation prescrit, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 4 autres comme témoins. Dans les 12 h qui suivent la mise bas, prenez au moins 15 porcelets sains nés des cochettes vaccinées et 15 porcelets sains nés des cochettes témoins ; au minimum 3 porcelets doivent être prélevés dans chaque portée. Soumettez tous les porcelets à une épreuve virulente en leur administrant par voie orale une quantité suffisante d'une souche virulente d'*E. coli* dans les mêmes conditions pour les porcelets vaccinés et pour les témoins, avant ou après l'ingestion de colostrum. La souche utilisée ne doit pas être l'une de celles utilisées dans la production du vaccin. Replacez les porcelets près de leur mère et observez-les au moins une fois par jour pendant 8 jours.

Pour chaque jour, notez les signes cliniques de chaque porcelet et notez le score selon l'échelle suivante :

| | |
|---|---|
| 0 | aucun signe |
| 1 | diarrhée faible |
| 2 | diarrhée clairement présente (selles liquides) |
| 3 | mort |



Vaccins

Calculez les scores totaux pour chaque porcelet au cours des 8 jours.

L'essai n'est pas valable si moins de 40 pour cent des porcelets provenant des truies témoins meurent et si plus de 15 pour cent des porcelets provenant des truies témoins ne présentent pas de signes de la maladie. Le vaccin satisfait à l'essai s'il y a une diminution significative du score dans le groupe des porcelets issus des cochettes vaccinées par rapport au groupe correspondant issu des cochettes non vaccinées.

Pour certaines adhésines (par exemple F5 et F41), les données publiées indiquent qu'elles ne provoquent pas une mortalité élevée dans les conditions expérimentales. Si l'essai doit être effectué à l'aide d'une souche ayant de telles adhésines : l'essai n'est pas valable si moins de 70 pour cent des porcelets témoins présentent les signes attendus avec la souche d'épreuve ; le vaccin satisfait à l'essai s'il y a une diminution significative du score dans le groupe des porcelets issus des cochettes vaccinées par rapport au groupe correspondant issu des cochettes non vaccinés.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-4.) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Utilisez 7 porcs âgés d'au moins 3 semaines et exempts d'anticorps dirigés contre les antigènes cités sur l'étiquette. Vaccinez 5 porcs par la voie et selon le schéma recommandés et gardez-en 2 autres comme témoins. Ou bien, si la nature des antigènes permet d'obtenir des résultats reproductibles, un essai sur animaux de laboratoire (par exemple cobayes, souris, lapins ou rats) peut être effectué ; pour que l'essai soit valable, il peut être nécessaire d'utiliser plusieurs groupes dont chacun reçoit une dose différente. Pour chaque dose, effectuez l'essai comme suit. Vaccinez au moins 5 animaux par une seule injection d'une dose appropriée et gardez-en au moins 2 autres comme témoins. Si le schéma recommandé comporte une injection de rappel, un rappel de vaccination peut également être fait lors de cet essai s'il a été démontré que cela constitue un système d'essai de sensibilité appropriée. A un temps donné, entre 14-21 jours après la dernière injection, prélevez du sang de chaque animal et préparez des échantillons de sérum. Utilisez un essai validé approprié, tel que le titrage immunologique à enzyme conjuguée (*2.7.1*), pour mesurer la réponse en anticorps à chacun des antigènes indiqués sur l'étiquette. Le vaccin satisfait à l'essai si les taux d'anticorps obtenus chez les animaux vaccinés ne sont pas significativement inférieurs à ceux obtenus avec un lot ayant donné des résultats satisfaisants dans l'épreuve décrite sous Activité et il n'y a aucune augmentation significative du titre des anticorps chez les témoins.

S'il s'avère impossible d'obtenir des animaux exempts d'anticorps dirigés contre les antigènes cités sur l'étiquette, des animaux séropositifs peuvent être utilisés dans l'essai. Pendant le développement d'un essai avec des animaux séropositifs, une attention particulière est nécessaire pendant la validation du système d'essai afin de démontrer que l'essai a une sensibilité appropriée et afin d'établir les critères pour un lot conforme ou non conforme et pour la répétition de l'essai. Il est nécessaire de prendre en compte la gamme de titres possibles avant la vaccination et d'établir, par rapport à ces titres, l'augmentation minimale acceptable après la vaccination.

2-3-2. **Endotoxines bactériennes**. Un essai d'endotoxines bactériennes (*2.6.14*) est effectué sur chaque lot final ou, si la nature de l'adjuvant le rend impossible, sur l'antigène en vrac ou le mélange d'antigènes en vrac immédiatement avant l'addition de l'adjuvant. La teneur maximale acceptable en endotoxines bactériennes est celle trouvée pour un lot de vaccin qui a satisfait à l'essai d'innocuité 2-2-2-1. décrit sous Choix de la composition du vaccin, ou à l'essai d'innocuité décrit sous Essai, effectué en utilisant 10 porcelets. Lorsque ce dernier essai est utilisé, notez pour chaque porcelet l'augmentation maximale de température ; le vaccin satisfait à l'essai si l'augmentation moyenne de la température corporelle pour tous les porcelets n'est pas supérieure à 1,5 °C. La méthode choisie pour déterminer la teneur en endotoxines bactériennes présente dans le lot de vaccin utilisé dans l'essai d'innocuité afin de déterminer le taux maximal acceptable d'endotoxines est utilisée par la suite pour le contrôle des lots.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Chez les animaux exempts d'anticorps dirigés contre les antigènes indiqués sur l'étiquette, le vaccin stimule la formation de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 porcs de préférence exempts d'anticorps dirigés contre les antigènes indiqués sur l'étiquette ou dans les cas justifiés, utilisez des porcs présentant un faible taux de ces anticorps, n'ayant pas été vaccinés contre la colibacillose et pour lesquels l'administration du vaccin n'entraîne pas de réponse anamnestique. Administrez à chaque porc par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les porcs au moins une fois par jour pendant 14 jours. Enregistrez la température corporelle avant la vaccination, au moment de la vaccination, 2 h, 4 h et 6 h après, puis journellement pendant 2 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des porcs ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin ; il peut se produire une augmentation transitoire de la température corporelle qui ne dépasse pas 2 °C.

3-4. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai du pouvoir immunogène (section 2-2-3) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:0961**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA COLIBACILLOSE NÉONATALE DES RUMINANTS

## Vaccinum colibacillosis fetus a partu recentis inactivatum ad ruminantes

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la colibacillose néonatale des ruminants est une préparation à base de cultures d'une ou de plusieurs souches appropriées d'*Escherichia coli*, porteuses d'une ou de plusieurs adhésines ou entérotoxines. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des femelles pour la protection passive de leurs nouveau-nés contre la colibacillose entérique et administrés par injection.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Les souches de *E. coli* utilisées pour la production du vaccin sont cultivées séparément dans un milieu approprié. Les cellules ou les toxines sont traitées de façon à les rendre inoffensives tout en maintenant des propriétés immunogènes appropriées et elles sont mélangées. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il est démontré que les souches de *E. coli* utilisées dans la préparation du vaccin sont satisfaisantes en ce qui concerne l'expression des antigènes et que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des ruminants auxquels il est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Expression des antigènes (section 2-2-1), Innocuité (2-2-2) et Pouvoir immunogène (section 2-2-3) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-2-1. **Expression des antigènes**. L'expression des antigènes qui suscitent une réponse immunitaire protectrice est vérifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) effectuée sur l'antigène obtenu à partir de chaque souche vaccinale dans les conditions utilisées pour la production du vaccin.

2-2-2. **Innocuité**

2-2-2-1. *Essai de laboratoire*. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination et pour les animaux gestants de chacune des espèces auxquelles le vaccin est destiné. Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin.

Pour chaque essai, utilisez au minimum 10 animaux gestants n'ayant pas été vaccinés contre la colibacillose. Administrez à chaque animal une double dose de vaccin. Si le schéma de vaccination recommandé comprend l'administration d'une 2[nde] dose, administrez une dose supplémentaire à chaque animal après le délai indiqué. Observez les animaux au moins une fois par jour jusqu'à la mise bas. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 2 h, 4 h et 6 h après, puis journellement pendant 4 jours ; notez pour chaque animal l'augmentation maximale de température.

Le vaccin satisfait à l'essai si :

- aucun des animaux ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin,
- l'augmentation moyenne de la température corporelle de tous les animaux n'est pas supérieure à 1,5 °C et aucun animal ne présente une augmentation supérieure à 2 °C,
- et aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-2-2-2. *Essais sur le terrain*. L'innocuité est démontrée pendant les essais sur le terrain vis-à-vis de chaque espèce à laquelle le vaccin est destiné. Administrez à au moins 60 animaux provenant de 3 élevages différents la dose recommandée par la voie et selon le schéma recommandés et gardez-en au moins 30 autres provenant des mêmes élevages comme témoins. Observez les animaux au moins une fois par jour pendant 14 jours après la dernière administration.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si aucune hyperthermie supérieure à 1,5 °C n'est notée dans les 2 jours suivant l'administration de chaque dose vaccinale.

2-2-3. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai à l'aide d'une souche d'épreuve représentant chaque type d'antigène contre lequel le vaccin doit protéger : si une seule souche présentant tous les antigènes n'est pas disponible, répétez l'essai avec différentes souches d'épreuve. Effectuez chaque essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées pour la vaccination, en utilisant dans chaque cas des animaux de chacune des espèces auxquelles le vaccin est destiné. Le vaccin administré à chaque animal a une activité minimale.

Pour chaque essai, utilisez au moins 15 animaux exempts d'anticorps contre les antigènes indiqués sur l'étiquette. Vaccinez au hasard au moins 10 d'entre eux, au stade de gestation prescrit selon le schéma vaccinal recommandé et gardez-en au minimum 5 autres comme témoins. Collectez le colostrum de tous les animaux après la parturition et conservez les échantillons individuellement dans des conditions permettant de maintenir le taux d'anticorps. Prenez au moins 15 nouveau-nés n'ayant pas été allaités et maintenez-les dans un environnement les mettant à l'abri de germes entériques pathogènes. Affectez aux petits un échantillon de colostrum provenant d'au moins 10 mères vaccinées et d'au moins 5 animaux témoins. Après la naissance, nourrissez les petits avec l'échantillon de colostrum qui leur a été attribué. Après que les petits ont reçu le colostrum et dans les 12 h qui suivent la mise bas, soumettez-les à une épreuve virulente en leur administrant par voie orale une quantité suffisante de souche virulente de *E. coli* et observez-les au moins une fois par jour pendant 10 jours. La souche utilisée ne doit pas être l'une de celles utilisées dans la production du vaccin.

Pour chaque jour, notez les signes de chaque animal et notez le score selon l'échelle suivante :

0 aucun signe

1 diarrhée faible

2 diarrhée clairement présente (selles liquides)

3 mort

Calculez les scores totaux pour chaque animal au cours des 10 jours.

L'essai n'est pas valable si moins de 80 pour cent des animaux ayant reçu du colostrum provenant des témoins meurent ou présentent des signes de maladie grave. Le vaccin satisfait à l'essai s'il y a une diminution significative du score dans le groupe d'animaux ayant reçu du colostrum provenant des mères vaccinées par rapport au groupe correspondant ayant reçu du colostrum provenant des animaux non vaccinés.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-4) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Pour que l'essai soit valable, il peut être nécessaire d'utiliser plusieurs groupes dont chacun reçoit une dose différente. Pour chaque dose, effectuez l'essai comme suit. Utilisez au moins 7 animaux (par exemple lapins, cobayes, rats ou souris) exempts d'anticorps dirigés contre les antigènes indiqués sur l'étiquette. Vaccinez au moins 5 animaux par une seule injection d'une dose appropriée et gardez-en 2 autres comme témoins. Si le schéma recommandé comporte une injection de rappel, un rappel de vaccination peut également être fait lors de cet essai s'il a été démontré que cela constitue un système d'essai de sensibilité appropriée. A un temps donné, entre 14-21 jours après la dernière injection, prélevez du sang de chaque animal et préparez des échantillons de sérum. Utilisez un essai validé approprié, tel que le titrage immunologique à enzyme conjuguée (*2.7.1*), pour mesurer la réponse en anticorps à chacun des antigènes indiqués sur l'étiquette. Le vaccin satisfait à l'essai si les taux d'anticorps obtenus chez les animaux vaccinés ne sont pas significativement inférieurs à ceux obtenus avec un lot ayant donné des résultats satisfaisants dans l'épreuve décrite sous Activité et s'il n'y a aucune augmentation significative du titre des anticorps chez les témoins.

S'il s'avère impossible d'obtenir des animaux exempts d'anticorps dirigés contre les antigènes indiqués sur l'étiquette, des animaux séropositifs peuvent être utilisés dans l'essai. Pendant le développement d'un essai avec des animaux séropositifs, une attention particulière est nécessaire pendant la validation du système d'essai afin de démontrer que l'essai a une sensibilité appropriée et afin d'établir les critères pour un lot conforme ou non conforme et pour la répétition de l'essai. Il est nécessaire de prendre en compte la gamme de titres possibles avant la vaccination et d'établir, par rapport à ces titres, l'augmentation minimale acceptable après la vaccination.

2-3-2. **Endotoxines bactériennes**. Un essai d'endotoxines bactériennes (*2.6.14*) est effectué sur chaque lot final ou, si la nature de l'adjuvant le rend impossible, sur l'antigène en vrac ou le mélange d'antigènes en vrac immédiatement avant l'addition de l'adjuvant. La teneur maximale acceptable en endotoxines bactériennes est celle trouvée pour un lot de vaccin qui a satisfait à l'essai d'innocuité décrit sous Choix de la composition

du vaccin, ou à l'essai d'innocuité décrit sous Essai, effectué en utilisant 10 animaux. Lorsque ce dernier essai est utilisé, notez pour chaque animal l'augmentation maximale de température ; le vaccin satisfait à l'essai si l'augmentation moyenne de la température corporelle pour tous les animaux n'est pas supérieure à 1,5 °C. La méthode choisie pour déterminer la teneur en endotoxines bactériennes présente dans le lot de vaccin utilisé dans l'essai d'innocuité afin de déterminer le taux maximal acceptable d'endotoxines est utilisée par la suite pour le contrôle des lots.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Chez les animaux exempts d'anticorps dirigés contre les antigènes indiqués sur l'étiquette, le vaccin stimule la formation de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 animaux de l'une des espèces auxquelles le vaccin est destiné et de préférence exempts d'anticorps dirigés contre les antigènes indiqués sur l'étiquette ou dans les cas justifiés, utilisez des animaux présentant un faible taux de ces anticorps, n'ayant pas été vaccinés contre la colibacillose néonatale des ruminants et pour lesquels l'administration du vaccin n'entraîne pas de réponse anamnestique. Administrez à chaque animal par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les animaux au moins une fois par jour pendant 14 jours. Enregistrez la température corporelle avant la vaccination, au moment de la vaccination, 2 h, 4 h et 6 h après, puis journellement pendant 2 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin ; il peut se produire une augmentation transitoire de la température corporelle qui ne dépasse pas 2 °C.

3-4. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai du pouvoir immunogène (section 2-2-3) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:1360**

# VACCIN INACTIVÉ DE L'ACTINOBACILLOSE DU PORC

## Vaccinum actinobacillosidis inactivatum ad suem

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de l'actinobacillose du porc est une préparation qui contient un ou plusieurs des composants suivants : une ou plusieurs souches appropriées d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* inactivées ; des toxines, des protéines ou des polyosides dérivés de souches appropriées d'*A. pleuropneumoniae* et traités de façon à les rendre inoffensifs tout en maintenant des propriétés immunogènes appropriées ; une fraction de plusieurs toxines dérivées de souches appropriées d'*A. pleuropneumoniae* et traitées, si nécessaire, de façon à les rendre inoffensives tout en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des porcs contre l'actinobacillose.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

La semence est cultivée dans un milieu approprié, chaque souche faisant l'objet d'une culture séparée. Des paramètres tels que le taux de croissance, la teneur en protéines et les quantités d'antigènes appropriés sont contrôlés par des méthodes appropriées ; les valeurs trouvées se situent dans les limites établies pour le vaccin considéré. La pureté et l'identité des cultures sont vérifiées sur la récolte par des méthodes appropriées. Après culture, les suspensions bactériennes sont récoltées séparément et inactivées par une méthode appropriée. Elles peuvent être détoxifiées, purifiées et concentrées. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Le choix des souches est effectué sur la base de données épidémiologiques. Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des porcs auxquels il est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (2-2-1.) et Pouvoir immunogène (section 2-2-2.) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-2-1. **Innocuité**

2-2-1-1. *Essais de laboratoire*. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination et pour chacune des catégories de porcs auxquelles le vaccin est destiné. Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin.

2-2-1-1-1. Innocuité générale. Pour chaque essai, utilisez au minimum 10 porcs exempts d'anticorps dirigés contre les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* ou ses toxines, présents dans le vaccin. Administrez à chaque porc une double dose de vaccin puis une dose après l'intervalle recommandé. Observez les porcs au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de la dernière administration. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 2 h, 4 h et 6 h après celle-ci, puis journellement pendant 4 jours ; notez pour chaque porc l'augmentation maximale de température.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des porcs ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si l'augmentation moyenne de la température corporelle de tous les porcs n'est pas supérieure à 1,5 °C et aucun porc ne présente une augmentation supérieure à 2 °C.

2-2-1-1-2. Innocuité chez la truie gestante. Si le vaccin est destiné à la truie gestante, utilisez au minimum 10 truies aux étapes d'intérêt de la gestation. Administrez à chaque truie une double dose de vaccin puis une dose après l'intervalle recommandé. Observez les truies au moins une fois par jour jusqu'à la mise bas. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 2 h, 4 h et 6 h après celle-ci, puis journellement pendant 4 jours ; notez pour chaque truie l'augmentation maximale de température.

Le vaccin satisfait à l'essai si :

- aucune des truies ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin,
- l'augmentation moyenne de la température corporelle de toutes les truies n'est pas supérieure à 1,5 °C et aucune truie ne présente une augmentation supérieure à 2 °C,
- et aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-2-1-2. *Essais sur le terrain*. Evaluez l'innocuité sur les mêmes porcs que ceux utilisés pour les essais sur le terrain. Effectuez l'essai pour chacune des catégories de porcs auxquelles le vaccin est destiné. Utilisez au moins 3 groupes d'au moins 20 porcs chacun et autant de groupes témoins d'au moins 10 porcs. Examinez le site d'injection après la vaccination pour rechercher les réactions locales. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, au moment où une augmentation de la température corporelle a été constatée lors de l'essai 2-2-1-1. le cas échéant, puis journellement pendant les 2 jours suivant la vaccination ; notez pour chaque porc l'augmentation maximale de température.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des porcs ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si l'augmentation moyenne de la

Vaccins

température corporelle de tous les porcs n'est pas supérieure à 1,5 °C et aucun porc ne présente une augmentation supérieure à 2 °C.

2-2-2. **Pouvoir immunogène**

La souche d'épreuve pour l'essai suivant est choisie de manière à assurer l'épreuve pour chacune des toxines Ap *(1)* produites par les sérotypes indiqués sur l'étiquette ; il peut être nécessaire d'effectuer plusieurs essais, chaque fois à l'aide d'une souche différente.

Effectuez chaque essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées. Le vaccin administré à chaque porc a une activité minimale.

Pour chaque essai, utilisez au moins 14 porcs exempts d'anticorps dirigés contre *A. pleuropneumoniae* ou les toxines Ap. Administrez le vaccin à au moins 7 porcs selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 7 autres comme témoins. 3 semaines après la dernière injection, soumettez chaque porc à une épreuve virulente en lui administrant par voie intranasale, par voie intratrachéale ou par aérosol une quantité suffisante d'un sérotype virulent d'*A. pleuropneumoniae*. Observez les porcs au moins une fois par jour pendant 7 jours ; afin d'éviter toute souffrance inutile, les porcs témoins qui présentent des signes graves de la maladie sont euthanasiés ; de tels porcs seront considérés comme morts de la maladie. A la fin de la période d'observation, euthanasiez les porcs survivants. Procédez à l'autopsie de tous les porcs. Recherchez la présence d'*A. pleuropneumoniae* dans les poumons, les ganglions lymphatiques de la trachée et des bronches et les amygdales. Déterminez lors de l'autopsie l'importance des lésions pulmonaires. Attribuez à chacun des 7 lobes des poumons un score maximal de 5 pour les lésions *(2)*. La proportion de la surface qui présente des signes de pneumonie ou de pleurite dans chaque lobe est exprimée sur l'échelle de 0 à 5, le score maximal pour chaque poumon entier étant de 35. Calculez séparément pour les porcs vaccinés et pour les porcs témoins le score total (le maximum étant de 245 par groupe si 7 animaux sont utilisés par groupe).

Le vaccin satisfait à l'essai si les porcs vaccinés comparés aux témoins présentent une incidence réduite de la mortalité, des signes typiques (dyspnée, toux, vomissements), des lésions pulmonaires typiques et la présence d'*A. pleuropneumoniae* dans les poumons, les ganglions lymphatiques de la trachée et des bronches, et les amygdales ; chaque fois que possible, une analyse statistique de l'incidence est effectuée et il est démontré que la réduction observée avec les porcs vaccinés est significative.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-4.) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Utilisez 5 souris pesant 18-20 g et exemptes d'anticorps dirigés contre les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* ou ses toxines présents dans le vaccin. Administrez-leur par voie sous-cutanée une dose appropriée de vaccin. Si le schéma de vaccination recommandé comporte une injection de rappel, un rappel de vaccination peut également être fait lors de cet essai s'il a été démontré que cela constitue un système d'essai de sensibilité appropriée. Avant vaccination et à un temps donné, entre 14-21 jours après la dernière injection, prélevez du sang de chaque souris et préparez des échantillons de sérum. Déterminez séparément pour chaque sérum, par un essai validé approprié tel que le titrage immunologique à enzyme conjuguée (*2.7.1*), le titre en anticorps spécifiquement dirigés contre chaque composant antigénique indiqué sur l'étiquette. Le vaccin satisfait à l'essai si les taux d'anticorps obtenus ne sont pas significativement inférieurs à ceux obtenus avec un lot ayant donné des résultats satisfaisants dans l'épreuve décrite sous Activité.

2-3-2. **Endotoxines bactériennes**. Effectuez un essai des endotoxines bactériennes (*2.6.14*) sur le vrac final ou, si la nature de l'adjuvant l'interdit, sur l'antigène en vrac ou le mélange des antigènes en vrac immédiatement avant addition de l'adjuvant. La teneur maximale acceptable en endotoxines bactériennes est celle trouvée pour un lot de vaccin qui a satisfait à l'essai 2-2-1-1. d'innocuité décrit sous Choix de la composition du vaccin ou à l'essai d'innocuité décrit sous Essai, effectué en utilisant 10 porcs. Lorsque ce dernier essai est utilisé, notez pour chaque porc l'augmentation maximale de température ; le vaccin satisfait à l'essai si l'augmentation moyenne de la température corporelle pour tous les porcs n'est pas supérieure à 1,5 °C. La méthode choisie pour déterminer la teneur en endotoxines bactériennes présente dans le lot de vaccin utilisé dans l'essai d'innocuité afin de déterminer le taux maximal acceptable d'endotoxines est utilisée par la suite pour le contrôle des lots.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Injecté à des animaux sains, exempts d'anticorps spécifiques dirigés contre les composants antigéniques d'*A. pleuropneumoniae* indiqués sur l'étiquette, le vaccin stimule la production de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 porcs de l'âge minimal recommandé pour la vaccination et exempts d'anticorps dirigés contre les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* ou ses toxines présents dans le vaccin. Administrez à chaque porc par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les porcs au moins une fois par jour pendant 14 jours. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 2 h, 4 h et 6 h après celle-ci, puis journellement pendant 2 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des porcs ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin ; il peut se produire une augmentation transitoire de la température corporelle qui ne dépasse pas 2 °C.

3-4. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai du pouvoir immunogène (section 2-2-2.) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:1298**

# VACCIN INACTIVÉ DE L'ADÉNOVIROSE CANINE

## Vaccinum adenovirosis caninae inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de l'adénovirose canine est une préparation d'une ou plusieurs souches appropriées d'adénovirus canin 1 (virus de l'hépatite canine contagieuse, virus de la maladie de Rubarth) ou d'adénovirus canin 2, inactivées en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des chiens contre l'hépatite canine contagieuse causée par l'adénovirus canin.

(1) La nomenclature des toxines d'*A. pleuropneumoniae* est décrite par J. Frey *et al.*, *Journal of General Microbiology*, 1993, 139, 1723-1728.
(2) Le système de score pulmonaire est décrit en détail par P.C.T. Hannan, B.S. Bhogal, J.P. Fish, *Research in Veterinary Science*, 1982, 33, 76-88.

Vaccins

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires. La récolte virale est inactivée. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des chiens auxquels il est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (2-3-1) et Pouvoir immunogène (section 2-3-2) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination. Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin.

2-3-1-1. *Innocuité générale*. Pour chaque essai, utilisez au minimum 10 chiens de l'âge minimal recommandé pour la vaccination, exempts d'anticorps dirigés contre l'adénovirus canin 1 ou 2. Administrez à chaque chien une double dose de vaccin. Si le schéma de vaccination recommandé comprend l'administration d'une seconde dose, administrez une dose supplémentaire à chaque chien, après le délai indiqué. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 14 jours après la dernière administration.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun chien ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

2-3-1-2. *Innocuité chez la chienne gestante*. Si le vaccin est destiné aux chiennes gestantes, utilisez au minimum 10 chiennes au stade de gestation recommandé ou à plusieurs stades selon le schéma recommandé. Administrez à chaque chienne une double dose de vaccin. Si le schéma de vaccination recommandé comprend l'administration d'une seconde dose, administrez une dose supplémentaire à chaque chienne, après le délai indiqué. Observez les chiennes au moins une fois par jour jusqu'à un jour après la mise bas.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucune chienne ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-3-2. **Pouvoir immunogène**. Dans le cas de vaccins indiqués pour la protection contre l'hépatite, l'essai décrit ci-après convient à la mise en évidence du pouvoir immunogène. Si le vaccin est indiqué pour la protection contre les signes respiratoires, un essai du pouvoir immunogène vis-à-vis de tels signes est également nécessaire.

Effectuez l'essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des chiens de l'âge minimal recommandé. Le vaccin administré à chaque chien a une activité minimale.

Utilisez au moins 7 chiens exempts d'anticorps dirigés contre l'adénovirus canin. Administrez le vaccin à au moins 5 chiens, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 2 autres comme témoins. Après 21 jours, soumettez tous les chiens à une épreuve virulente en leur administrant par voie intraveineuse une quantité suffisante d'une forme virulente de l'adénovirus canin. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 21 jours à compter de l'épreuve. Les chiens qui présentent des signes typiques d'une infection sévère par l'adénovirus canin sont euthanasiés afin d'éviter une souffrance inutile.

L'essai n'est pas valable si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, moins de 100 pour cent des chiens témoins meurent ou présentent des signes typiques d'une infection sévère. Le vaccin satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, tous les chiens vaccinés survivent sans présenter de signes de maladie.

2-4. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-4-1. **Virus vivant résiduel**. La recherche de virus vivant résiduel est effectuée avec une quantité de récolte virale inactivée équivalant à au moins 10 doses de vaccin, avec 2 passages en cultures cellulaires de même type que celles utilisées en production, ou des cultures cellulaires de sensibilité au moins égale. La récolte virale inactivée satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté.

2-4-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-5) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Administré à des animaux exempts d'anticorps spécifiques dirigés contre le ou les types d'adénovirus canin indiqués sur l'étiquette, le vaccin stimule la production de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 chiens de l'âge minimal recommandé pour la vaccination et de préférence, exempts d'anticorps neutralisant les adénovirus canins ou dans les cas justifiés, utilisez des chiens ayant un faible taux de ces anticorps, n'ayant pas été vaccinés contre l'adénovirose canine et pour qui l'administration du vaccin n'entraîne pas de réponse anamnestique. Administrez à chaque chien par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les animaux au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des chiens ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Virus vivant résiduel**. Effectuez un essai de détection de l'adénovirus canin vivant résiduel par inoculation de 10 doses de vaccin sur cultures cellulaires sensibles. Effectuez un passage après 6-8 jours et maintenez les cultures pendant 14 jours. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté. Si le vaccin contient un adjuvant, séparez cet adjuvant de la phase liquide par une méthode qui n'induit ni l'inactivation du virus ni aucune autre forme d'interférence dans la détection du virus vivant.

3-5. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai du pouvoir immunogène (section 2-3-2) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:1952**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA DIARRHÉE VIRALE BOVINE

## Vaccinum diarrhoeae viralis bovinae inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la diarrhée virale bovine est une préparation d'une ou de plusieurs souches de virus de la diarrhée bovine, inactivées en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des génisses et des vaches pour la protection de leur progéniture contre l'infection transplacentaire.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires. Après culture, les suspensions virales de chaque virus vaccinal sont récoltées séparément et inactivées par une méthode qui évite de détruire le pouvoir immunogène. Les suspensions virales peuvent être purifiées et concentrées. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DE LA COMPOSITION VACCINALE*

Il doit être démontré que le vaccine possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des bovins auxquels il est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1.) et Pouvoir immunogène (section 2-3-2.) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination et pour chaque catégorie de bovins auxquelles le vaccin est destiné. Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin.

2-3-1-1. *Innocuité générale*. Pour chaque essai, utilisez au minimum 10 bovins de l'âge minimal recommandé pour la vaccination et exempts de virus de la diarrhée bovine et d'anticorps dirigés contre ce virus. Administrez à chaque bovin une double dose de vaccin. Observez les bovins au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des bovins ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

2-3-1-2. *Innocuité chez la vache gestante*. Si le vaccin est destiné aux vaches gestantes, utilisez au minimum 10 vaches au début de chacun des trimestres pendant lesquels l'administration du vaccin n'est pas contre-indiquée. Administrez à chaque vache une double dose de vaccin. Observez les vaches au moins une fois par jour jusqu'à la mise bas.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucune des vaches ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-3-1-3. *Examen de la fonction reproductrice*. Si le vaccin doit être administré peu avant ou au moment de l'insémination, l'absence d'effet indésirable sur le taux de conception doit être démontrée.

2-3-2. **Pouvoir immunogène**. L'essai suivant convient à la démonstration du pouvoir immunogène du vaccin vis-à-vis du virus de la diarrhée bovine de génotype 1 ; si le vaccin est indiqué pour la protection contre le virus de la diarrhée bovine de génotype 2, un essai supplémentaire, semblable à celui décrit ci-après mais avec une épreuve avec le virus de la diarrhée bovine de génotype 2, est effectué.

Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées. Le vaccin administré à chaque génisse a une activité minimale.

Utilisez au moins 20 génisses exemptes de virus de la diarrhée bovine et d'anticorps dirigés contre le virus de la diarrhée bovine. Administrez le vaccin à au moins 13 génisses selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 7 autres comme témoins. Gardez tous les animaux en un seul groupe. Procédez à l'insémination des génisses. Prélevez un échantillon sanguin des génisses non vaccinées peu de temps avant l'épreuve. L'essai est abandonné si moins de 10 génisses vaccinées ou 5 génisses non vaccinées sont gravides au moment de l'épreuve. Entre les 60$^{e}$ et 90$^{e}$ jours de gestation, soumettez toutes les génisses à l'épreuve virulente. Pour chacun des 2 modèles d'essai décrits (observation jusqu'à la fin de la gestation et récolte des foetus après 28 jours), l'épreuve peut être effectuée par voie intranasale en inoculant une quantité suffisante d'une souche virulente non cytopathogène du virus de la diarrhée bovine, ou bien, lorsque les génisses sont observées jusqu'à la fin de la gestation, l'essai peut aussi être effectué par contact avec un bovin virémique permanent. Observez les génisses au moins une fois par jour après l'épreuve soit jusqu'à la fin de la gestation, soit jusqu'à la récolte des foetus après 28 jours. En cas d'avortement, recherchez la présence de virus de la diarrhée bovine chez le foetus, en utilisant des méthodes appropriées. Si les bovins sont maintenus en observation jusqu'à la fin de la gestation, immédiatement après la naissance et avant l'ingestion de colostrum, recherchez la présence de virémie ou d'anticorps dirigés contre le virus de la diarrhée bovine chez tous les veaux. Si les foetus sont récoltés 28 jours après l'épreuve virulente, recherchez la présence de virus de la diarrhée bovine chez le foetus, en utilisant des méthodes appropriées. Il est considéré qu'une infection transplacentaire est survenue si le virus a été décelé dans les organes foetaux ou dans le sang des veaux nouveaux-nés ou si des anticorps ont été décelés dans le sérum du veau avant qu'il n'ait ingéré de colostrum.

L'essai n'est pas valable si une ou plusieurs génisses non vaccinées présentent des anticorps neutralisants avant l'épreuve virulente ou si aucune infection transplacentaire n'est survenue chez plus de 10 pour cent des veaux issus des génisses témoins. Le vaccin satisfait à l'essai si au moins 90 pour cent des veaux issus des génisses vaccinées ne présentent pas d'infection transplacentaire.

2-4. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-4-1. **Virus vivant résiduel**. La recherche du virus vivant résiduel est effectuée avec une quantité de récolte virale inactivée au moins équivalente à 25 doses de vaccin sur des cellules de même type que celles utilisées en production ou des cellules de sensibilité au moins égale ; un passage est effectué après 7 jours et les cellules sont observées en tout pendant au moins 14 jours. La récolte virale inactivée satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est décelé.

2-4-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-5.) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Utilisez 7 animaux de laboratoire appropriés ou 7 veaux, exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la diarrhée bovine. Administrez par voie sous-cutanée à 5 animaux une dose appropriée de vaccin et gardez-en 2 autres comme témoins. Une 2$^{e}$ dose de vaccin peut être administrée après un intervalle approprié s'il a été démontré que cela constitue un système d'essai suffisamment sensible. Prélevez des échantillons de sang avant la première vaccination et à un temps donné, entre 14 et 21 jours après la dernière vaccination. Déterminez les titres en anticorps dirigés contre le virus de la diarrhée bovine par séroneutralisation sur des cultures cellulaires appropriées.

L'essai n'est pas valable si des anticorps dirigés contre le virus de la diarrhée bovine sont retrouvés chez les témoins. Le vaccin satisfait à l'essai si la teneur en anticorps chez les animaux vaccinés n'est pas inférieure à celle d'un lot de vaccin ayant auparavant satisfait à l'essai décrit sous Activité.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Lorsqu'il est administré à des animaux exempts d'anticorps neutralisants spécifiques dirigés contre le virus de la diarrhée bovine, le vaccin stimule l'apparition de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 bovins ayant au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination et exempts de virus de la diarrhée bovine et d'anticorps dirigés contre ce virus. Administrez à chaque bovin par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les bovins au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des bovins ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Virus vivant résiduel**. Effectuez une recherche de virus de la diarrhée bovine vivant résiduel par inoculation d'au moins 10 doses sur des cellules reconnues sensibles au virus de la diarrhée bovine. Effectuez un passage après 7 jours et observez la 2e culture pendant au moins 7 jours. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est décelé. Si le vaccin contient un adjuvant, séparez, si possible, cet adjuvant de la phase liquide par une méthode qui n'induit aucune forme d'interférence dans la détection du virus vivant.

3-5. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-2.) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:0063**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA FIÈVRE APHTEUSE POUR RUMINANTS

## Vaccinum aphtharum epizooticarum inactivatum ad ruminantes

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la fièvre aphteuse pour ruminants consiste en une préparation à base d'un ou plusieurs sérotypes de virus de la fièvre aphteuse inactivé(s) en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des ruminants contre la fièvre aphteuse.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires puis séparé des éléments cellulaires par filtration ou par d'autres procédés appropriés. Le virus récolté est inactivé dans des conditions convenables et peut être concentré et purifié. Le virus est utilisé pour la préparation de vaccin immédiatement ou après conservation à une température démontrée être en conformité avec la stabilité de l'antigène. Le vaccin est préparé à partir du virus inactivé par mélange avec un ou plusieurs adjuvants. Pour un antigène donné, la quantité d'antigène 146S dans le mélange composant chaque lot de vaccin n'est pas inférieure à la quantité trouvée pour un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai du pouvoir immunogène.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *VALIDATION DU PROCÉDÉ D'INACTIVATION*

Pendant le procédé d'inactivation, le titre en virus est contrôlé par une méthode de titrage sensible et reproductible. Le procédé d'inactivation n'est satisfaisant que si la diminution du titre en virus, portée sur un graphique à échelle logarithmique, est linéaire et si l'extrapolation de la courbe indique la présence de moins de 1 unité virale infectieuse par $10^4$ L de préparation liquide à la fin de la période d'inactivation.

2-4. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis de chacune des espèces auxquelles il est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (2-4-1.) et Pouvoir immunogène (section 2-4-2.) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-4-1. **Innocuité**

2-4-1-1. *Innocuité générale*. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination et pour les animaux de chacune des espèces auxquelles le vaccin est destiné, en utilisant dans chaque cas des animaux de l'âge minimal recommandé. Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin.

Pour chaque essai, utilisez au minimum 10 animaux exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la fièvre aphteuse. Administrez à chaque animal une double dose de vaccin. Observez les animaux au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

2-4-1-2. *Innocuité chez la femelle gestante*. Si le vaccin est destiné aux femelles gestantes ou s'il peut leur être administré, utilisez au minimum 10 femelles au début de chacun des trimestres au cours desquels l'utilisation du vaccin ne présente pas de contre-indication. Administrez à chaque femelle une double dose de vaccin. Observez les femelles au moins une fois par jour jusqu'à la mise bas.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucune des femelles ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-4-2. **Pouvoir immunogène**. L'essai suivant convient à la mise en évidence du pouvoir immunogène du vaccin chez les bovins. L'activité du vaccin est exprimée par le nombre de doses protectrices 50 pour cent pour bovins ($DP_{50}$) contenues dans la dose indiquée sur l'étiquette. La dose $DP_{50}$ est déterminée selon les modalités décrites ci-après sur des bovins primovaccinés, éprouvés par inoculation de 10 000 $DI_{50}$ de virus virulent pour bovins du même sérotype que celui du virus utilisé dans la préparation du vaccin. Le virus vaccinal peut être utilisé pour l'épreuve.

Effectuez un essai du pouvoir immunogène pour chaque sérotype de virus de la fièvre aphteuse pouvant composer le vaccin. L'essai du pouvoir immunogène effectué pour un sérotype particulier sera valable pour d'autres vaccins sous réserve que leur composition de base soit la même et que l'activité du lot relative à ce sérotype particulier ne soit pas inférieure à celle du vaccin ayant donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit ci-après.

Effectuez chaque essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées pour la vaccination, en utilisant dans chaque cas des bovins âgés d'au moins 6 mois. Le vaccin administré à chaque bovin a une activité minimale.

Utilisez au minimum 17 bovins provenant de régions exemptes de fièvre aphteuse, n'ayant jamais été vaccinés contre cette maladie et exempts d'anticorps neutralisant les différents sérotypes du virus de la fièvre aphteuse. Administrez le vaccin à au moins 3 groupes d'au moins 5 bovins chacun en utilisant une quantité de vaccin différente pour chaque groupe et gardez 2 autres bovins comme témoins. Administrez les doses différentes par injection de volumes différents plutôt que par dilution du vaccin. Par exemple, si l'étiquette indique que l'injection de 2 mL correspond à l'administration de 1 dose de vaccin, le 1/4 de la dose de vaccin sera obtenu en injectant 0,5 mL de préparation et 1/10 de dose sera obtenu en injectant 0,2 mL de la préparation. Après 3 semaines, soumettez tous les bovins à une épreuve virulente en leur administrant par voie intradermique, en 2 points de la surface supérieure de la langue (par inoculation de 0,1 mL par point), une dose équivalente à environ 10 000 $DI_{50}$ d'une suspension de virus hautement virulent, obtenu sur bovins et du même sérotype

Vaccins

que le virus utilisé dans la préparation du vaccin. Observez les bovins au moins une fois par jour pendant 8 jours avant de les euthanasier. Les bovins non protégés présentent des lésions autres que linguales. Les bovins protégés peuvent présenter des lésions linguales.

L'essai n'est pas valable si les deux bovins témoins ne présentent pas de lésions sur au moins 3 pieds. Calculez le nombre de $DP_{50}$ présent dans le vaccin à partir du nombre de bovins protégés par groupe. Le vaccin satisfait à l'essai si l'activité du vaccin n'est pas inférieure à celle indiquée sur l'étiquette ; l'activité minimale indiquée sur l'étiquette est d'au moins 3 $DP_{50}$ par dose pour bovins.

2-5. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-5-1. **Identification**. L'antigène inactivé en vrac est identifié par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

2-5-2. **Virus vivant résiduel**. La limite de détection des cultures cellulaires à utiliser vis-à-vis du virus à rechercher est établie par détermination du nombre des $DICC_{50}$ et la teneur en antigène 146S d'un échantillon de virus vivant. Les cultures cellulaires ne conviennent pas si une quantité de virus correspondant à 1 µg d'antigène 146S contient moins de $10^6$ $DICC_{50}$. Un essai de virus vivant est effectué sur une proportion correspondant à au moins 200 doses de chaque lot d'antigène inactivé en vrac par inoculation à des cultures cellulaires appropriées. Un passage est effectué pendant la culture des cellules. L'antigène inactivé peut être concentré afin de permettre l'examen de volumes importants sur cultures cellulaires. Il doit être démontré que les méthodes de concentration et de titrage n'altèrent pas la détection de virus infectieux dans l'échantillon à examiner et que l'antigène concentré inactivé n'interfère pas avec la multiplication du virus ni ne cause d'effets toxiques. Chaque essai comporte un témoin positif.

2-5-3. **Teneur en antigène**. La teneur en antigène 146S de chaque lot d'antigène inactivé en vrac est déterminée *in vitro* (par exemple, par centrifugation dans un gradient de saccharose et par spectrophotométrie en lumière ultraviolette à 259 nm).

2-5-4. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-4.) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité et qui a été démontré satisfaisant en ce qui concerne le pouvoir immunogène chez la ou les espèce(s) cibles.

L'essai suivant peut être effectué après qu'un niveau de conformité satisfaisant a été établi pour un antigène donné. Après établissement d'un niveau de conformité pour un antigène donné, le même niveau peut être utilisé si cet antigène est formulé en combinaison avec tout autre antigène sous réserve que la formulation du vaccin ne diffère que par les antigènes inclus.

2-5-4-1. *Vaccins destinés aux bovins.* Utilisez des bovins de l'âge minimal recommandé pour la vaccination, provenant de régions exemptes de fièvre aphteuse, n'ayant jamais été vaccinés contre la fièvre aphteuse et exempts d'anticorps neutralisant les sérotypes de virus de la fièvre aphteuse. Vaccinez au minimum 5 bovins par une voie d'administration recommandée. Utilisez une dose appropriée de vaccin pour chaque bovin. A un temps donné ne dépassant pas 28 jours après la vaccination, effectuez un prélèvement sanguin et déterminez séparément pour chaque sérum le niveau d'anticorps contre chaque sérotype utilisé dans la préparation du vaccin, par une technique validée (par exemple, séroneutralisation, ELISA). Le vaccin satisfait à l'essai si des titres au moins égaux au niveau de conformité sont mesurés chez au moins 50 pour cent des bovins.

2-5-4-2. *Vaccins destinés à d'autres ruminants.* L'activité de chaque lot doit être démontrée par un essai validé approprié. Un essai sur bovins respectant les procédures décrites ci-avant pour les vaccins destinés aux bovins, peut être approprié.

UTILISATION D'URGENCE : dans des cas d'extrême urgence et sous réserve de l'accord de l'Autorité compétente, un lot de vaccin peut être libéré avant la fin des essais et de la détermination d'activité si un essai de stérilité a été effectué sur l'antigène inactivé en vrac et sur tous les autres composants du vaccin, et si l'essai d'innocuité et la détermination d'activité ont été effectués sur un lot représentatif du vaccin préparé à partir du même antigène inactivé en vrac. Dans ce contexte, un lot n'est considéré comme représentatif que s'il a été préparé avec une quantité d'antigène(s) qui n'est pas supérieure à celle du lot à libérer et avec la même formulation que celle du lot à libérer.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le sérum d'un animal exempt d'anticorps dirigés contre le virus de la fièvre aphteuse avant d'être immunisé à l'aide du vaccin présente, dans un essai de sensibilité appropriée, un pouvoir neutralisant contre les sérotypes de virus entrant dans la composition du vaccin.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 animaux non vaccinés de l'une des espèces auxquelles le vaccin est destiné, âgés d'au moins 6 mois, exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la fièvre aphteuse et provenant de régions exemptes de fièvre aphteuse. Administrez à chaque animal par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les animaux au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai du pouvoir immunogène (section 2-4-2.) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:0249**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA GRIPPE ÉQUINE

## Vaccinum influenzae equi inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la grippe équine est une préparation d'une ou de plusieurs souches appropriées du virus de la grippe équine, inactivées en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Les souches appropriées contiennent de l'hémagglutinine et de la neuraminidase. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des chevaux contre la grippe équine.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Chaque souche de virus vaccinal est multipliée séparément dans des oeufs de poule embryonnés ou en culture cellulaire. Les suspensions virales peuvent être purifiées et concentrées. La teneur en antigène du vaccin est basée sur la teneur en hémagglutinine des suspensions virales, déterminée selon les indications données sous Essais du fabricant ; pour chaque souche virale, la quantité d'hémagglutinine n'est pas inférieure à celle du vaccin démontré satisfaisant dans l'essai d'activité. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Oeufs de poule embryonnés**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poule embryonnés, ils proviennent d'un élevage sain.

2-2-2. **Cultures cellulaires**. Si le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires, elles satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Le choix des souches utilisées dans le vaccin est fondé sur des données épidémiologiques. L'Office international des épizooties procède à une étude régulière des données épidémiologiques et, si nécessaire, recommande de nouvelles souches correspondant à la situation épidémiologique actuelle. De telles souches sont utilisées conformément à la réglementation des Etats signataires de la Convention relative à l'élaboration d'une Pharmacopée Européenne.

Il doit être démontré que le vaccin possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des chevaux auxquels il est destiné. Si une race de chevaux est connue pour être particulièrement sensible à ce vaccin, des chevaux de cette race sont retenus parmi ceux utilisés pour les essais d'innocuité.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1) et Pouvoir immunogène (section 2-3-2) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées et pour les chevaux de chacune des catégories auxquelles le vaccin est destiné. Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin.

2-3-1-1. *Innocuité générale*. Utilisez au minimum 10 chevaux de préférence exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la grippe équine ou, dans les cas justifiés, utilisez des chevaux qui ont un faible taux de ces anticorps, qui n'ont pas été vaccinés contre la grippe équine et pour qui l'administration du vaccin n'entraîne pas de réponse anamnestique. Administrez à chaque cheval une double dose de vaccin, puis une dose après 14 jours. Observez les chevaux au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de la dernière administration.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des chevaux ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin pendant les 28 jours de l'essai.

2-3-1-2. *Innocuité chez la jument gravide*. Si le vaccin est destiné à la jument gravide, utilisez au minimum 10 juments gravides pendant le ou les trimestres d'intérêt, selon le schéma recommandé. Administrez à chaque jument une double dose de vaccin, puis une dose après 14 jours. Observez les juments au moins une fois par jour jusqu'à la mise bas.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucune des juments ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-3-2. **Pouvoir immunogène**. L'essai décrit sous 2-3-2-1 convient à la mise en évidence du pouvoir immunogène des souches présentes dans le vaccin.

Un essai comportant une épreuve virulente est effectué pour au moins une des souches vaccinales (voir essai 2-3-2-1). Pour les autres souches, la démonstration du pouvoir immunogène peut, sous réserve de justification, reposer sur la réponse sérologique induite chez des chevaux par le vaccin (voir essais 2-3-2-2) ; la justification peut reposer sur des données publiées relatives à la corrélation entre titre en anticorps et protection contre des souches apparentées du point de vue antigénique.

Lorsque la réponse sérologique est utilisée, l'essai est effectué selon les indications données sous 2-3-2-1 mais, au lieu de procéder à l'épreuve virulente, un échantillon de sang est prélevé 2 semaines après la dernière vaccination et le titre en anticorps de chaque sérum est déterminé par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), telle que l'essai d'hémolyse radiale simple ou l'essai d'inhibition de l'hémagglutination décrits ci-après ; un sérum de référence est utilisé pour valider l'essai. Les critères d'acceptabilité dépendent de la souche et sont basés sur les données disponibles ; dans le cas de la souche de virus A/equi-2, les vaccins sont considérés satisfaisants si le titre en anticorps de chaque sérum n'est pas inférieur à 85 $mm^2$ si l'hémolyse radiale simple est utilisée ou s'il n'est pas inférieur à 1:64 (avant le mélange avec la suspension d'antigène et d'érythrocytes) si l'essai d'inhibition d'hémagglutination est utilisé.

Le *sérum de cheval de la grippe équine sous-type 1 PBR*, le *sérum de cheval de la grippe équine sous-type 2 lignage américain PBR* et le *sérum de cheval de la grippe équine sous-type 2 lignage européen PBR* conviennent comme sérums de référence pour l'essai d'hémolyse radiale simple.

Les indications du produit reflètent le type de pouvoir immunogène démontré (protection contre l'épreuve virulente ou production d'anticorps).

2-3-2-1. Protection contre les signes de maladie et réduction de l'excrétion du virus. Effectuez l'essai du pouvoir immunogène en utilisant pour l'épreuve virulente une souche contre laquelle il est indiqué que le vaccin protège ; utilisez de préférence un isolat récent.

Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des chevaux âgés d'au moins 6 mois. Le vaccin administré à chaque cheval a une activité minimale.

Utilisez au moins 10 chevaux exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la grippe équine. Prélevez du sang sur chaque cheval et effectuez sur chaque échantillon une recherche d'anticorps dirigés contre le virus de la grippe équine afin de déterminer la séronégativité. Administrez le vaccin à au moins 6 chevaux, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 4 autres comme témoins. Prélevez du sang sur chaque cheval vacciné 7 jours après la première vaccination et effectuez sur chaque échantillon une recherche d'anticorps contre le virus de la grippe équine afin de déceler une réponse anamnestique. Les chevaux présentant une séroconversion sont écartés de l'essai. 2 semaines au moins après la dernière vaccination, soumettez tous les chevaux à une épreuve virulente en leur administrant par aérosol une quantité de virus de la grippe équine suffisante pour produire des signes caractéristiques de la maladie, tels que fièvre, jetage et toux chez le cheval réceptif. Observez les chevaux au moins une fois par jour pendant 14 jours. Effectuez des écouvillonnages de la cavité nasale journellement afin d'isoler le virus.

Le vaccin satisfait à l'essai si les chevaux vaccinés montrent tout au plus des signes légers ; les chevaux témoins présentent des signes caractéristiques. Le nombre moyen de jours pendant lequel le virus est retrouvé et les titres en virus sont inférieurs de façon significative chez les chevaux vaccinés comparés aux témoins.

2-3-2-2. Présence d'anticorps après vaccination

2-3-2-2-1. *Essai d'hémolyse radiale simple.* Chauffez chaque sérum à 56 °C pendant 30 min. Effectuez des essais sur chaque sérum en utilisant les antigènes correspondant aux souches utilisées dans la production du vaccin. Mélangez 1 mL d'une suspension d'érythrocytes de mouton dans du tampon barbital (1 volume d'érythrocytes pour 10 volumes de suspension finale) à 1 mL d'une dilution appropriée du virus de la grippe dans du tampon barbital et maintenez le mélange à 4 °C pendant 30 min. A 2 mL du mélange de virus et d'érythrocytes, ajoutez 1 mL d'une solution de *trichlorure de chrome (III) hexahydraté R* à 3 g/L, mélangez et laissez reposer pendant 10 min. Faites chauffer les érythrocytes sensibilisés à 47 °C dans un bain-marie. Préparez un mélange de 15 mL d'une solution d'*agarose pour électrophorèse R* à 10 g/L dans du tampon barbital, 0,7 mL de suspension d'érythrocytes sensibilisés et un volume approprié d'une dilution de complément de cobaye dans du tampon barbital à 47 °C. Versez le mélange dans des boîtes de pétri et laissez le gel se former. Faites des perforations

Vaccins

dans la couche d'agarose et dans chaque perforation placez 5 µL de sérum à examiner ou de sérum témoin, non dilué. Maintenez les boîtes de pétri à 37 °C pendant 18 h. Mesurez le diamètre de la zone d'hémolyse et calculez-en l'aire, qui exprime le titre en anticorps, en millimètres carrés.

Le *sérum de cheval de la grippe équine sous-type 1 PBR*, le *sérum de cheval de la grippe équine sous-type 2 lignage américain PBR* et le *sérum de cheval de la grippe équine sous-type 2 lignage européen PBR* conviennent comme sérums de référence pour l'essai d'hémolyse radiale simple.

2-3-2-2-2. *Essai d'inhibition de l'hémagglutination*. Inactivez chaque sérum en le chauffant à 56 °C pendant 30 min. A un volume de chaque sérum, ajoutez 3 volumes de *solution saline tamponnée phosphate pH 7,4 R* et 4 volumes d'une suspension de *kaolin léger R* à 250 g/L dans la même solution tampon. Agitez chaque mélange pendant 10 min. Centrifugez, récoltez le surnageant et mélangez avec une suspension concentrée d'érythrocytes de poulet. Laissez reposer à 37 °C pendant 60 min, puis centrifugez. La dilution de sérum obtenue est alors égale à 1:8. Effectuez des essais sur chaque sérum en utilisant respectivement chaque antigène préparé à partir des souches entrant dans la composition du vaccin. Effectuez à partir de chaque sérum dilué une série de dilutions de raison 2. A 0,025 mL de chacune de ces dernières dilutions, ajoutez 0,025 mL d'une suspension d'antigène préalablement traité par de l'*éther R*, contenant 4 unités hémagglutinantes. Laissez reposer les mélanges pendant 30 min, puis ajoutez 0,05 mL d'une suspension d'érythrocytes de poulet contenant $2 \times 10^7$ érythrocytes/mL. Laissez reposer pendant 1 h, puis notez la dernière dilution de sérum encore capable d'inhiber complètement l'hémagglutination.

2-4. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-4-1. **Virus vivant résiduel**. L'essai de virus vivant résiduel est effectué par la méthode 2-4-1-1 ou 2-4-1-2, en choisissant la plus sensible des deux. Utilisez une récolte virale inactivée équivalant à au moins 10 doses de vaccin.

2-4-1-1. *Recherche en culture cellulaire*. Inoculez le vaccin à des cultures cellulaires appropriées ; effectuez un passage après 8 jours et maintenez les cellules pendant 6-8 jours encore. Effectuez une recherche de virus vivant par un essai d'hémagglutination sur 0,1 mL du surnageant de la culture cellulaire. S'il se produit une hémagglutination, effectuez un 2^e^ passage et répétez l'essai d'hémagglutination ; la récolte virale inactivée satisfait à l'essai si aucune hémagglutination ne se produit.

2-4-1-2. *Recherche dans des oeufs embryonnés*. Utilisez 10 oeufs embryonnés. Inoculez dans la cavité allantoïdienne de chacun d'eux 0,2 mL de vaccin ; faites incuber à 33-37 °C pendant 3-4 jours. L'essai n'est valable que si les embryons d'au moins 8 oeufs sur 10 survivent. Recueillez pour chaque embryon survivant, 0,5 mL de liquide allantoïdien et mélangez les liquides. Inoculez 0,2 mL de liquide recueilli dans un autre groupe de 10 oeufs embryonnés et faites incuber à 33-37 °C pendant 3-4 jours. L'essai n'est valable que si les embryons d'au moins 8 oeufs sur 10 survivent. Recueillez pour chaque embryon, 0,1 mL environ de liquide allantoïdien et effectuez sur chaque liquide individuel une recherche de virus vivant par un essai d'hémagglutination. S'il se produit une hémagglutination lors de l'essai, effectuez à partir du liquide concerné un passage sur oeufs supplémentaire et un essai d'hémagglutination ; la récolte virale inactivée satisfait à l'essai si aucune hémagglutination ne se produit.

2-4-2. **Activité du lot.** Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-5) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans le(s) essai(s) décrit(s) sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Utilisez 5 cobayes exempts d'anticorps spécifiques. Administrez à chaque cobaye par voie sous-cutanée une dose de vaccin. Après 21 jours, prélevez du sang et séparez le sérum. Effectuez des essais d'anticorps spécifiques par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) telle que l'hémolyse radiale simple ou l'essai d'inhibition de l'hémagglutination. Utilisez des sérums de référence pour valider l'essai. Le vaccin satisfait à l'essai si les titres d'anticorps obtenus ne sont pas inférieurs de façon significative à ceux obtenus chez le cobaye avec un vaccin de référence démontré satisfaisant quant à son activité chez le cheval.

2-4-3. **Endotoxines bactériennes**. Dans le cas d'un vaccin préparé sur oeufs, la teneur en endotoxines bactériennes est déterminée sur la récolte virale pour surveiller le procédé de production.

2-4-4. **Teneur en hémagglutinine**. La teneur en hémagglutinine de la suspension virale inactivée, après purification et concentration le cas échéant, est déterminée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*) telle que l'immunodiffusion radiale simple par rapport à une préparation de référence appropriée d'hémagglutinine ; la suspension virale inactivée satisfait à l'essai si la teneur se situe dans les limites dont on a démontré qu'elles permettent la préparation d'un vaccin satisfaisant.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le vaccin provoque chez les animaux exempts d'anticorps spécifiques dirigés contre le virus de la grippe équine l'apparition de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez au moins 2 chevaux de préférence exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la grippe équine ou, dans les cas justifiés, utilisez des chevaux qui ont un faible taux de ces anticorps, qui n'ont pas été vaccinés contre la grippe équine et pour qui l'administration du vaccin n'entraîne pas de réponse anamnestique. Administrez à chaque cheval par une voie recommandée une double dose de vaccin puis une dose après 2 semaines. Observez les chevaux au moins une fois par jour pendant 10 jours à compter de la dernière administration.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des chevaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Virus vivant résiduel**. Utilisez 10 oeufs embryonnés. Inoculez dans la cavité allantoïdienne de chacun d'eux 0,2 mL de vaccin ; faites incuber à 33-37 °C pendant 3-4 jours. L'essai n'est valable que si les embryons d'au moins 8 oeufs sur 10 survivent. Recueillez pour chaque embryon survivant, 0,5 mL de liquide allantoïdien et mélangez les liquides. Inoculez 0,2 mL de liquide recueilli dans un autre groupe de 10 oeufs embryonnés et faites incuber à 33-37 °C pendant 3-4 jours. L'essai n'est valable que si les embryons d'au moins 8 oeufs sur 10 survivent. Recueillez pour chaque embryon 0,1 mL environ de liquide allantoïdien et effectuez sur chaque liquide individuel une recherche de virus vivant par un essai d'hémagglutination. S'il se produit une hémagglutination lors de l'essai, effectuez à partir du liquide concerné un passage sur oeufs supplémentaire et un essai d'hémagglutination ; le vaccin satisfait à l'essai si aucune hémagglutination ne se produit.

3-5. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences du ou des essai(s) du pouvoir immunogène (section 2-3-2) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:0963**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA GRIPPE PORCINE

## Vaccinum influenzae inactivatum ad suem

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la grippe porcine est une préparation d'une ou de plusieurs souches appropriées de virus grippal d'origine humaine ou porcine, inactivées en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Les souches appropriées contiennent à la fois de l'hémagglutinine et de la neuraminidase. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des porcs contre la grippe porcine.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poule embryonnés ou en culture cellulaire. Chaque souche de virus est cultivée séparément. Après culture, les suspensions virales de chaque souche sont récoltées séparément et inactivées par une méthode appropriée. Si nécessaire, elles peuvent être purifiées. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Oeufs de poule embryonnés**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poule embryonnés, ils proviennent d'un élevage sain.

2-2-2. **Cultures cellulaires**. Si le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires, elles satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Le choix des souches est effectué en fonction des types et sous-types antigéniques observés en Europe. Il doit être démontré que le vaccin possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des porcs auxquels il est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1.) et Pouvoir immunogène (section 2-3-2.) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**

2-3-1-1. *Essais de laboratoire*. Effectuez les essais pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées et le cas échéant, pour les porcs de chacune des catégories auxquelles le vaccin est destiné (truies, porcs charcutiers). Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin.

2-3-1-1-1. Innocuité générale. Pour chaque essai, utilisez au minimum 10 porcs exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la grippe porcine. Administrez à chaque porc une double dose de vaccin, puis une dose après 14 jours. Observez les porcs au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de la dernière administration.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des porcs ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin pendant les 28 jours de l'essai.

2-3-1-1-2. Innocuité chez les porcs utilisés dans l'essai 2-3-2. du pouvoir immunogène. Les porcs utilisés dans l'essai du pouvoir immunogène sont également utilisés pour évaluer l'innocuité. Relevez la température rectale de chaque porc vacciné au moment de la vaccination puis 24 h et 48 h plus tard. Recherchez la présence de réactions locales au site d'injection lors de l'abattage.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun porc ne présente :

- une température corporelle anormale ;
- aucune autre réaction générale (par exemple, anorexie) ;
- aucune réaction locale anormale attribuable au vaccin.

2-3-1-2. *Essais sur le terrain*. Les porcs utilisés pour les essais sur le terrain sont également utilisés pour évaluer l'innocuité. Effectuez un essai pour chaque catégorie de porcs auxquels le vaccin est destiné (truies, porcs charcutiers). Utilisez au minimum 3 groupes d'au moins 20 porcs provenant d'au moins 2 élevages avec des groupes correspondants d'au moins 10 témoins. Relevez la température rectale de chaque porc vacciné au moment de la vaccination puis 24 h et 48 h plus tard. Recherchez la présence de réactions locales au site d'injection lors de l'abattage.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun porc ne présente :

- une température corporelle anormale ;
- aucune réaction locale anormale attribuable au vaccin.

2-3-2. **Pouvoir immunogène**. L'essai suivant, effectué à l'aide d'une ou des souches d'épreuve appropriées du point de vue épidémiologique, convient à la mise en évidence du pouvoir immunogène. Il est effectué pour chaque sous-type utilisé dans la préparation du vaccin.

Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des porcs de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Le vaccin administré à chaque porc a une activité minimale.

Utilisez au moins 20 porcs exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la grippe porcine. Administrez le vaccin à au moins 10 porcs, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 10 autres comme témoins. Prélevez un échantillon sanguin sur tous les porcs témoins immédiatement avant l'épreuve. 3 semaines après la dernière vaccination, soumettez tous les porcs à une épreuve virulente en leur administrant, par voie intratrachéale, une quantité suffisante d'une forme sauvage du virus de la grippe. Euthanasiez la moitié des porcs vaccinés et témoins 24 h après l'épreuve et l'autre moitié 72 h après l'épreuve. Pour chaque porc, mesurez la quantité de virus grippal sur 2 préparations homogénéisées de tissu pulmonaire, l'une étant constituée des lobes apical, cardiaque et diaphragmatique du poumon gauche, et l'autre étant constituée des lobes correspondants du poumon droit. Prélevez des échantillons équivalents de tissu pulmonaire sur chaque porc.

L'essai n'est pas valable si des anticorps dirigés contre le virus grippal sont décelés chez un ou plusieurs porcs témoins immédiatement avant l'épreuve. Le vaccin satisfait à l'essai si, pour les deux temps de mesure, le titre moyen en virus dans les mélanges de tissu pulmonaire prélevés sur les porcs vaccinés est inférieur de façon significative à celui des porcs témoins, lorsque les données sont analysées à l'aide d'une méthode statistique appropriée telle que le test de Wilcoxon Mann-Whitney.

2-4. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-4-1. **Virus vivant résiduel**. Un essai d'enrichissement en virus vivant résiduel est effectué pour chaque lot d'antigène immédiatement après l'inactivation par passage sur le même type de support que celui utilisé pour la production du vaccin (oeufs ou cultures cellulaires) ou sur un autre support dont la sensibilité aura été démontrée égale ou supérieure. La quantité de récolte virale inactivée utilisée dans cet essai correspond à au moins 10 doses de vaccin. La récolte virale inactivée satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté.

2-4-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-6.) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Utilisez 5 cobayes âgés de 5-7 semaines et exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la grippe porcine. Administrez à chaque cobaye par voie sous-cutanée un quart de la dose recommandée. Procédez à une prise de sang avant la vaccination et 21 jours après la vaccination. Titrez individuellement chaque prise de sang par un essai d'inhibition de l'hémagglutination ou tout autre essai approprié pour déterminer le taux d'anticorps

spécifiques contre chaque sous-type de virus dans le vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si les taux d'anticorps trouvés ne sont pas inférieurs à ceux trouvés avec un vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai sur porcs (voir Activité).

2-4-3. **Endotoxines bactériennes**. Dans le cas d'un vaccin préparé sur oeufs, la teneur en endotoxines bactériennes est déterminée sur la récolte virale pour surveiller le procédé de production.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Administré à des animaux sains, exempts d'anticorps spécifiques dirigés contre les sous-types du virus de la grippe inclus dans le vaccin, le vaccin provoque la formation de tels anticorps. Ces anticorps peuvent être mis en évidence par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*).

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062).*

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 porcs ayant au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination et exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la grippe porcine. Administrez à chaque porc par une voie recommandée une double dose de vaccin puis une dose de vaccin après 14 jours. Observez les porcs au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de la dernière administration.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des porcs ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Virus vivant résiduel**

3-4-1. *Vaccins préparés sur oeufs.* Si le vaccin est préparé sur oeufs, utilisez 10 oeufs embryonnés, âgés de 9-11 jours. Inoculez par la voie allantoïdienne 0,2 mL de vaccin à chacun d'eux. Faites incuber à une température appropriée pendant 3 jours. Tout oeuf dont l'embryon meurt dans les 24 h qui suivent l'inoculation est éliminé à titre de mortalité non spécifique et l'oeuf est rejeté. L'essai n'est valable que si au moins 80 pour cent des embryons survivent. Recueillez le liquide allantoïdien de chaque oeuf, mélangez des volumes égaux de chaque liquide et procédez à un second passage sur un deuxième groupe d'oeufs embryonnés. Faites incuber pendant 4 jours ; le vaccin satisfait à l'essai si le liquide allantoïdien de ces oeufs ne présente aucune activité hémagglutinante.

3-4-2. *Vaccins préparés en culture cellulaire.* Si le vaccin est produit sur des cultures cellulaires, effectuez un essai approprié pour détecter le virus vivant résiduel, en pratiquant 2 passages dans le même type de culture cellulaire que celui utilisé pour la production du vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté. Si le vaccin contient un adjuvant huileux qui interfère avec cet essai, dans la mesure du possible, séparez la phase aqueuse par des moyens qui ne diminuent pas la capacité de l'essai à détecter du virus résiduel infectieux de la grippe.

3-5. **Agents étrangers**. Sur les porcs ayant servi à l'essai d'innocuité, effectuez une recherche d'anticorps. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne provoque pas l'apparition d'anticorps autres que ceux contre le virus de la grippe. Notamment, des anticorps contre des virus pathogènes pour le porc ou contre des virus qui pourraient interférer avec le diagnostic de maladies infectieuses du porc (y compris les virus du groupe des pestivirus) ne sont pas détectés.

3-6. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai du pouvoir immunogène (section 2-3-2.) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

Vaccins

**01/2008:1939**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA LEPTOSPIROSE BOVINE

## Vaccinum leptospirosis bovinae inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la leptospirose bovine est une préparation d'organismes entiers inactivés et/ou d'extrait(s) antigénique(s) d'une ou de plusieurs souches appropriées d'une ou de plusieurs *Leptospira borgpetersenii* sérovar hardjo, *Leptospira interrogans* sérovar hardjo, ou d'autres sérovars de *L. interrogans*, inactivées en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des bovins contre la leptospirose.

2. PRODUCTION

2-1. *PREPARATION DU VACCIN*

La semence est cultivée dans un milieu approprié, chaque souche faisant l'objet d'une culture séparée. Des paramètres tels que le taux de croissance sont contrôlés en cours de production par des méthodes appropriées ; les valeurs mesurées se situent dans les limites établies pour le vaccin considéré. La pureté et l'identité des cultures sont vérifiées sur la récolte par des méthodes appropriées. Après culture, les bactéries récoltées sont inactivées par une méthode appropriée. L'antigène peut être concentré. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des bovins auxquels il est destiné.
Les essais décrits ci-après sous Innocuité (2-2-1) et Pouvoir immunogène (section 2-2-2) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-2-1. **Innocuité**

2-2-1-1. *Essais de laboratoire*. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination et pour les bovins de chacune des catégories auxquelles le vaccin est destiné (par exemple, jeunes veaux, vaches gestantes). Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin.

2-2-1-1-1. Innocuité générale. Pour chaque essai, utilisez au minimum 10 bovins exempts d'anticorps dirigés contre *L. borgpetersenii* sérovar hardjo et les principaux sérovars de *L. interrogans* (icterohaemorrhagiae, canicola, grippotyphosa, sejroe, hardjo, hebdomonadis, pomona, australis et autumnalis). Administrez à chaque bovin une double dose de vaccin. Si le schéma de vaccination recommandé comprend l'administration d'une 2$^{nde}$ dose, administrez une dose supplémentaire à chaque bovin, après le délai indiqué. Observez les bovins au moins une fois par jour pendant au moins 14 jours après la dernière administration. Enregistrez les températures corporelles le jour précédant chaque vaccination, au moment de la vaccination, 4 h après celle-ci, puis journellement pendant 4 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun bovin ne présente de réaction anormale, locale ou générale, de signes de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

2-2-1-1-2. Innocuité chez la vache gestante. Si le vaccin est destiné aux vaches gestantes ou s'il peut leur être administré, utilisez au minimum 10 vaches aux étapes pertinentes de la gestation. Administrez à chaque vache une double dose de vaccin. Si le schéma de vaccination recommandé comprend l'administration d'une 2$^{nde}$ dose, administrez à chaque vache une dose supplémentaire après le délai indiqué. Observez les vaches au moins une fois par jour jusqu'à un jour après la mise

bas. Enregistrez les températures corporelles le jour précédant chaque vaccination, au moment de la vaccination, 4 h après celle-ci puis journellement pendant 4 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucune vache ne présente de réaction anormale, locale ou générale, de signes de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-2-1-2. *Essais sur le terrain*. Les bovins utilisés pour les essais sur le terrain sont également utilisés pour évaluer l'innocuité. Utilisez au moins 3 groupes de 20 bovins avec des groupes témoins correspondants d'au moins 10 bovins de 3 élevages différents. Examinez les sites d'injection pour déceler la présence de réactions locales après vaccination. Enregistrez les températures corporelles le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination et les 2 jours suivants.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des bovins ne présente de signes de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin. De plus, si le vaccin est destiné aux femelles gestantes, aucune réaction secondaire n'est observée, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-2-2. **Pouvoir immunogène**. Effectuez un essai pour chaque sérovar contre lequel un effet bénéfique sur les taux d'infection et sur l'excrétion urinaire est revendiqué. S'il doit être revendiqué une protection contre les pertes liées à la reproduction ou à la production, des études spécifiques supplémentaires seront exigées.

Effectuez chaque essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des bovins de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Le vaccin administré à chaque bovin a une activité minimale.

2-2-2-1. *Pouvoir immunogène contre L. borgpetersenii serovar hardjo*. Utilisez au moins 15 bovins exempts d'anticorps dirigés contre *L. borgpetersenii* sérovar hardjo et les principaux sérovars de *L. interrogans* (icterohaemorrhagiae, canicola, grippotyphosa, sejroe, hardjo, hebdomonadis, pomona, australis et autumnalis). Administrez le vaccin à au moins 10 bovins selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 5 autres comme témoins. 21 jours après la dernière vaccination, soumettez tous les bovins à une épreuve virulente en leur administrant par une voie muqueuse appropriée une quantité suffisante de souche virulente du sérovar correspondant. Observez les bovins au moins une fois par jour pendant 35 jours supplémentaires. Effectuez des prélèvements d'urine sur chaque bovin aux jours 0, 14, 21, 28 et 35 après l'épreuve. Euthanasiez les bovins survivants à la fin de la période d'observation. Effectuez un examen post-mortem sur tout bovin qui meurt pendant la période d'observation et sur ceux qui sont euthanasiés à l'issue de cette période. Examinez les reins en particulier, pour déceler des signes macroscopiques et microscopiques d'infection par leptospires. Prélevez un échantillon de chaque rein. Chaque échantillon d'urine et de rein est soumis à l'essai pour détecter la présence des organismes de l'épreuve par réisolation ou par toute autre méthode appropriée.

Pour l'essai réalisé avec *L. borgpetersenii* sérovar hardjo, les bovins témoins sont considérés comme infectés si les organismes de l'épreuve sont réisolés à partir d'au moins 2 échantillons. L'essai n'est pas valable si moins de 80 pour cent des bovins témoins présentent une infection.

Le vaccin satisfait à l'essai si les organismes de l'épreuve sont récupérés à partir d'échantillons d'urine ou de rein d'au plus 20 pour cent des bovins vaccinés.

2-2-2-2. *Pouvoir immunogène contre les autres leptospires*. Pour d'autres leptospires que *L. borgpetersenii* sérovar hardjo, l'essai est effectué comme décrit dans 2-2-2-1 mais les échantillons d'urine sont prélevés aux jours appropriés, déterminés en utilisant les caractéristiques du modèle d'épreuve. Dans le cas des sérovars pour lesquels des données publiées indiquent un moindre tropisme vis-à-vis du tractus urinaire, un taux d'infection inférieur peut être justifié. D'autres tissus/fluides corporels peuvent être utilisés en fonction du tropisme de certains sérovars de leptospires pour établir si les bovins sont infectés ou non par l'organisme d'épreuve.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-5) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Pour chaque sérovar pour lequel une protection immunitaire est revendiquée, mesurez la réponse en anticorps des animaux vaccinés. Utilisez au moins 12 cobayes pesant 250-350 g exempts d'anticorps dirigés contre *L. borgpetersenii* sérovar hardjo, et contre les principaux sérovars de *L. interrogans* (icterohaemorrhagiae, canicola, grippotyphosa, sejroe, hardjo, hebdomonadis, pomona, australis et autumnalis) et provenant d'une source régulièrement contrôlée et certifiée exempte de leptospire. La dose à administrer aux cobayes correspond à la fraction d'une dose pour bovins qui a été démontrée satisfaisante en ce qui concerne la sensibilité de l'essai obtenu lors des études de validation. Vaccinez 10 cobayes avec la dose appropriée et gardez-en au moins 2 autres comme témoins. A un temps donné, entre 19-23 jours après la dernière injection, prélevez du sang de chaque cobaye et préparez des échantillons de sérum. Utilisez un essai validé approprié tel que l'essai de micro-agglutination pour mesurer les anticorps dans chaque échantillon.

Le vaccin satisfait à l'essai si les taux d'anticorps obtenus sont supérieurs ou égaux à ceux obtenus avec un lot ayant donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité et il n'y a aucune augmentation significative du titre des anticorps chez les témoins.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Injecté à des animaux sains exempts d'anticorps spécifiques dirigés contre les sérovars de leptospires présents dans le vaccin, le vaccin stimule la production de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Pour les vaccins recommandés pour les bovins âgés de plus de 6 mois, utilisez des bovins ayant au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination et ayant au moins 6 mois. Pour les vaccins recommandés pour les bovins âgés de moins de 6 mois, utilisez des bovins de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Utilisez 2 bovins exempts d'anticorps dirigés contre les sérovars de leptospires présents dans le vaccin. Administrez à chaque bovin par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les bovins au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des bovins ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Bactéries vivantes résiduelles**. Effectuez la recherche de leptospires vivantes en ensemençant un milieu spécifique. Inoculez 1 mL de vaccin dans 100 mL de milieu. Faites incuber à 30 °C pendant 14 jours, puis effectuez une subculture dans un milieu neuf. Faites incuber les 2 cultures à 30 °C pendant 14 jours. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne se développe de leptospires dans aucun des milieux. Effectuez simultanément un contrôle en inoculant, en plus du vaccin à examiner, une quantité de culture contenant environ 100 leptospires dans une quantité de milieu neuf et faites incuber à 30 °C. L'essai n'est pas valable s'il ne se produit pas une croissance de leptospires au cours des 14 jours d'observation.

3-5. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai du pouvoir immunogène (section 2-2-2) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:0447**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA LEPTOSPIROSE CANINE

## Vaccinum leptospirosis caninae inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la leptospirose canine est une préparation d'organismes entiers inactivés et/ou d'extrait(s) antigénique(s) d'une ou de plusieurs souches appropriées d'un ou de plusieurs *Leptospira interrogans* sérovars canicola ou sérovar icterohaemorrhagiae ou tout autre sérovar d'intérêt épidémiologique approprié, inactivées en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des chiens contre la leptospirose.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

La semence est cultivée dans un milieu approprié, chaque souche faisant l'objet d'une culture séparée. Des paramètres tels que le taux de croissance sont contrôlés en cours de production par des méthodes appropriées ; les valeurs mesurées se situent dans les limites établies pour le vaccin considéré. La pureté et l'identité des cultures sont vérifiées sur la récolte par des méthodes appropriées. Après culture, les bactéries récoltées sont inactivées par une méthode appropriée. L'antigène peut être concentré. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des chiens auxquels il est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (2-2-1) et Pouvoir immunogène (section 2-2-2) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-2-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination et pour les chiens de chacune des catégories auxquelles le vaccin est destiné. Utilisez un lot de vaccin contenant au moins la teneur maximale en antigène et/ou l'activité maximale susceptibles d'être contenues dans les lots de vaccin.

2-2-1-1. *Innocuité générale*. Pour chaque essai, utilisez au minimum 10 chiens exempts d'anticorps dirigés contre les principaux sérovars de *L. interrogans* (icterohaemorrhagiae, canicola, grippotyphosa, sejroe, hardjo, hebdomonadis, pomona, australis et autumnalis). Administrez à chaque chien une double dose de vaccin. Si le schéma de vaccination recommandé comprend l'administration d'une seconde dose, administrez une dose supplémentaire à chaque chien, après le délai indiqué. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 14 jours après la dernière administration. Enregistrez les températures corporelles le jour précédant chaque vaccination, au moment de la vaccination, 4 h après celle-ci, puis journellement pendant 4 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun chien ne présente de réaction anormale, locale ou générale, de signes de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

2-2-1-2. *Innocuité chez la chienne gestante*. Si le vaccin est destiné aux chiennes gestantes ou s'il peut leur être administré, utilisez au minimum 10 chiennes gestantes au stade de gestation recommandé ou à plusieurs stades selon le schéma recommandé. Administrez à chaque chienne une double dose de vaccin. Si le schéma de vaccination recommandé comprend l'administration d'une seconde dose, administrez une dose supplémentaire à chaque chienne, après le délai indiqué. Observez les chiennes au moins une fois par jour jusqu'à un jour après la mise bas.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucune chienne ne présente de réaction anormale, locale ou générale, de signes de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-2-2. **Pouvoir immunogène**. Pour chacun des types de sérovar contre lesquels une protection immunitaire est revendiquée sur l'étiquette, effectuez un essai séparé avec une souche d'épreuve représentative du (ou des) sérovar(s) concerné(s).

Effectuez chaque essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées pour la vaccination, en utilisant dans chaque cas des chiens de l'âge minimal recommandé. Le vaccin administré à chaque chien a une teneur minimale en antigène et/ou une activité minimale.

Utilisez au moins 12 chiens exempts d'anticorps dirigés contre les principaux sérovars de *L. interrogans* (icterohaemorrhagiae, canicola, grippotyphosa, sejroe, hardjo, hebdomonadis, pomona, australis et autumnalis). Administrez le vaccin à au moins 6 chiens, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 6 autres comme témoins. Après 25-28 jours, soumettez tous les chiens à une épreuve virulente en leur administrant par voie conjonctivale et/ou intrapéritonéale une quantité suffisante d'une souche virulente du sérovar pertinent de *L. interrogans*. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 28 jours à compter de l'épreuve. Examinez les chiens quotidiennement, relevez et attribuez une note aux signes observés à l'issue de l'épreuve et notez également les morts survenant à l'issue de l'épreuve. Si un chien présente des signes marqués de la maladie, il est euthanasié. Contrôlez les températures corporelles chaque jour pendant la première semaine suivant l'épreuve. Prélevez des échantillons de sang sur les chiens aux jours 0, 2, 3, 4, 5, 8 et 11 après l'épreuve. Prélevez des échantillons d'urine sur les chiens aux jours 0, 3, 5, 8 ,11, 14, 21 et 28 après l'épreuve. Euthanasiez les chiens survivants à la fin de la période d'observation. Effectuez un examen post-mortem sur tout chien qui meurt pendant la période d'observation et sur ceux qui sont euthanasiés à l'issue de cette période. Examinez les reins et le foie en particulier, pour déceler des signes macroscopiques et microscopiques d'infection par leptospires. Prélevez un échantillon de chaque rein. Soumettez à l'essai chaque échantillon de sang, d'urine et de rein pour détecter la présence des organismes de l'épreuve par réisolement ou par toute autre méthode appropriée. Analysez également les prélèvements sanguins afin de déceler des modifications biochimiques ou hématologiques indiquant une infection. Attribuez une note aux résultats obtenus.

L'essai n'est pas valable si : les résultats sont positifs au jour 0 ; la souche d'épreuve du sérovar de *L. interrogans* est récupérée ou sa présence est démontrée par une autre méthode appropriée, à partir de moins de 2 échantillons, prélevés à moins de 2 jours de différence, afin de démontrer que moins de 80 pour cent des chiens témoins sont infectés.

Le vaccin satisfait à l'essai si : au moins 80 pour cent des chiens vaccinés présentent tout au plus des signes bénins de la maladie (par exemple hyperthermie passagère) et, en fonction du sérovar de *L. interrogans* utilisé pour l'épreuve, une ou plusieurs observations sont faites parmi les suivantes :

– si le vaccin est destiné à avoir un effet bénéfique sur les signes de maladie, les notes cliniques, biochimiques et hématologiques des chiens vaccinés sont statistiquement inférieures à celles des chiens témoins,
– si le vaccin est destiné à avoir un effet bénéfique sur l'infection, le nombre de jours durant lesquels des microorganismes sont détectés dans le sang chez les chiens vaccinés est statistiquement inférieur à celui observé chez les chiens témoins,

Vaccins

– si le vaccin est destiné à avoir un effet bénéfique sur l'infection des voies urinaires et sur l'excrétion, le nombre de jours durant lesquels des microorganismes sont détectés dans l'urine et le nombre d'échantillons de reins dans lesquels des microorganismes sont détectés chez les chiens vaccinés sont statistiquement inférieurs à ceux observés chez les chiens témoins.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-5.) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. Les essais suivants peuvent être effectués.

2-3-1-1. *Pour les vaccins avec ou sans adjuvants*. Si des leptospires de plus de un sérovar (par exemple *L. interrogans* sérovar canicola et sérovar icterohaemorrhagiae) sont utilisées pour préparer le vaccin, effectuez un essai d'activité pour chaque sérovar pour lequel une protection immunitaire est revendiquée sur l'étiquette. Utilisez 10 hamsters en bonne santé, âgés d'au maximum 3 mois, ne possédant pas d'anticorps dirigés contre les principaux sérovars de *L. interrogans* (icterohaemorrhagiae, canicola, grippotyphosa, sejroe, hardjo, hebdomonadis, pomona, australis et autumnalis) et provenant d'une source régulièrement controlée et certifiée exempte de leptospire. Administrez 1/40 de la dose pour chiens par la voie sous-cutanée à 5 hamsters et gardez-en au minimum 5 autres comme témoins. Après 15-20 jours, soumettez tous les hamsters à une épreuve virulente en leur administrant par voie intrapéritonéale une quantité suffisante de culture virulente de leptospires du sérovar pour lequel une protection immunitaire est revendiquée sur l'étiquette. Le vaccin satisfait à l'essai si au moins 4 des 5 hamsters témoins meurent en présentant des signes typiques d'infection par leptospires dans les 14 jours suivant l'inoculation de la suspension de l'épreuve et si au moins 4 des 5 hamsters vaccinés demeurent en bonne santé pendant les 14 jours suivant la mort des 4 hamsters témoins.

2-3-1-2. *Pour les vaccins avec ou sans adjuvants*. Un essai approprié validé de séroréponse peut être effectué. Vaccinez chaque animal d'un groupe d'animaux de laboratoire avec une dose appropriée. Prélevez des échantillons de sang après la vaccination, à l'issue d'une période de temps fixée appropriée. Pour chacun des sérovars présents dans le vaccin, un essai *in vitro* est effectué sur des prélèvements sanguins individuels pour déterminer la réponse en anticorps à un (ou plusieurs) composant(s) antigénique(s) constituant des indicateurs de protection et spécifiques du sérovar concerné. Les critères d'acceptation sont fixés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité.

2-3-1-3. *Pour les vaccins sans adjuvants*. Pour chacun des sérovars présents dans le vaccin, un essai *in vitro* approprié validé peut être effectué pour déterminer la teneur en un (ou plusieurs) composant(s) antigénique(s) constituant des indicateurs de protection et spécifiques du sérovar concerné. Les critères d'acceptation sont fixés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Injecté à des animaux sains exempts d'anticorps dirigés contre les sérovars de leptospires présents dans le vaccin, le vaccin stimule la production de tels anticorps. Si l'essai d'activité 2-3-1-3 est effectué sur chaque lot, il sert également à identifier le vaccin.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 chiens de l'âge minimal recommandé pour la vaccination, exempts d'anticorps dirigés contre les principaux sérovars de *L. interrogans* (icterohaemorrhagiae, canicola, grippotyphosa, sejroe, hardjo, hebdomonadis, pomona, australis et autumnalis). Administrez à chaque chien par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des chiens ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Bactéries vivantes résiduelles**. Effectuez la recherche de leptospires vivantes en ensemençant un milieu spécifique. Inoculez 1 mL de vaccin dans 100 mL de milieu. Faites incuber à 30 °C pendant 14 jours, puis effectuez une subculture dans un milieu neuf. Faites incuber les 2 cultures à 30 °C pendant 14 jours. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne se développe de leptospires dans aucun des milieux. Effectuez simultanément un contrôle en inoculant, en plus du vaccin à examiner, une quantité de culture contenant environ 100 leptospires dans une quantité de milieu neuf et faites incuber à 30 °C. L'essai n'est pas valable s'il ne se produit pas une croissance de leptospires au cours des 14 jours d'observation.

3-5. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai du pouvoir immunogène (section 2-3-2.) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:1321**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA LEUCOSE FÉLINE

## Vaccinum leucosis felinae inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la leucose féline est une préparation d'immunogènes provenant d'une souche appropriée du virus de la leucose féline. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des chats contre la leucose féline.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Les immunogènes sont constitués soit par une souche appropriée du virus de la leucose féline inactivée en maintenant des propriétés immunogènes appropriées, soit d'une fraction du virus de la leucose féline ayant des propriétés immunogènes appropriées ; la fraction antigénique peut être préparée par la méthode dite de l'ADN recombinant. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des chats auxquels il est destiné (y compris l'innocuité chez la chatte gestante si le vaccin n'est pas contre-indiqué chez ces chattes).
Les essais décrits ci-après sous Innocuité (2-2-1) et Pouvoir immunogène (section 2-2-2) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-2-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées en utilisant dans chaque cas des chats exempts d'anticorps dirigés contre l'antigène gp 70 du virus de la leucose féline et ne présentant ni virémie ni antigénémie au moment de l'essai ; l'absence d'anticorps et d'antigènes est démontrée par des essais d'immunoadsorption à enzyme conjuguée (*2.7.1*). Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin.

2-2-1-1. *Administration unique du vaccin*. Utilisez au moins 15 chats de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Administrez le vaccin à au moins 10 chats, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 5 autres comme

Vaccins

témoins. Enregistrez la température rectale de chaque chat le jour précédant chaque vaccination, au moment de chaque vaccination, 4 et 8 heures après et une fois par jour les 4 jours suivants. Observez les chats au moins une fois par jour pendant pas moins de 4 semaines après la dernière vaccination. 1, 2 et 4 semaines après la dernière vaccination, soumettez les chats à des essais appropriés en vue de mettre en évidence un effet immunosuppresseur.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des chats ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si, pour la recherche d'un effet immunosuppresseur, aucune différence significative n'est observée chez les chats vaccinés par rapport aux témoins.

2-2-1-2. *Administration répétée du vaccin*. Utilisez au moins 10 chats de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Administrez à chaque chat 2 doses recommandées du vaccin. Au bout du temps indiqué sur le mode d'emploi, injectez une dose de vaccin à chaque chat. Si le mode d'emploi le spécifie, procédez à une 3^e^ administration en respectant le délai indiqué. Observez les chats au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun chat ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

2-2-1-3. *Essai chez la chatte gestante*. S'il n'y a pas de contre-indication du vaccin chez la chatte gestante, utilisez au moins 10 chattes à divers stades de la gestation. Administrez à chaque chatte 2 doses du vaccin. Observez les chattes au moins une fois par jour jusqu'à la mise bas.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucune chatte ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-2-2. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des chats de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Le vaccin administré à chaque chat a une activité minimale.

Utilisez au moins 25 chats exempts d'anticorps dirigés contre les antigènes du virus de la leucose féline et contre l'antigène de membrane de l'oncogène félin (anticorps anti-FOCMA) et ne présentant ni virémie ni antigénémie au moment de l'essai. Administrez le vaccin à au moins 15 chats, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 10 autres comme témoins. Après 14 jours, soumettez tous les chats à une épreuve virulente en leur administrant par voie péritonéale ou par voie oronasale, à une ou plusieurs reprises, une quantité suffisante de suspension d'une forme virulente du virus de la leucose féline d'intérêt épidémiologique et constituée principalement de virus de type A. Observez les chats au moins une fois par jour pendant 15 semaines à compter de l'épreuve et à partir de la 3^e^ semaine, procédez chaque semaine à une recherche de la virémie ou de l'antigénémie (protéine p27) par une méthode appropriée telle que l'immunofluorescence sur leucocytes circulants ou un essai d'immuno-adsorption à enzyme conjuguée. Est considéré comme infecté de manière persistante tout chat présentant entre la 3^e^ et la 15^e^ semaine une virémie ou une antigénémie positives pendant 3 semaines consécutives ou à 5 reprises (consécutives ou non) pendant cette période.

L'essai n'est pas valable si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, moins de 80 pour cent des chats témoins présentent une virémie ou une antigénémie persistante. Le vaccin satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, au moins 80 pour cent des chats vaccinés ne présentent pas d'infection persistante.

2-3. *CONTRÔLES EN COURS DE PRODUCTION*

En cours de production, des contrôles immunochimiques appropriés sont effectués pour évaluer la qualité et la pureté des antigènes viraux entrant dans la composition du vaccin. Les valeurs trouvées se situent dans les limites approuvées pour le vaccin donné.

2-4. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-4-1. **Virus vivant résiduel**. Le cas échéant, la recherche de virus vivant résiduel est effectuée en utilisant une quantité de récolte virale inactivée équivalant à au moins 25 doses de vaccin ; 2 passages sont effectués sur le même type de cellules que celles utilisées pour la production du vaccin ou dans un système cellulaire au moins aussi sensible. La récolte virale inactivée satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté.

2-4-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-5) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité.

2-4-3. **Endotoxines bactériennes**. Pour les vaccins produits par la méthode de l'ADN recombinant sur une cellule hôte bactérienne comme *Escherichia coli*, un essai d'endotoxines bactériennes (*2.6.14*) est effectué sur chaque lot final ou, si la nature de l'adjuvant le rend impossible, sur l'antigène immédiatement avant l'addition de l'adjuvant. La valeur trouvée se situe dans la limite établie pour le vaccin donné selon des critères d'innocuité pour le chat.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Injecté à des chats sains, exempts d'anticorps spécifiques dirigés contre le ou les antigènes indiqués sur l'étiquette, le vaccin stimule la production de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 chats de l'âge minimal recommandé pour la vaccination, exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la leucose féline. Administrez à chaque chat par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les chats au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des chats ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Virus vivant résiduel**. Si le vaccin contient du virus inactivé, effectuez une recherche de virus de la leucose féline vivant en utilisant 2 passages dans un système cellulaire sensible. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun virus n'est détecté. Si le vaccin contient un adjuvant, séparez si possible l'adjuvant de la phase liquide par une méthode qui n'inactive pas le virus ni n'interfère autrement avec la détection du virus.

3-5. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-2-2) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:0744**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA MALADIE D'AUJESZKY POUR LE PORC

## Vaccinum morbi Aujeszkyi ad suem inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la maladie d'Aujeszky pour le porc est une préparation d'une souche appropriée du virus de la maladie d'Aujeszky, inactivée en maintenant des propriétés immunogènes appropriées ou une préparation d'une fraction inactivée de ce virus ayant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des porcs et à la protection passive de leur progéniture contre la maladie d'Aujeszky.

Vaccins

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est cultivé en cultures cellulaires. La suspension virale est récoltée et inactivée. Le virus peut subir une fragmentation et les fragments peuvent être purifiés et concentrés. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des porcs auxquels il est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1) et Pouvoir immunogène (section 2-3-2) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**.

2-3-1-1. *Essais de laboratoire*. Effectuez les essais pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées et le cas échéant, pour les porcs de chacune des catégories auxquelles le vaccin est destiné (truies, porcs charcutiers). Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccins.

2-3-1-1-1. Innocuité générale. Pour chaque essai, utilisez au minimum 10 porcs exempts d'anticorps dirigés contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky. Administrez à chaque porc une double dose de vaccin, puis une dose après 14 jours. Observez les porcs au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de la dernière administration.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des porcs ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin pendant les 28 jours de l'essai.

2-3-1-1-2. Innocuité chez la truie gravide. Si le vaccin est destiné à la truie gravide, utilisez au minimum 10 truies gravides au stade de gestation recommandé ou à plusieurs stades selon le schéma recommandé. Administrez à chaque truie une double dose de vaccin, puis une dose après 14 jours. Observez les truies au moins une fois par jour jusqu'à la mise bas.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucune des truies ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-3-1-1-3. Innocuité chez les porcs utilisés dans les essais 2-3-2 du pouvoir immunogène. Les porcs utilisés dans les essais du pouvoir immunogène sont également utilisés pour évaluer l'innocuité. Relevez la température rectale de chaque porc vacciné au moment de la vaccination puis 6 h, 24 h et 48 h plus tard. Recherchez la présence de réactions locales au site d'injection lors de l'abattage.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun porc ne présente :

– une élévation de température supérieure à 1,5 °C et le nombre de porcs qui présentent une température supérieure à 41 °C ne dépasse pas 10 pour cent du groupe ;

– aucune autre réaction générale (par exemple, anorexie) ;

– aucune réaction locale anormale attribuable au vaccin.

2-3-1-2. *Essais sur le terrain*. Les porcs utilisés pour les essais sur le terrain sont également utilisés pour évaluer l'innocuité. Effectuez un essai pour chaque catégorie de porcs auxquels le vaccin est destiné (truies, porcs charcutiers). Utilisez au minimum 3 groupes d'au moins 20 porcs avec des groupes correspondants d'au moins 10 témoins. Relevez la température rectale de chaque porc vacciné au moment de la vaccination puis 6 h, 24 h et 48 h plus tard. Recherchez la présence de réactions locales au site d'injection lors de l'abattage.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun porc ne présente :

– une élévation de température supérieure à 1,5 °C et le nombre de porcs qui présentent une température supérieure à 41 °C ne dépasse pas 25 pour cent du groupe ;

– aucune réaction locale anormale attribuable au vaccin.

2-3-2. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des porcs de l'âge recommandé pour la vaccination. Le vaccin administré à chaque porc a une activité minimale.

2-3-2-1. *Vaccins destiné à l'immunisation active*. Utilisez au moins 15 porcs charcutiers exempts d'anticorps dirigés contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky. La masse corporelle d'aucun porc ne s'écarte de la masse moyenne du groupe de plus de 20 pour cent. Administrez le virus vaccinal à au moins 10 porcs, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 5 autres comme témoins. A la fin de la période d'engraissement (80-90 kg), pesez et soumettez tous les porcs à une épreuve virulente en leur administrant par voie intranasale une quantité suffisante d'une forme virulente du virus de la maladie d'Aujeszky (une épreuve au moyen d'au moins $10^6$ $DICC_{50}$, dans au moins 4 mL de diluant, d'une souche ayant subi au maximum 3 passages s'est avérée appropriée). Déterminez le titre en virus excrété dans des écouvillonnages de la cavité nasale de chaque porc journellement à partir du jour avant l'épreuve et jusqu'à ce que le virus ne soit plus décelé. 7 jours après l'épreuve virulente ou au moment de la mort si celle-ci survient plus tôt, pesez chaque porc et calculez le gain moyen quotidien pour cent. Calculez la moyenne des gains moyens quotidiens pour le groupe des porcs vaccinés et pour celui des porcs témoins.

L'essai n'est valable que si tous les témoins présentent des signes de la maladie d'Aujeszky et la moyenne de leurs gains moyens quotidiens est inférieure à – 0,5 kg. Le vaccin satisfait à l'essai si :

– tous les porcs vaccinés survivent et la différence entre les moyennes des gains moyens quotidiens des 2 groupes est d'au moins 1,5 kg,

– la moyenne géométrique des titres et la durée d'excrétion du virus d'épreuve sont réduites de façon significative chez les porcs vaccinés par rapport aux porcs témoins.

2-3-5-2. *Vaccins destinés à l'immunisation passive*. Si le vaccin est recommandé pour la protection passive des porcelets par vaccination de la truie, la conformité de la souche à cette fin peut être démontrée par l'essai suivant.

Utilisez au moins 12 truies exemptes d'anticorps dirigés contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky. Administrez le virus vaccinal à au moins 8 truies, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 4 autres comme témoins. A l'âge de 6-10 jours, soumettez tous les porcelets issus des truies vaccinées à une épreuve virulente en leur administrant une quantité suffisante d'une forme virulente du virus de la maladie d'Aujeszky. Observez les porcelets au moins une fois par jour pendant 21 jours.

L'essai n'est valable que si le nombre moyen de porcelets par portée est d'au moins 6. Le vaccin satisfait à l'essai s'il produit un taux de protection contre la mortalité d'au minimum 80 pour cent par comparaison avec les témoins.

2-4. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-4-1. **Virus vivant résiduel**. La recherche de virus vivant résiduel s'effectue au moyen de 2 passages sur le même type de cultures cellulaires que celui qui a été utilisé dans la production du vaccin ou sur des cellules démontrées au moins aussi sensibles. La quantité de récolte virale inactivée utilisée dans cet essai correspond à au moins 25 doses de vaccin. La récolte virale inactivée satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté.

2-4-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-6) pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. L'essai décrit sous Activité est effectué, pour un vaccin donné, une ou plusieurs fois, selon les modalités décidées par ou avec l'accord de l'Autorité compétente. Lorsque cet essai n'est pas effectué, une méthode alternative validée est utilisée, les critères d'acceptation étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Administré à des animaux exempts d'anticorps contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky, le vaccin stimule la formation d'anticorps spécifiques contre le virus de la maladie d'Aujeszky ou contre la fraction du virus utilisée pour la préparation du vaccin.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez au moins 2 porcelets de l'âge minimal recommandé pour la vaccination et exempts d'anticorps dirigés contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky. Administrez à chaque porcelet par une voie recommandée une double dose de vaccin puis une dose de vaccin après 14 jours. Observez les porcelets au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de la dernière administration.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des porcelets ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Virus vivant résiduel**. Dans tous les cas possibles, effectuez une recherche appropriée de virus résiduel vivant de la maladie d'Aujeszky en effectuant 2 passages sur le même type de cultures cellulaires que celui qui a été utilisé dans la production du vaccin ou sur des cellules démontrées au moins aussi sensibles. Dans les autres cas, injectez une dose de vaccin à chacun de 5 lapins non immuns et en bonne santé, par voie sous-cutanée. Observez les lapins au moins une fois par jour pendant les 14 jours qui suivent l'injection. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne se produit aucune réaction anormale (en particulier pas de prurit local). Dans le cas où la souche vaccinale n'est pas pathogène pour le lapin, effectuez l'essai sur 2 moutons.

3-5. **Agents étrangers**. Sur les porcs ayant servi à l'essai d'innocuité, effectuez une recherche d'anticorps. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne provoque pas l'apparition d'anticorps, autres que ceux contre le virus de la maladie d'Aujeszky, contre des virus pathogènes pour le porc ou contre des virus qui pourraient interférer avec le diagnostic de maladies infectieuses du porc (y compris les virus du groupe des pestivirus).

3-6. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai décrit ci-après lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

Utilisez au moins 10 porcs pesant de 15-35 kg, exempts d'anticorps dirigés contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky. La masse corporelle d'aucun porc ne s'écarte de la masse moyenne du groupe de plus de 25 pour cent. Administrez une dose de vaccin à au moins 5 porcs et gardez-en au minimum 5 autres comme témoins. Après 3 semaines, pesez tous les porcs, puis soumettez-les à une épreuve virulente en leur administrant par voie intranasale une quantité suffisante d'une forme virulente du virus de la maladie d'Aujeszky. 7 jours après l'épreuve virulente ou au moment de la mort si celle-ci survient plus tôt, pesez chaque porc et calculez le gain moyen quotidien pour cent. Calculez la moyenne des gains moyens quotidiens pour le groupe des porcs vaccinés et pour celui des porcs témoins.

L'essai n'est valable que si tous les porcs témoins présentent des signes de la maladie d'Aujeszky et si la moyenne de leurs gains moyens quotidiens est inférieure à – 0,5 kg. Le vaccin satisfait à l'essai si tous les porcs vaccinés survivent et si la différence entre les moyennes des gains moyens quotidiens des 2 groupes est d'au moins 1,1 kg.

4. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique si la souche vaccinale est pathogène ou non pour le lapin.

**01/2008:1202**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA MALADIE DES OEUFS HARDÉS

## Vaccinum morbi partus diminutionis MCMLXXVI inactivatum ad pullum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la maladie des oeufs hardés est une préparation d'une souche appropriée de virus de la maladie des oeufs hardés (adénovirus hémagglutinant aviaire), inactivée en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à la protection des oiseaux de ponte contre la chute de ponte et/ou la prévention de la diminution de la qualité des oeufs.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus est cultivé sur oeufs de poule ou de cane embryonnés ou sur des cultures cellulaires. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Oeufs de poule ou de cane embryonnés**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poule ou de cane embryonnés, ils proviennent d'un élevage sain.

2-2-2. **Cultures cellulaires**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des cultures cellulaires, elles satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *LOTS DE SEMENCE*

2-3-1. **Agents étrangers**. Le lot de semence primaire satisfait à l'essai des agents étrangers dans les lots de semence (*2.6.24*). Lors de ces essais sur le lot de semence primaire, utilisez des organismes n'ayant pas subi, en début d'essai, plus de 5 passages depuis le lot de semence primaire.

2-4. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des oiseaux auxquels il est destiné.

L'essai décrit ci-après sous Pouvoir immunogène (section 2-4-1) peut être utilisé pour établir l'efficacité.

2-4-1. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des poules pondeuses de l'âge recommandé pour la vaccination et provenant d'un élevage exempt de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*). Le vaccin administré à chaque poule a une activité minimale.

Vaccinez 2 groupes de 30 poules pondeuses. Gardez comme témoins un groupe de 10 poules et un groupe de 30 poules,

Vaccins

du même âge et de même origine que les poules vaccinées. Enregistrez les résultats de ponte de chaque poule depuis le début de la ponte jusqu'à 4 semaines après l'épreuve virulente.

A l'âge de 30 semaines, soumettez l'un des 2 groupes de poules vaccinées et le groupe de 10 témoins à une épreuve virulente, en administrant à chaque animal une quantité du virus de la maladie des oeufs hardés suffisante pour entraîner une baisse quantitative et/ou qualitative très marquée de la production d'oeufs. L'essai n'est valable que si une baisse quantitative et/ou qualitative très marquée de la production d'oeufs est observée chez les témoins. Le vaccin satisfait à l'essai si aucune baisse quantitative et/ou qualitative très marquée de la production d'oeufs n'est observée chez les poules vaccinées.

A l'approche de la fin de ponte, soumettez le second groupe de poules vaccinées et le groupe de 30 témoins à l'épreuve virulente, comme précédemment. Le vaccin satisfait à l'essai si aucune baisse quantitative et/ou qualitative marquée de la production d'oeufs n'est observée chez les poules vaccinées ; l'essai n'est valable que si une baisse quantitative et/ou qualitative très marquée de la production d'oeufs est observée chez les témoins.

Effectuez des essais sérologiques sur des échantillons de sérum prélevés au moment de la vaccination, 4 semaines plus tard et juste avant l'épreuve. L'essai n'est pas valable si des anticorps dirigés contre le virus de la maladie des oeufs hardés sont détectés dans un ou plusieurs des échantillons obtenus à partir des témoins.

2-5. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-5-1. **Virus vivant résiduel**. La recherche de virus vivant résiduel est effectuée soit sur des oeufs embryonnés de cane provenant d'un élevage exempt du virus de la maladie des oeufs hardés, soit sur des oeufs de poule embryonnés provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*), soit sur des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*), en choisissant le système le plus sensible pour la souche de virus vaccinal. La quantité de récolte virale inactivée utilisée correspond à au moins 10 doses de vaccin. La récolte virale inactivée satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté.

2-5-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-6) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Administrez 1 dose de vaccin, par l'une des voies recommandées, à au moins 10 poulets âgés de 14 à 28 jours, provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). 4 semaines plus tard, prélevez un échantillon de sérum sur chaque poulet et sur 5 témoins non vaccinés du même âge et de même origine. Mesurez la réponse en anticorps de chaque sérum au moyen d'un essai d'inhibition de l'hémagglutination (HA) en utilisant 4 unités HA d'antigène et des érythrocytes de poulet. L'essai n'est pas valable si le sérum des animaux non vaccinés contient des anticorps spécifiques. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre moyen en anticorps des poulets vaccinés n'est pas inférieur au titre obtenu auparavant avec un vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité.

## 3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le vaccin stimule la formation d'anticorps dirigés contre le virus de la maladie des oeufs hardés lorsqu'il est injecté à des poulets dépourvus de ces anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062).*

3-3. **Innocuité**. Utilisez 10 poulets âgés de 14 à 28 jours et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez à chaque poulet par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les poulets au moins une fois par jour pendant 21 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des oiseaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Virus vivant résiduel**. La recherche de virus vivant résiduel est effectuée pour confirmer l'inactivation du virus de la maladie des oeufs hardés.

A. Dans le cas d'un vaccin préparé sur oeufs, effectuez l'essai sur des oeufs embryonnés de cane provenant d'un élevage exempt du virus de la maladie des oeufs hardés ou, s'il est connu que les oeufs de poule donnent un système d'essai plus sensible, sur des oeufs de poule provenant d'un élevage exempt de microorganismes pathogènes spécifiés (*5.2.2*).

Injectez $2/5^e$ d'une dose de vaccin dans la cavité allantoïdienne de 10 oeufs âgés de 10 à 14 jours et exempts d'anticorps parentaux dirigés contre le virus de la maladie des oeufs hardés. Placez les oeufs en incubation et observez-les pendant 8 jours. Recueillez séparément le liquide allantoïdien des oeufs contenant des embryons vivants et celui des oeufs contenant des embryons morts, à l'exception de ceux qui meurent de causes non spécifiques dans les 24 h suivant l'injection.

Injectez 0,2 mL du liquide allantoïdien recueilli sur les oeufs contenant des embryons vivants dans la cavité allantoïdienne de 10 oeufs embryonnés âgés de 10 à 14 jours et exempts d'anticorps parentaux dirigés contre la maladie des oeufs hardés, et 0,2 mL du liquide allantoïdien recueilli sur les oeufs contenant des embryons morts à 10 oeufs semblables. Incubez les oeufs pendant 8 jours. Examinez le liquide allantoïdien de chaque oeuf pour détecter une éventuelle activité hémagglutinante à l'aide d'érythrocytes de poulet.

Si plus de 20 pour cent des embryons meurent à l'une des 2 phases de l'essai, répétez l'essai à partir de cette phase. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun signe d'activité hémagglutinante n'est détecté et si, lors de l'éventuelle répétition de l'essai, le nombre d'embryons morts de causes non spécifiques n'est pas supérieur à 20 pour cent.

Des antibiotiques peuvent être administrés au cours de l'essai pour prévenir toute infection bactérienne.

B. Dans le cas d'un vaccin préparé à partir de souches adaptées à la croissance sur cultures cellulaires, inoculez 10 doses de vaccin à des cultures cellulaires appropriées. Si le vaccin contient un adjuvant huileux, éliminez-le par une méthode appropriée. Faites incuber les cultures à 38 ± 1 °C pendant 7 jours, effectuez un passage et faites incuber les cellules à 38 ± 1 °C pendant 7 jours. Examinez les cellules à intervalles réguliers et à la fin de la période d'incubation effectuez une recherche d'activité hémagglutinante sur le surnageant. Le vaccin satisfait à l'essai s'il n'y a aucun signe d'infection des cultures cellulaires ni aucune activité hémagglutinante dans le surnageant

3-5. **Agents étrangers**. Utilisez les poulets de l'essai d'innocuité. 21 jours après l'administration de la double dose de vaccin, administrez 1 dose de vaccin à chaque poulet, par la même voie. 2 semaines plus tard, recueillez des échantillons de sérum sur chaque poulet et effectuez une recherche d'anticorps dirigés contre les agents suivants, par les méthodes prescrites dans le chapitre général *5.2.2. Elevages de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés pour la production et le contrôle de qualité des vaccins* : virus de l'encéphalomyélite aviaire, virus de la leucose aviaire, virus de la bronchite infectieuse, virus de la bursite infectieuse aviaire, virus de la laryngotrachéite infectieuse, virus grippal type A, virus de la maladie de Marek, virus de la pseudopeste aviaire (maladie de Newcastle) ; pour les vaccins produits dans des oeufs de cane, effectuez également une recherche d'anticorps dirigés contre *Chlamydia* (par un essai d'immunofluorescence ou de

Vaccins

séroneutralisation) et le virus de la maladie de Derzsy (par séroneutralisation). Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne stimule pas la formation d'anticorps dirigés contre les agents infectieux.

3-6. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai du Pouvoir immunogène (section 2-4-1) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

4 ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique si la souche contenue dans le vaccin est adaptée à la croissance sur embryons de poulet ou de canard ou sur des cultures cellulaires.

**01/2008:2325**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA MALADIE HÉMORRAGIQUE DU LAPIN

## Vaccinum morbi haemorrhagici cuniculi inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la maladie hémorragique du lapin est une préparation d'une souche appropriée du virus de la maladie hémorragique du lapin (RHDV, *Rabbit Haemorrhagic Disease Virus*), inactivée en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des lapins.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié sur des lapins. Les lapins doivent être sains, ne pas avoir été vaccinés contre le RHDV, être exempts d'anticorps dirigés contre le RHDV, ne pas avoir été traités avec des antibiotiques dans les 15 jours au moins précédant leur utilisation et provenir d'une unité d'élevage saine et contrôlée. Préparez une suspension à partir de préparations homogénéisées d'organes internes appropriés des lapins euthanasiés ou ayant succombé à l'infection dans les 120 h suivant l'inoculation. Le virus dans la suspension peut être purifié et concentré. Il est inactivé par une méthode appropriée.

2-2. *LOTS DE SEMENCE*

2-2-1. **Agents étrangers**. Chaque lot de semence primaire satisfait à l'essai des agents étrangers dans les lots de semence prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

2-3. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il est démontré que le vaccin possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des lapins auxquels il est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1) et Pouvoir immunogène (section 2-3-2) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**

2-3-1-1. *Innocuité générale*. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées. Utilisez au moins 10 lapins sains provenant du même élevage, ayant au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination et n'ayant pas d'anticorps dirigés contre le RHDV. Administrez à chaque lapin 2 doses de vaccin par une voie et une méthode recommandées. Observez les animaux pendant 21 jours. Relevez la température corporelle de chaque animal le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 4 h plus tard, puis quotidiennement pendant 4 jours ; notez pour chaque animal l'augmentation maximale de température. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des lapins ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin, si l'élévation moyenne de la température corporelle n'excède pas 1,5 °C pour tous les animaux et si aucun animal ne présente une élévation de température supérieure à 2 °C.

2-3-1-2. *Innocuité chez la femelle gestante*. Si le vaccin est recommandé pour les femelles gestantes, vaccinez au moins 10 lapines gestantes selon le schéma recommandé indiqué sur l'étiquette. Prolongez la période d'observation jusqu'à 1 jour après la mise bas. Le vaccin satisfait à l'essai si aucune lapine ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-3-2. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration indiquées sur l'étiquette. Utilisez au moins 15 lapins réceptifs sains âgés d'au minimum 10 semaines, n'ayant pas d'anticorps dirigés contre le RHDV, issus d'un même élevage sain et qui ont été élevés dans des conditions appropriées d'isolement qui assurent l'absence de contact avec le RHDV. Administrez 1 dose de vaccin à au moins chacun des 10 lapins, selon le mode d'emploi devant figurer sur l'étiquette. Gardez au moins 5 autres lapins comme témoins. Au moins 7 jours après la vaccination, soumettez chaque lapin à une épreuve virulente en leur administrant par une voie appropriée une quantité suffisante de souche virulente de RHDV pour provoquer l'apparition des signes de la maladie hémorragique du lapin chez un lapin réceptif. Observez les lapins pendant 14 jours supplémentaires.

L'essai n'est pas valable si moins de 80 pour cent des lapins témoins meurent en présentant des signes typiques de la maladie hémorragique du lapin dans les 120 h suivant l'épreuve.

Le vaccin satisfait à l'essai si au moins 90 pour cent des lapins vaccinés ne présentent aucun signe de la maladie hémorragique du lapin.

2-4. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-4-1. **Virus infectieux résiduel**. Une recherche du virus infectieux résiduel est effectuée sur la récolte en vrac de chaque lot en vue de confirmer l'inactivation du RHDV. Effectuez l'essai d'inactivation sur des lapins réceptifs sains, exempts d'anticorps dirigés contre le RHDV et issus d'un même élevage sain. Inoculez au moins 1 dose de 5 mL de suspension par une voie parentérale appropriée (sous-cutanée ou intramusculaire) à 5 lapins âgés d'au moins 10 semaines. Maintenez les lapins en observation pendant au moins 7 jours. A la fin de la période d'observation, euthanasiez les animaux et recherchez, à l'aide d'une méthode appropriée, la présence de RHDV sur des extraits hépatiques.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun lapin ne meurt et aucun antigène RHDV n'est décelable dans les foies.

2-4-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'activité (section 3-4) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité.

La méthode suivante est donnée à titre d'exemple. Administrez par voie intramusculaire 1 dose de vaccin à 5 lapins sains âgés de 10 semaines, exempts d'anticorps dirigés contre le RHDV et issus d'un même élevage sain. Maintenez 2 lapins comme témoins non vaccinés. Collectez les échantillons de sérum de chaque lapin juste avant l'administration du vaccin et après une période définie lorsque le vaccin de référence est testé ; déterminez le titre en anticorps de chaque sérum par une méthode sérologique appropriée, par exemple par ELISA. Les niveaux d'anticorps ne sont pas significativement inférieurs à ceux obtenus avec un lot ayant donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité.

L'essai n'est valable que si les sérums collectés chez les témoins non vaccinés et chez les lapins juste avant l'administration du vaccin sont exempts d'anticorps spécifiques décelables.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Injecté à des animaux réceptifs, le vaccin stimule la formation d'anticorps spécifiques contre le RHDV, décelables par un essai d'inhibition de l'hémagglutination ou par dosage immunoenzymatique.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062).*

3-3. **Innocuité et virus vivant résiduel**. Utilisez au moins 2 lapins sains, âgés d'au moins 10 semaines, n'ayant pas d'anticorps dirigés contre le RHDV et issus d'un même élevage sain. Administrez 2 doses de vaccin à chaque lapin, par une voie recommandée. Maintenez les lapins en observation pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun lapin ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-2), lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:1944**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA MANNHEIMIOSE BOVINE

## Vaccinum mannheimiae inactivatum ad bovinas

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la mannheimiose des bovins est une préparation à base de cultures d'une ou de plusieurs souches appropriées de *Mannheimia haemolytica* (anciennement *Pasteurella haemolytica*), inactivées en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des bovins d'âges variés contre les maladies respiratoires causées par *M. haemolytica*.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

La méthode de production du vaccin est fondée sur un système de lot de semence. La semence est cultivée dans un milieu approprié, chaque souche faisant l'objet d'une culture séparée dont l'identité est vérifiée par une méthode appropriée. Des paramètres tels que le taux de croissance sont contrôlés en cours de production par des méthodes appropriées ; les valeurs mesurées se situent dans les limites établies pour le vaccin considéré. La pureté et l'identité des récoltes sont vérifiées par des méthodes appropriées. Après culture, les suspensions bactériennes sont récoltées séparément et inactivées par une méthode appropriée. Le vaccin peut contenir un adjuvant.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Le choix de la composition du vaccin et des souches à inclure dans le vaccin est fondé sur les données épidémiologiques concernant la prévalence des différents sérovars de *M. haemolytica* et sur les indications déclarées du vaccin.

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des bovins auxquels il est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (2-2-1.) et Pouvoir immunogène (section 2-2-2.) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-2-1. **Innocuité**

2-2-1-1. *Essais de laboratoire*. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination et pour les bovins de chacune des catégories auxquelles le vaccin est destiné. Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin.

2-2-1-1-1. Innocuité générale. Pour chaque essai, utilisez au moins 10 bovins de préférence exempts d'anticorps spécifiques dirigés contre les sérovars de *M. haemolytica* ou contre la leucotoxine présents dans le vaccin. Dans les cas justifiés, des bovins n'ayant pas d'antécédents de vaccination contre des mannheimia et présentant de faibles titres en anticorps (mesurés selon une méthode d'essai sensible du type ELISA, par exemple) peuvent être utilisés. Administrez à chaque bovin une double dose de vaccin. Si le schéma de vaccination recommandé comprend l'administration d'une 2$^{nde}$ dose, administrez une dose supplémentaire à chaque bovin, après le délai indiqué. Observez les bovins au moins une fois par jour pendant au moins 14 jours après la dernière administration. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 2 h, 4 h et 6 h après, puis journellement pendant 4 jours ; notez pour chaque bovin l'augmentation maximale de température.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun bovin ne présente de réaction anormale, locale ou générale, de signes de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin, si l'augmentation moyenne de la température corporelle pour tous les bovins n'est pas supérieure à 1,5 °C et si aucun bovin ne présente une augmentation supérieure à 2 °C.

2-2-1-1-2. Innocuité chez la vache gestante. Si le vaccin est destiné aux vaches gestantes ou s'il peut leur être administré, utilisez au minimum 10 vaches aux stades d'intérêt de la gestation. Administrez à chaque vache une double dose de vaccin, puis une dose après l'intervalle recommandé. Observez les vaches au moins une fois par jour jusqu'à un jour après la mise bas. Enregistrez la température corporelle de chaque vache le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 2 h, 4 h et 6 h après, puis journellement pendant 4 jours ; notez pour chaque vache l'augmentation maximale de température.

Le vaccin satisfait à l'essai si :

- aucune des vaches ne présente de réaction anormale, locale ou générale, de signes de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin,
- l'augmentation moyenne de la température corporelle pour toutes les vaches n'est pas supérieure à 1.5 °C et aucune vache ne présente une augmentation supérieure à 2 °C,
- et aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-2-1-2. *Essais sur le terrain*. Les bovins utilisés pour les épreuves sur le terrain sont également utilisés pour évaluer l'innocuité. Effectuez l'essai pour les bovins de chacune des catégories auxquelles le vaccin est destiné. Utilisez au moins 3 groupes de 20 bovins avec des groupes témoins correspondants d'au moins 10 bovins de 3 élevages différents. Recherchez la présence de réactions locales au site d'injection après la vaccination. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination et les 2 jours suivant la vaccination.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun bovin ne présente de réaction anormale, locale ou générale, de signes de maladie, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin. L'augmentation moyenne de la température corporelle pour tous les bovins n'est pas supérieure à 1,5 °C et aucun bovin ne présente une augmentation supérieure à 2 °C. De plus, si le vaccin est destiné à la vache gestante, aucun effet significatif ni sur la gestation, ni sur la progéniture n'est démontré.

2-2-2. **Pouvoir immunogène**. Effectuez un essai pour chaque sérovar contre lequel une protection est déclarée sur l'étiquette.

Effectuez chaque essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des bovins de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Le vaccin administré à chaque bovin a une activité minimale.

Utilisez au moins 16 bovins exempts d'anticorps dirigés contre *M. haemolytica* et contre la leucotoxine de *M. haemolytica*. Vaccinez au moins 8 bovins selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 8 autres comme témoins. 21 jours après la dernière vaccination, soumettez tous les bovins à une épreuve virulente en leur administrant par voie intratrachéale ou par toute autre voie appropriée une quantité suffisante d'une souche virulente d'un sérovar de *M. haemolytica* ayant subi peu de passages. Observez les bovins au moins une fois par jour pendant encore 7 jours ; afin d'éviter toute souffrance inutile, les bovins gravement malades sont euthanasiés et considérés comme morts des suites de la maladie. Pendant la période d'observation, recherchez des signes de maladie (par exemple, température corporelle élevée, apathie, respiration anormale) et enregistrez la mortalité. Euthanasiez les bovins survivants à la fin de la période d'observation. Effectuez un examen post-mortem sur tout bovin mort pendant la période d'observation ou euthanasié à l'issue de cette période. Examinez les poumons et évaluez l'étendue des lésions pulmonaires dues à la mannheimiose. Prélevez des échantillons de tissu pulmonaire pour un ré-isolement des microorganismes de l'épreuve. Attribuez un score aux observations cliniques et aux lésions pulmonaires et comparez, pour les 2 groupes, les résultats obtenus pour ces paramètres ainsi que les résultats du réisolement bactérien.

L'essai n'est pas valable si moins de 70 pour cent des animaux témoins présentent des signes d'infection par *M. haemolytica*. Le vaccin satisfait à l'essai si les scores relatifs aux observations cliniques et post-mortem obtenues chez les bovins vaccinés et chez les bovins témoins diffèrent de façon significative. En ce qui concerne les vaccins dont l'étiquette indique un effet bénéfique sur le taux d'infection pour le sérovar, les résultats relatifs aux taux d'infection doivent également être meilleurs, de façon significative, chez les bovins vaccinés par rapport à ceux des bovins témoins.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-4.) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité.

2-3-2. **Endotoxines bactériennes**. Un essai d'endotoxines bactériennes (*2.6.14*) est effectué sur chaque lot final ou, si la nature de l'adjuvant le rend impossible, sur l'antigène en vrac ou le mélange d'antigènes en vrac immédiatement avant l'addition de l'adjuvant. La teneur maximale acceptable en endotoxines bactériennes est celle trouvée pour un lot de vaccin qui a satisfait à l'essai 2-2-1-1. d'innocuité décrit sous Choix de la composition du vaccin, ou à l'essai 3-3. d'innocuité décrit sous Essai, effectué en utilisant 10 bovins. Lorsque le second essai est utilisé, notez pour chaque bovin l'augmentation maximale de température ; le vaccin satisfait à l'essai si l'augmentation moyenne de la température corporelle pour tous les bovins n'est pas supérieure à 1,5 °C. La méthode choisie pour déterminer la teneur en endotoxines bactériennes présentes dans le lot de vaccin utilisé dans l'essai d'innocuité pour déterminer le taux maximal acceptable d'endotoxines, est utilisée par la suite pour le contrôle des lots.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Injecté à des animaux sains, exempts d'anticorps spécifiques dirigés contre les sérovars de *M. haemolytica* et/ou contre la leucotoxine présents dans le vaccin, le vaccin stimule la production de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 bovins de l'âge minimal recommandé pour la vaccination et qui n'ont pas été vaccinés contre la mannheimiose. Administrez à chaque bovin par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les bovins au moins une fois par jour pendant 14 jours. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 2 h, 4 h et 6 h après, puis journellement pendant 2 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des bovins ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin ; il peut se produire une augmentation transitoire de la température corporelle qui ne dépasse pas 2 °C.

3-4. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai du pouvoir immunogène (section 2-2-2.) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:1946**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA MANNHEIMIOSE DES MOUTONS

## Vaccinum mannheimiae inactivatum ad ovem

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la mannheimiose des moutons est une préparation d'une ou de plusieurs souches appropriées de *Mannheimia haemolytica* (anciennement *Pasteurella haemolytica*), inactivées en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des moutons et/ou pour la protection passive de leur progéniture contre les maladies causées par *M. haemolytica*.

2. PRODUCTION

2-1. *PREPARATION DU VACCIN*

La méthode de production du vaccin est fondée sur un système de lot de semence. La semence est cultivée dans un milieu approprié, chaque souche faisant l'objet d'une culture séparée dont l'identité est vérifiée par une méthode appropriée. Des paramètres tels que le taux de croissance sont contrôlés en cours de production par des méthodes appropriées ; les valeurs mesurées se situent dans les limites établies pour le vaccin considéré. La pureté et l'identité des récoltes sont vérifiées par des méthodes appropriées. Après culture, les suspensions bactériennes sont récoltées séparément et inactivées par une méthode appropriée. Le vaccin peut contenir un adjuvant.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Le choix de la composition du vaccin et des souches à inclure dans le vaccin est fondé sur les données épidémiologiques concernant la prévalence des différents sérovars de *M. haemolytica* et sur les indications déclarées du vaccin, par exemple protection active et/ou passive.
Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des moutons auxquels il est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (2-2-1) et Pouvoir immunogène (section 2-2-2) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-2-1. **Innocuité**

2-2-1-1. *Essais de laboratoire*. Effectuez les essais pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination et pour les moutons de chacune des catégories auxquelles le vaccin est destiné (par exemple, jeunes moutons, brebis gestantes). Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin.

2-2-1-1-1. Innocuité générale. Pour chaque essai, utilisez au moins 10 moutons exempts de préférence d'anticorps spécifiques dirigés contre les sérovars de *M. haemolytica* ou contre la leucotoxine présents dans le vaccin. Dans les cas justifiés, des moutons n'ayant pas d'antécédents de vaccination contre des mannheimia et présentant de faibles titres en anticorps (mesurés selon une méthode d'essai sensible du type ELISA, par exemple) peuvent être utilisés. Administrez à chaque mouton une double dose du vaccin, puis une dose après l'intervalle recommandé. Observez les moutons au moins une fois par jour pendant au moins 14 jours après la dernière administration. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 2 h, 4 h et 6 h après, puis journellement pendant 4 jours ; notez pour chaque mouton l'augmentation maximale de température.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun mouton ne présente de réactions locales anormales, de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et en particulier, si l'augmentation moyenne de la température corporelle pour tous les moutons n'est pas supérieure à 1,5 °C et si aucun mouton ne présente une augmentation supérieure à 2 °C.

2-2-1-1-2. Innocuité chez la brebis gestante. Si le vaccin est destiné aux brebis gestantes ou s'il peut leur être administré, utilisez au minimum 10 brebis aux stades d'intérêt de la gestation. Administrez à chaque brebis une double dose de vaccin, puis une dose après l'intervalle recommandé. Observez les brebis au moins une fois par jour jusqu'à un jour après la mise bas. Enregistrez la température corporelle de chaque brebis le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 2 h, 4 h et 6 h après, puis journellement pendant 4 jours ; notez pour chaque brebis l'augmentation maximale de température.

Le vaccin satisfait à l'essai si :

– aucune des brebis ne présente de réactions locales anormales, de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin,
– l'augmentation moyenne de la température corporelle pour toutes les brebis n'est pas supérieure à 1,5 °C et aucune brebis ne présente une augmentation supérieure à 2 °C,
– et aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-2-1-2. *Essais sur le terrain.* Les moutons utilisés pour les épreuves sur le terrain sont également utilisés pour évaluer l'innocuité. Effectuez l'essai pour les moutons de chacune des catégories auxquelles le vaccin est destiné. Utilisez au moins 3 groupes de 20 moutons avec des groupes témoins correspondants d'au moins 10 moutons de 3 élevages différents. Recherchez la présence de réactions locales au site d'injection après la vaccination. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination et les 2 jours suivant la vaccination.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun mouton ne présente de réactions anormales, locales ou générales, de signes notables de maladie, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin. L'augmentation moyenne de la température corporelle pour tous les moutons n'est pas supérieure à 1,5 °C et aucun mouton ne présente une augmentation supérieure à 2 °C. De plus, si le vaccin est destiné à la brebis gestante, aucun effet indésirable ni sur la gestation, ni sur la progéniture n'est démontré.

2-2-2. **Pouvoir immunogène**

2-2-2-1. *Immunisation active.* Pour les vaccins pour lesquels une protection active est déclarée, effectuez un essai pour chaque sérovar de *M. haemolytica* contre lequel une protection est déclarée sur l'étiquette.

Effectuez l'essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des agneaux de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Le vaccin administré à chaque agneau a une activité minimale.

Utilisez au moins 20 agneaux exempts d'anticorps dirigés contre *M. haemolytica* et contre la leucotoxine de *M. haemolytica*. Vaccinez au moins 10 agneaux selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 10 autres comme témoins. 21 jours après la dernière vaccination, soumettez tous les agneaux à une épreuve virulente en leur administrant par voie intratrachéale ou par toute autre voie appropriée une quantité suffisante d'une souche virulente d'un sérovar de *M. haemolytica* ayant subi peu de passages. Pour certains sérovars, il peut s'avérer nécessaire de faire une première infection avec le virus parainfluenza 3 (PI3) ou avec un autre agent pathogène des maladies respiratoires approprié. Observez les agneaux pendant encore 7 jours ; afin d'éviter toute souffrance inutile, les agneaux gravement malades sont euthanasiés et considérés comme morts des suites de la maladie. Pendant la période d'observation, recherchez des signes de maladie (par exemple, température corporelle élevée, apathie, respiration anormale) et enregistrez la mortalité. Euthanasiez les agneaux survivants à la fin de la période d'observation. Effectuez un examen post-mortem sur tout agneau mort pendant la période d'observation ou euthanasié à l'issue de cette période. Examinez les poumons et évaluez l'étendue des lésions pulmonaires dues à la mannheimiose. Prélevez des échantillons de tissu pulmonaire pour un ré-isolement des microorganismes de l'épreuve. Attribuez un score aux observations cliniques et aux lésions pulmonaires et comparez, pour les 2 groupes, les résultats obtenus pour ces paramètres ainsi que les résultats du réisolement bactérien.

L'essai n'est pas valable si moins de 70 pour cent des agneaux témoins présentent des signes d'infection par *M. haemolytica*. Le vaccin satisfait à l'essai si les scores relatifs aux observations cliniques et post-mortem obtenues chez les agneaux vaccinés et chez les agneaux témoins diffèrent de façon significative. En ce qui concerne les vaccins dont l'étiquette indique un effet bénéfique sur le taux d'infection pour le sérovar, les résultats relatifs aux taux d'infection doivent également être meilleurs, de façon significative, chez les agneaux vaccinés par rapport aux agneaux témoins.

2-2-2-2. *Protection passive.* Pour les vaccins revendiquant une protection passive contre la mannheimiose, effectuez un essai pour chaque sérovar de *M. haemolytica* contre lequel une protection est déclarée sur l'étiquette.

Effectuez l'essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées pour la vaccination. Le vaccin administré à chaque brebis a une activité minimale.

Utilisez au moins 6 brebis de préférence exemptes d'anticorps dirigés contre les sérovars de *M. haemolytica* ou contre la leucotoxine présents dans le vaccin. Dans des cas justifiés, des brebis n'ayant pas d'antécédents de vaccination contre des mannheimia, provenant d'une source présentant une incidence faible en maladies respiratoires et présentant de faibles titres en anticorps (mesurés selon une méthode d'essai sensible de type ELISA, par exemple) peuvent être utilisés. Vaccinez les brebis aux étapes recommandées de la gestation et selon le schéma recommandé. Soumettez 20 nouveau-nés n'ayant pas reçu de colostrum à une étude par épreuve. Donnez du colostrum provenant des brebis vaccinées à 10 de ces agneaux et donnez aux 10 autres agneaux du colostrum ou un substitut de colostrum ne contenant pas d'anticorps décelables dirigés contre *M. haemolytica*. Lorsque les agneaux atteignent l'âge correspondant à la durée de la protection passive revendiquée sur l'étiquette, soumettez-les tous à une épreuve virulente en leur administrant par voie intratrachéale une quantité suffisante d'une souche virulente d'un sérovar de *M. haemolytica* ayant subi peu de passages. Observez les agneaux pendant encore 7 jours ; afin d'éviter toute souffrance inutile, les agneaux gravement malades sont euthanasiés et considérés comme morts des suites de la maladie. Evaluez les effets de l'épreuve sur la progéniture des brebis vaccinées et des brebis témoins comme décrit dans l'essai d'immunisation active.

L'essai n'est pas valable si moins de 70 pour cent des agneaux témoins présentent des signes d'infection ou des lésions dus à *M. haemolytica*. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai si les scores relatifs aux observations cliniques et post-mortem obtenues chez les agneaux des brebis vaccinées et chez ceux des brebis témoins diffèrent de façon significative. En ce qui concerne les vaccins dont l'étiquette indique un effet bénéfique sur le taux d'infection pour le sérovar, les résultats relatifs aux taux d'infection doivent également être meilleurs, de façon significative, chez les agneaux des brebis vaccinées par rapport à ceux des brebis témoins.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer le ou les essai(s) d'Activité (section 3-4) sur chaque lot de vaccin s'ils ont été réalisés en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai correspondant ou ces essais ne sont pas effectués, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai (ou les essais) décrit(s) sous Activité.

2-3-2. **Endotoxines bactériennes**. Un essai d'endotoxines bactériennes (*2.6.14*) est effectué sur chaque lot final ou, si la nature de l'adjuvant le rend impossible, sur l'antigène en vrac ou le mélange d'antigènes en vrac immédiatement avant l'addition de l'adjuvant. La teneur maximale acceptable en endotoxines bactériennes est celle trouvée pour un lot de vaccin qui a satisfait aux essais 2-2-1-1 d'innocuité décrits sous Choix de la composition du vaccin, ou à l'essai 3-3 d'innocuité décrit sous Essais effectués sur chaque lot, effectué en utilisant 10 moutons. Lorsque le second essai est utilisé, notez pour chaque mouton l'augmentation maximale de température ; le vaccin satisfait à l'essai si l'augmentation moyenne de la température corporelle pour tous les moutons n'est pas supérieure à 1,5 °C. La méthode choisie pour déterminer la teneur en endotoxines bactériennes présentes dans le lot de vaccin utilisé dans l'essai d'innocuité pour déterminer le taux maximal acceptable d'endotoxines, est utilisée par la suite pour le contrôle des lots.



3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Injecté à des animaux sains exempts d'anticorps spécifiquement dirigés contre les sérovars de *M. haemolytica* et/ou contre la leucotoxine présents dans le vaccin, le vaccin stimule la production de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062).*

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 moutons de l'âge minimal recommandé pour la vaccination ou, si des moutons de l'âge minimal recommandé pour la vaccination ne sont pas disponibles, utilisez des moutons d'un âge aussi proche que possible de l'âge minimal recommandé pour la vaccination ; utilisez des moutons qui n'ont pas été vaccinés contre la mannheimiose. Administrez à chaque mouton par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les moutons au moins une fois par jour pendant 14 jours. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 2 h, 4 h et 6 h après, puis journellement pendant 2 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des moutons ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin ; il peut se produire une augmentation transitoire de la température corporelle qui ne dépasse pas 2 °C.

3-4. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de ou des essai(s) du pouvoir immunogène (section 2-2-2) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:0794**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA PANLEUCOPÉNIE INFECTIEUSE DU CHAT

## Vaccinum panleucopeniae felinae infectivae inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la panleucopénie infectieuse du chat est une préparation d'une souche appropriée du virus de la panleucopénie infectieuse du chat ou du parvovirus canin, inactivée en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des chats contre la panleucopénie infectieuse du chat.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires. La récolte virale est inactivée. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des chats auxquels il est destiné.

L'essai décrit ci-après sous Pouvoir immunogène (section 2-3-1) peut être utilisé pour établir l'efficacité.

2-3-1. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des chats âgés de 8-12 semaines. Le vaccin administré à chaque chat a une activité minimale.

Utilisez au moins 10 chats exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la panleucopénie du chat et contre le parvovirus canin. Administrez le vaccin à au moins 5 chats, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 5 autres comme témoins. Effectuez des dénombrements de leucocytes 8 jours et 4 jours avant l'épreuve virulente ; la moyenne de ces 2 numérations constitue la valeur initiale. Après 20-22 jours, soumettez tous les chats à une épreuve virulente en leur administrant par voie intrapéritonéale une quantité suffisante de suspension d'une forme virulente du virus de la panleucopénie du chat. Observez les chats au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de l'épreuve. Effectuez un dénombrement des leucocytes aux 4$^{e}$, 6$^{e}$, 8$^{e}$ et 10$^{e}$ jours après l'épreuve virulente.

L'essai n'est pas valable si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, moins de 100 pour cent des chats témoins présentent chacun au moins une fois une diminution du nombre de leucocytes d'au moins 75 pour cent par rapport à la valeur initiale ou meurent de panleucopénie. Le vaccin satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, tous les chats vaccinés survivent sans présenter de signes de maladie ni de leucopénie, c'est-à-dire si la diminution du nombre de leucocytes lors de chacun des 4 dénombrements ne dépasse pas 50 pour cent de la valeur initiale.

2-4. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-4-1. **Virus vivant résiduel**. La recherche de virus vivant résiduel est effectuée avec une quantité de récolte virale inactivée correspondant à au moins 100 doses de vaccin par une méthode validée telle que la suivante : inoculez la récolte inactivée à des cellules non confluantes appropriées. Après incubation pendant 8 jours, traitez les cellules à la

trypsine puis effectuez une subculture. Après 8 autres jours d'incubation, examinez les cultures selon une technique d'immunofluorescence pour rechercher les parvovirus vivants résiduels. En plus de l'examen d'immunofluorescence, un essai d'hémagglutination ou d'autres essais appropriés peuvent être effectués sur le surnageant des cultures cellulaires. La récolte virale inactivée satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est décelé.

2-4-2. **Activité du lot**. Pour l'essai de routine des lots de vaccin, un essai basé sur la production d'anticorps inhibant l'hémagglutination chez le cobaye peut être utilisé au lieu de l'essai 3-4-1 ou 3-4-2 décrits sous Activité, si une corrélation satisfaisante a été établie avec l'essai du pouvoir immunogène.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Injecté à des chats, le vaccin à examiner stimule la formation d'anticorps contre le parvovirus présent dans le vaccin.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 chats de l'âge minimal recommandé pour la vaccination, de préférence exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la panleucopénie du chat ou contre le parvovirus canin ou, dans des cas justifiés, utilisez des chats ayant un faible taux de ces anticorps, n'ayant pas été vaccinés contre la panleucopénie infectieuse du chat et pour lesquels l'administration du vaccin n'entraîne pas de réponse anamnestique. Administrez à chaque chat par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les chats au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des chats ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Activité**. Effectuez l'essai 3-4-1 ou l'essai 3-4-2.

3-4-1. *Recherche des anticorps inhibant l'hémagglutination chez le chat.* Utilisez au moins 4 chats âgés de 8-12 semaines, exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la panleucopénie du chat et contre le parvovirus canin. Administrez une dose recommandée de vaccin à au moins 2 chats et gardez-en au minimum 2 autres comme témoins. Après 21 jours, prélevez un échantillon de sang sur chacun des chats. Séparez le sérum de chaque échantillon. Inactivez chaque sérum en le chauffant à 56 °C pendant 30 min. A 1 volume de sérum, ajoutez 9 volumes d'une suspension de *kaolin léger R* à 200 g/L dans de la *solution saline tamponnée phosphate pH 7,4 R*. Agitez chaque mélange pendant 20 min. Centrifugez, recueillez le liquide surnageant et mélangez-le avec 1 volume d'une suspension concentrée d'érythrocytes de porc. Laissez reposer à 4 °C pendant 60 min et centrifugez. La dilution du sérum ainsi obtenue est de 1:10. Effectuez à partir de chaque sérum une série de dilutions de raison 2. A 0,025 mL de chacune de ces dernières dilutions, ajoutez 0,025 mL d'une suspension d'antigène de virus de la panleucopénie du chat ou de parvovirus canin contenant 4 unités hémagglutinantes. Laissez reposer à 37 °C pendant 30 min et ajoutez 0,05 mL d'une suspension d'érythrocytes de porc contenant $30 \times 10^6$ cellules par millilitre. Laissez reposer à 4 °C pendant 90 min et notez la dernière dilution de sérum encore capable d'inhiber complètement l'hémagglutination.

L'essai n'est pas valable si l'un ou l'autre des 2 chats témoins développe des anticorps contre le parvovirus canin ou contre le virus de la panleucopénie du chat. Le vaccin satisfait à l'essai si les 2 chats vaccinés développent des titres de 1:20 au minimum.

3-4-2. *Recherche des anticorps neutralisant le virus chez le chat.* Utilisez au moins 2 chats âgés de 8-12 semaines, présentant un titre en anticorps inférieur à $4DN_{50}$ par 0,1 mL de sérum déterminé par la méthode décrite ci-après. Administrez le vaccin à chacun d'eux selon le schéma recommandé. 14 jours après la vaccination, examinez le sérum de chaque chat comme suit. Chauffez le sérum à 56 °C pendant 30 min et préparez une série de dilutions dans un milieu approprié aux cellules félines. Ajoutez à chaque dilution un volume égal d'une suspension de virus contenant une quantité de virus telle que, lorsqu'un volume du mélange sérum-virus approprié au système de titrage choisi est inoculé dans des cultures cellulaires, chaque culture reçoive environ $10^4$ $DICC_{50}$. Faites incuber les mélanges à 37 °C pendant 1 h et inoculez un volume approprié de chaque mélange à 4 cultures cellulaires félines. Faites incuber les cultures à 37 °C pendant 7 jours, effectuez une subculture puis faites incuber pendant encore 7 jours. Examinez les cultures pour constater les effets cytopathogènes spécifiques et calculez le titre en anticorps.

Le vaccin satisfait à l'essai si le titre moyen en anticorps n'est pas inférieur à 32 $DN_{50}$ par 0,1 mL de sérum. Si un des chats ne réagit pas, répétez l'essai en utilisant 2 autres chats et calculez le résultat comme la moyenne des titres obtenus sur les 3 chats qui ont réagi.

**01/2008:0795**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA PARVOVIROSE CANINE

## Vaccinum parvovirosis caninae inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la parvovirose canine est une préparation d'une souche appropriée du parvovirus canin inactivée en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des chiens contre la parvovirose canine.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires. La récolte virale est inactivée. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des chiens auxquels il est destiné.

L'essai décrit ci-après sous Pouvoir immunogène (section 2-3-1) peut être utilisé pour établir l'efficacité.

2-3-1. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des chiens de l'âge minimal recommandé. Le vaccin administré à chaque chien a une activité minimale.

Utilisez au moins 7 chiens exempts d'anticorps dirigés contre le parvovirus canin. Administrez le vaccin à au moins 5 chiens, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 2 autres comme témoins. Après 20-22 jours, soumettez tous les chiens à une épreuve virulente en leur administrant par voie oronasale une quantité suffisante de suspension d'une forme virulente du parvovirus canin. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de l'épreuve. A la fin de la période d'observation, recherchez et titrez le virus dans les fèces par des essais d'hémagglutination.

L'essai n'est pas valable si moins de 100 pour cent des chiens témoins présentent des signes notables de la maladie ou une leucopénie et une excrétion du virus. Le vaccin satisfait à l'essai si tous les chiens vaccinés survivent sans présenter de signes de

Vaccins

maladie ni de leucopénie et si le titre maximal de virus excrété dans les fèces est inférieur à 1/100 de la moyenne géométrique des titres maximaux trouvés chez les témoins.

2-4. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-4-1. **Virus vivant résiduel**. Une recherche du virus vivant résiduel est effectuée sur la récolte en vrac de chaque lot en vue de confirmer l'inactivation du parvovirus canin. La quantité de récolte virale inactivée utilisée dans cet essai correspond à au moins 100 doses de vaccin. La récolte virale inactivée est inoculée à des cellules non confluantes appropriées. Après incubation pendant 8 jours, une subculture est effectuée après traitement des cellules à la trypsine. Après 8 autres jours d'incubation, les cultures sont soumises à un examen d'immunofluorescence pour rechercher les parvovirus résiduels vivants. En plus de l'examen d'immunofluorescence, un essai d'hémagglutination ou d'autres essais appropriés peuvent être effectués sur le surnageant des cultures cellulaires. La récolte virale inactivée satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est décelé.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Injecté à des animaux exempts d'anticorps dirigés contre le parvovirus canin, le vaccin à examiner stimule la formation de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 chiens de l'âge minimal recommandé pour la vaccination et de préférence, exempts d'anticorps dirigés contre le parvovirus canin ou dans les cas justifiés, utilisez des chiens ayant un faible taux de ces anticorps, n'ayant pas été vaccinés contre la parvovirose canine et pour qui l'administration du vaccin n'entraîne pas de réponse anamnestique. Administrez à chaque chien par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun chien ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Activité**. Effectuez l'essai 3-4-1 ou l'essai 3-4-2.

3-4-1. *Recherche des anticorps inhibant l'hémagglutination chez le cobaye*. Utilisez au moins 5 cobayes exempts d'anticorps spécifiques. Administrez à chaque cobaye par voie sous-cutanée la moitié de la dose recommandée. Après 14 jours, injectez encore une fois la moitié de la dose recommandée. 14 jours plus tard, recueillez des échantillons de sang et séparez le sérum. Inactivez chaque sérum en le chauffant à 56 °C pendant 30 min. A 1 volume de chaque sérum, ajoutez 9 volumes d'une suspension de *kaolin léger R* à 200 g/L dans la *solution saline tamponnée phosphate pH 7,4 R*. Agitez chaque mélange pendant 20 min. Centrifugez, recueillez le surnageant et mélangez-le avec 1 volume d'une suspension concentrée d'érythrocytes de porc. Laissez reposer à 4 °C pendant 60 min et centrifugez. La dilution du sérum ainsi obtenue est 1:10. Effectuez à partir de chaque sérum une série de dilutions de raison 2. A 0,025 mL de ces dernières dilutions, ajoutez 0,025 mL d'une suspension d'antigène de parvovirus canin contenant 4 unités hémagglutinantes. Laissez reposer à 37 °C pendant 30 min, puis ajoutez 0,05 mL d'une suspension d'érythrocytes de porc contenant $30 \times 10^6$ cellules par millilitre. Laissez reposer à 4 °C pendant 90 min et notez la dernière dilution de sérum encore capable d'inhiber complètement l'hémagglutination. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre médian en anticorps des sérums recueillis après la seconde vaccination n'est pas inférieur à 1/80.

3-4-2. *Recherche des anticorps neutralisant le virus chez le chien*. Utilisez au moins 2 chiens en bonne santé, âgés de 8-12 semaines, présentant un titre en anticorps inférieur à 4 $DN_{50}$ par 0,1 mL de sérum, déterminé par la méthode décrite ci-après. 14 jours après la vaccination, examinez le sérum de chaque chien comme suit. Chauffez le sérum à 56 °C pendant 30 min et préparez une série de dilutions dans un milieu approprié aux cellules canines. Ajoutez à chaque dilution un volume égal d'une suspension de virus contenant une quantité de virus telle que, lorsqu'un volume du mélange sérum-virus approprié au système de titrage choisi est inoculé dans des cultures cellulaires, chaque culture reçoive environ $10^4$ $DICC_{50}$. Faites incuber les mélanges à 37 °C pendant 1 h et inoculez un volume approprié de chaque mélange à 4 cultures cellulaires canines. Faites incuber les cultures cellulaires à 37 °C pendant 7 jours, effectuez une subculture et faites incuber pendant encore 7 jours. Examinez les cultures pour constater les effets cytopathogènes spécifiques et calculez le titre en anticorps. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre moyen en anticorps n'est pas inférieur à 32 $DN_{50}$ par 0,1 mL de sérum. Si un des chiens ne réagit pas, répétez l'essai en utilisant 2 autres chiens et calculez le résultat comme la moyenne des titres obtenus sur les 3 chiens qui ont réagi.

**01/2008:0965**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA PARVOVIROSE PORCINE

## Vaccinum parvovirosis inactivatum ad suem

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la parvovirose porcine est une préparation d'une souche appropriée de parvovirus porcin, inactivée en maintenant des propriétés immunogènes appropriées, ou d'une fraction non infectieuse du virus. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des truies et des cochettes pour la protection de leur progéniture contre l'infection transplacentaire.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est cultivé en cultures cellulaires. La suspension virale est récoltée ; le virus est inactivé par une méthode appropriée et peut subir une fragmentation (l'inactivation peut être effectuée par le procédé de fragmentation) ; le virus ou les fragments viraux peuvent être purifiés et concentrés à un stade approprié du procédé. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin possède une innocuité (*5.2.6*) (y compris l'absence d'effet indésirable sur la fertilité, la gestation, la mise bas et la progéniture) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des porcs auxquels il est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1.) et Pouvoir immunogène (section 2-3-2.) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**

2-3-1-1. *Essais de laboratoire*. Effectuez les essais pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées et le cas échéant, pour les porcs de chacune des catégories auxquelles le vaccin est destiné. Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin.

2-3-1-1-1. Innocuité générale. Pour chaque essai, utilisez au minimum 10 porcs exempts d'anticorps dirigés contre le parvovirus porcin ou contre une fraction du virus. Administrez à chaque porc une double dose de vaccin, puis une dose après 14 jours. Observez les porcs au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de la dernière administration.

Vaccins

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des porcs ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin pendant les 28 jours de l'essai.

2-3-1-1-2. Innocuité chez la truie gravide. Si le vaccin est destiné à la truie gravide, utilisez au minimum 10 truies gravides au stade de gestation recommandé ou à plusieurs stades selon le schéma recommandé. Administrez à chaque truie une double dose de vaccin, puis une dose après 14 jours. Observez les truies au moins une fois par jour jusqu'à la mise bas.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucune des truies ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-3-1-1-3. Innocuité chez les porcs utilisés dans l'essai 2-3-2. du pouvoir immunogène. Les porcs utilisés dans l'essai du pouvoir immunogène sont également utilisés pour évaluer l'innocuité. Relevez la température rectale de chaque porc vacciné au moment de la vaccination puis 24 h et 48 h plus tard. Recherchez la présence de réactions locales au site d'injection après l'injection et lors de l'abattage.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun porc ne présente :

- une température corporelle anormale ;
- aucune autre réaction générale (par exemple, anorexie) ;
- aucune réaction locale anormale attribuable au vaccin.

2-3-1-2. *Essais sur le terrain*. Les porcs utilisés pour les essais sur le terrain sont également utilisés pour évaluer l'innocuité. Effectuez un essai pour chaque catégorie de porcs auxquels le vaccin est destiné (truies, cochettes). Utilisez au minimum 3 groupes d'au moins 20 porcs avec des groupes correspondants d'au moins 10 témoins. Relevez la température rectale de chaque porc vacciné au moment de la vaccination puis 24 h et 48 h plus tard. Recherchez la présence de réactions locales au site d'injection après l'injection et lors de l'abattage.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun porc ne présente :

- une température corporelle anormale ;
- aucune réaction locale anormale attribuable au vaccin.

2-3-2. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des cochettes âgées de 5-6 mois. Le vaccin administré à chaque cochette a une activité minimale.

Utilisez au moins 12 cochettes exemptes d'anticorps dirigés contre le parvovirus porcin ou contre une fraction du virus. Administrez le vaccin à au moins 7 cochettes selon le schéma recommandé et gardez-en au moins 5 autres, non vaccinées, du même âge, comme témoins. Le délai entre la vaccination et l'accouplement est celui indiqué sur l'étiquette. Faites couvrir toutes les cochettes chacun des 2 jours suivant immédiatement les signes d'oestrus. Au 40$^{e}$ jour environ de gestation, soumettez toutes les cochettes à une épreuve virulente en leur administrant une quantité suffisante d'une souche virulente du parvovirus du porc. Euthanasiez les cochettes au 90$^{e}$ jour environ de gestation et examinez les foetus pour rechercher l'infection par le parvovirus porcin démontrée par la présence de virus ou d'anticorps.

L'essai n'est pas valable si :

- moins de 7 cochettes vaccinées et 5 cochettes témoins sont soumises à l'épreuve virulente,
- moins de 90 pour cent des porcelets provenant des cochettes témoins sont infectés,
- le nombre moyen de porcelets par portée chez les truies vaccinées est inférieur à 6.

Le vaccin satisfait à l'essai si au minimum 80 pour cent du nombre total et cumulé des porcelets provenant des cochettes vaccinées sont protégés contre l'infection.

2-4. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-4-1. **Virus vivant résiduel**. Une recherche de virus vivant résiduel est effectuée sur chaque lot d'antigène immédiatement après l'inactivation. La quantité de récolte virale inactivée utilisée dans cet essai correspond à au moins 100 doses de vaccin. La récolte en vrac est inoculée à des cellules non confluantes appropriées. Après incubation pendant 7 jours, une subculture est effectuée après traitement des cellules à la trypsine. Après 7 autres jours d'incubation, les cultures sont soumises à un examen d'immunofluorescence pour rechercher les parvovirus résiduels vivants. La récolte virale inactivée satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté.

2-4-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-6.) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Utilisez au minimum 5 cobayes âgés de 5-7 semaines et exempts d'anticorps dirigés contre le parvovirus porcin ou contre une fraction du virus. Administrez à chaque cobaye par voie sous-cutanée un quart du volume de la dose indiquée. Prélevez des échantillons de sang après la période nécessaire pour la production maximale d'anticorps. Effectuez sur le sérum une recherche d'anticorps spécifiques par un essai d'inhibition de l'hémagglutination ou par d'autres essais appropriés. Le vaccin satisfait à l'essai si la teneur en anticorps n'est pas inférieure à celle d'un lot de vaccin ayant auparavant satisfait à l'essai décrit sous Activité.

## 3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Injecté, si nécessaire à plusieurs reprises, à des animaux exempts d'anticorps spécifiques dirigés contre le parvovirus porcin ou contre la fraction antigénique utilisée dans la production du vaccin, le vaccin stimule la formation de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 porcs âgés de 6 semaines à 6 mois et exempts d'anticorps dirigés contre le parvovirus porcin ou contre une fraction du virus. Administrez à chaque porc par une voie recommandée une double dose de vaccin puis une dose de vaccin après 14 jours. Observez les porcs au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de la dernière administration.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des porcs ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Virus vivant résiduel**. Utilisez une quantité du vaccin correspondant à 10 doses. Si le vaccin contient un adjuvant huileux, cassez l'émulsion et séparez les deux phases. Si le vaccin contient un adjuvant minéral, procédez à une élution afin de libérer le virus. Concentrez la suspension virale 100 fois par ultrafiltration ou par ultracentrifugation. Les procédés employés pour préparer la suspension virale concentrée ne doivent pas être de nature à inactiver le virus ou empêcher autrement sa détection. Effectuez un essai de virus vivant résiduel dans des cellules non confluentes appropriées. Après incubation pendant 7 jours, effectuez une subculture après traitement des cellules à la trypsine. Après 7 autres jours d'incubation, soumettez les cultures à un examen d'immunofluorescence pour rechercher les parvovirus résiduels vivants. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté.

3-5. **Agents étrangers**. Sur les porcs ayant servi à l'essai de l'innocuité, effectuez une recherche d'anticorps. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne provoque pas la formation d'anticorps, autres que ceux spécifiques de la parvovirose porcine, contre des virus pathogènes du porc ou contre des virus qui pourraient interférer avec le diagnostic de maladies infectieuses du porc (y compris les virus du groupe pestivirus).

3-6. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai du pouvoir immunogène (section 2-3-2.) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:2072**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA PASTEURELLOSE DES MOUTONS

## Vaccinum pasteurellae inactivatum ad ovem

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la pasteurellose des moutons est une préparation d'une ou de plusieurs souches appropriées de *Pasteurella trehalosi*, inactivées en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'administration active des moutons contre les maladies causées par *P. trehalosi*.

2. PRODUCTION

2-1. *PREPARATION DU VACCIN*

La méthode de production du vaccin est fondée sur un système de lot de semence. La semence est cultivée dans un milieu approprié, chaque souche faisant l'objet d'une culture séparée dont l'identité est vérifiée par une méthode appropriée. Des paramètres tels que le taux de croissance sont contrôlés en cours de production par des méthodes appropriées ; les valeurs mesurées se situent dans les limites établies pour le vaccin considéré. La pureté et l'identité des récoltes sont vérifiées par des méthodes appropriées. Après culture, les suspensions bactériennes sont récoltées séparément et inactivées par une méthode appropriée. Le vaccin peut contenir un adjuvant.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Le choix de la composition du vaccin et des souches à inclure dans le vaccin est fondé sur les données épidémiologiques concernant la prévalence des différents sérovars de *P. trehalosi*. Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des moutons auxquels il est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (2-2-1) et Pouvoir immunogène (section 2-2-2) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-2-1. **Innocuité**

2-2-1-1 *Essais de laboratoire*. Effectuez les essais pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination et pour les moutons de chacune des catégories auxquelles le vaccin est destiné (par exemple, jeunes moutons, brebis gestantes). Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin.

2-2-1-1-1. Innocuité générale. Pour chaque essai, utilisez au moins 10 moutons de préférence exempts d'anticorps spécifiques dirigés contre les sérovars de *P. trehalosi* ou contre la leucotoxine présents dans le vaccin. Dans les cas justifiés, des moutons n'ayant pas d'antécédents de vaccination contre des *Pasteurella* et présentant de faibles titres en anticorps (mesurés selon une méthode d'essai sensible du type ELISA, par exemple) peuvent être utilisés. Administrez à chaque mouton une double dose du vaccin, puis une dose unique après le délai recommandé. Observez les moutons au moins une fois par jour pendant au moins 14 jours après la dernière administration. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 2 h, 4 h et 6 h après, puis journellement pendant 4 jours ; notez pour chaque mouton l'augmentation maximale de température.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun mouton ne présente de réactions locales anormales, de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin, si l'augmentation moyenne de la température corporelle pour tous les moutons n'est pas supérieure à 1,5 °C et si aucun mouton ne présente une augmentation supérieure à 2 °C.

2-2-1-1-2. Innocuité chez la brebis gestante. Si le vaccin est destiné aux brebis gestantes ou s'il peut leur être administré, utilisez au minimum 10 brebis aux stades d'intérêt de la gestation. Administrez à chaque brebis une double dose de vaccin, puis une dose après l'intervalle recommandé. Observez les brebis au moins une fois par jour jusqu'à un jour après la mise bas. Enregistrez la température corporelle de chaque brebis le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 2 h, 4 h et 6 h après, puis journellement pendant 4 jours ; notez pour chaque brebis l'augmentation maximale de température.

Le vaccin satisfait à l'essai si :

- aucune des brebis ne présente de réactions locales anormales, de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin,
- l'augmentation moyenne de la température corporelle pour toutes les brebis n'est pas supérieure à 1,5 °C et si aucune brebis ne présente une augmentation supérieure à 2 °C,
- et aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-2-1-2. *Essais sur le terrain*. Les moutons utilisés pour les épreuves sur le terrain sont également utilisés pour évaluer l'innocuité. Effectuez l'essai pour les moutons de chacune des catégories auxquelles le vaccin est destiné. Utilisez au moins 3 groupes de 20 moutons avec des groupes témoins correspondants d'au moins 10 moutons de 3 élevages différents. Recherchez la présence de réactions locales au site d'injection après la vaccination. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination et les 2 jours suivant la vaccination.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun mouton ne présente de réactions anormales, locales ou générales, de signes notables de maladie, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin. L'augmentation moyenne de la température corporelle pour tous les moutons n'est pas supérieure à 1,5 °C et aucun mouton ne présente une augmentation supérieure à 2 °C. De plus, si le vaccin est destiné à la brebis gestante, aucun effet indésirable ni sur la gestation, ni sur la progéniture n'est démontré.

2-2-2. **Pouvoir immunogène**. Effectuez un essai pour chaque sérovar de *P. trehalosi* contre lequel une protection est déclarée sur l'étiquette.

Effectuez l'essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des agneaux de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Le vaccin administré à chaque agneau a une activité minimale.

Utilisez au moins 20 agneaux exempts d'anticorps dirigés contre *P. trehalosi* et contre la leucotoxine de *P. trehalosi*. Vaccinez au moins 10 agneaux selon le schéma recommandé et gardez-en 10 autres comme témoins. 21 jours après la dernière vaccination, soumettez tous les agneaux à une épreuve virulente en leur administrant par voie sous-cutanée ou par une autre voie injectable appropriée une quantité suffisante d'une souche virulente d'un sérovar de *P. trehalosi* ayant subi peu de passages. Observez les agneaux pendant encore 7 jours ; afin d'éviter toute souffrance inutile, les agneaux gravement malades sont euthanasiés et considérés comme morts des suites de la maladie. Pendant la période d'observation, recherchez des signes de maladie (par exemple, apathie importante, salivation excessive) et enregistrez la mortalité. Euthanasiez les agneaux survivants à la fin de la période d'observation. Effectuez un examen post-mortem sur tout agneau mort pendant la période d'observation ou euthanasié à l'issue de cette période. Examinez les poumons, la plèvre, le foie et la rate pour déceler des hémorragies et évaluez l'étendue de la consolidation pulmonaire due à la pasteurellose. Prélevez des échantillons de tissus pulmonaire, hépatique et splénique pour un réisolement des microorganismes de l'épreuve. Attribuez un score à la

Vaccins

mortalité, aux observations cliniques et aux lésions post-mortem et comparez, pour les 2 groupes, les résultats obtenus pour ces paramètres ainsi que les résultats du réisolement bactérien.

L'essai n'est pas valable si moins de 70 pour cent des agneaux témoins présentent des signes d'infection ou des lésions par *P. trehalosi*. Le vaccin satisfait à l'essai si les scores relatifs aux observations cliniques et post-mortem obtenues chez les agneaux vaccinés et chez les agneaux témoins diffèrent de façon significative. En ce qui concerne les vaccins dont l'étiquette indique un effet bénéfique sur le taux d'infection pour le sérovar, les résultats relatifs aux taux d'infection doivent également être meilleurs, de façon significative, chez les agneaux vaccinés par rapport à ceux des agneaux témoins.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-4) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité.

2-3-2. **Endotoxines bactériennes**. Un essai d'endotoxines bactériennes (*2.6.14*) est effectué sur chaque lot final ou, si la nature de l'adjuvant le rend impossible, sur l'antigène en vrac ou le mélange d'antigènes en vrac immédiatement avant l'addition de l'adjuvant. La teneur maximale acceptable en endotoxines bactériennes est celle trouvée pour un lot de vaccin qui a satisfait aux essais 2-2-1-1 d'innocuité décrits sous Choix de la composition du vaccin, ou à l'essai 3-3 d'innocuité décrit sous Essais effectués sur chaque lot, effectué en utilisant 10 moutons. Lorsque le second essai est utilisé, notez pour chaque mouton l'augmentation maximale de température ; le vaccin satisfait à l'essai si l'augmentation moyenne de la température corporelle pour tous les moutons n'est pas supérieure à 1,5 °C. La méthode choisie pour déterminer la teneur en endotoxines bactériennes présente dans le lot de vaccin utilisé dans l'essai d'innocuité pour déterminer le taux maximal acceptable d'endotoxines est utilisée par la suite pour le contrôle des lots.

3. ESSAIS EFFECTUES SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Injecté à des animaux sains exempts d'anticorps spécifiquement dirigés contre les sérovars de *P. trehalosi* et/ou contre la leucotoxine présents dans le vaccin, le vaccin stimule la production de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 moutons de l'âge minimal recommandé pour la vaccination ou, si des animaux de l'âge minimal recommandé pour la vaccination ne sont pas disponibles, utilisez des animaux d'un âge aussi proche que possible de l'âge minimal recommandé pour la vaccination ; utilisez des moutons qui n'ont pas été vaccinés contre les Pasteurella. Administrez à chaque mouton par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les moutons au moins une fois par jour pendant 14 jours. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 2 h, 4 h et 6 h après, puis journellement pendant 2 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des moutons ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin ; il peut se produire une augmentation transitoire de la température corporelle qui ne dépasse pas 2 °C.

3-4. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai du pouvoir immunogène (section 2-2-2) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**07/2009:2448**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA PNEUMONIE ENZOOTIQUE PORCINE

## Vaccinum pneumoniae enzooticae suillae inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la pneumonie enzootique porcine est une préparation d'une souche appropriée de *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivée en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des porcs contre la pneumonie enzootique causée par *M. hyopneumoniae*.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le vaccin est préparé selon un système de lot de semence. La semence est cultivée dans un milieu solide et/ou liquide approprié pour garantir une croissance optimale dans les conditions d'incubation choisies. L'identité de la souche est vérifiée par une méthode appropriée.
Des paramètres tels que le taux de croissance sont contrôlés en cours de production par des méthodes appropriées ; les valeurs mesurées se situent dans les limites établies pour le vaccin considéré. La pureté des récoltes est vérifiée par une méthode appropriée.

Après culture, la suspension de mycoplasmes est récoltée et inactivée par une méthode appropriée. Le vaccin peut contenir un adjuvant.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des porcs auxquels il est destiné.
Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-2-1) et Pouvoir immunogène (section 2-2-2) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-2-1. **Innocuité**

2-2-1-1. *Essais de laboratoire*. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination et pour les animaux de chacune des catégories auxquelles le vaccin est destiné. Utilisez un lot de vaccin dont l'activité est au moins égale à l'activité maximale susceptible d'être atteinte dans un lot de vaccin.

2-2-1-1-1. Innocuité générale. Pour chaque essai, utilisez au minimum 10 porcs exempts d'anticorps dirigés contre *M. hyopneumoniae*. Administrez à chaque porc une double dose de vaccin, puis, s'il y a lieu, une dose après l'intervalle recommandé. Observez les porcs au moins 1 fois par jour jusqu'au 14^e^ jour après la dernière administration, pour voir s'ils présentent des signes de réactions anormales, locales ou générales. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 4 h après, puis journellement pendant 4 jours ; notez pour chaque porc l'augmentation maximale de température.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des porcs ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si, en particulier, l'augmentation moyenne de la température corporelle pour tous les porcs n'est pas supérieure à 1,5 °C et aucun porc ne présente une augmentation supérieure à 2 °C.

2-2-1-2. *Essais sur le terrain*. Les animaux utilisés pour les épreuves sur le terrain sont également utilisés pour évaluer l'innocuité. Effectuez l'essai pour les animaux de chacune des catégories auxquelles le vaccin est destiné. Effectuez l'essai sur au moins 3 groupes d'au moins 20 animaux, et autant de groupes témoins d'au moins 10 animaux. Examinez le site d'injection après la vaccination pour rechercher les réactions locales. Enregistrez la température corporelle le jour précédant

Vaccins

la vaccination, au moment de la vaccination, au moment où une augmentation de la température corporelle a été constatée lors de l'essai 2-2-1-1 le cas échéant, puis journellement pendant les 2 jours suivant la vaccination ; notez pour chaque animal l'augmentation maximale de température.

Le vaccin satisfait à l'essai si :

— aucun des animaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin,
— l'augmentation moyenne de la température corporelle pour tous les animaux n'est pas supérieure à 1,5 °C, et
— aucun animal ne présente une augmentation de la température corporelle supérieure à 2 °C.

2-2-2. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées en utilisant dans chaque cas des porcs de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Le vaccin administré à chaque porc a une activité minimale.

Utilisez au moins 20 porcs exempts d'anticorps dirigés contre *M. hyopneumoniae*, et provenant d'un ou plusieurs élevages ne présentant aucun signe de pneumonie enzootique et où les animaux ne sont pas vaccinés contre *M. hyopneumoniae*. Vaccinez au moins 12 porcs, selon le schéma recommandé. Gardez au moins 8 autres porcs non vaccinés comme témoins. Au moins 14 jours après la dernière injection, soumettez chaque animal à une épreuve virulente en lui administrant par voie intranasale, par voie intratrachéale ou par aérosol une quantité appropriée d'une souche virulente de *M. hyopneumoniae*. Utilisez pour l'épreuve virulente une souche différente de celle du vaccin. 21-30 jours après l'épreuve, euthanisez tous les porcs. Procédez à l'examen post-mortem de chaque porc afin d'évaluer l'étendue des lésions pulmonaires en utilisant une grille de notation des lésions pulmonaires validée et adaptée à l'âge des animaux. La grille de notation suivante peut être utilisée.

Attribuez à chacun des 7 lobes des poumons un score pondéré en fonction de la masse relative de chaque lobe.

| Lobes | Gauche | Droit |
|---|---|---|
| Apical | 5 | 11 |
| Cardiaque | 6 | 10 |
| Diaphragmatique | 29 | 34 |
| Intermédiaire | 5 | |

Le vaccin satisfait à l'essai si les porcs vaccinés, comparés aux témoins, présentent une réduction significative du score des lésions pulmonaires.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'activité concerné (section 3-5) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. Une quantification de l'antigène (c'est-à-dire un essai *in vitro* utilisant un vaccin de référence ayant donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité), complétée d'un essai de quantification des adjuvants, peut servir de méthode alternative, sous réserve que le caractère protecteur de l'antigène mesuré et/ou sa pertinence d'un point de vue immunologique aient été établis.

Un essai mesurant l'induction de la réponse en anticorps dans des animaux de laboratoire peut également être effectué. La méthode suivante est donnée à titre d'exemple.

Utilisez au moins 5 souris pesant 18-20 g et exemptes d'anticorps dirigés contre *M. hyopneumoniae*. Injectez à chaque souris par voie sous-cutanée une dose appropriée du vaccin. Gardez au moins 5 souris comme témoins. Si le schéma de vaccination recommandé comporte une injection de rappel, un rappel de vaccination peut également être fait lors de cet essai s'il a été démontré que cela constituera toujours un système d'essai de sensibilité appropriée. Avant la vaccination et à un temps donné, entre 14 et 21 jours après la dernière injection, prélevez du sang de chaque souris et préparez des échantillons de sérum. Déterminez séparément pour chaque sérum, par un essai validé approprié comme le titrage immunologique à enzyme conjuguée (*2.7.1*), le titre en anticorps spécifiquement dirigés contre chaque composant antigénique indiqué sur l'étiquette.

Le vaccin satisfait à l'essai si les titres moyens en anticorps obtenus ne sont pas significativement inférieurs à ceux obtenus avec un lot ayant donné des résultats satisfaisants dans l'épreuve décrite sous Activité.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le vaccin stimule la production d'anticorps dirigés contre *M. hyopneumoniae*, lorsqu'il est injecté à des animaux sains qui en sont dépourvus. Des essais moléculaires appropriés, comme ceux utilisant des techniques d'amplification des acides nucléiques (*2.6.21*), peuvent également servir à l'identification.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 porcs de l'âge minimal recommandé pour la vaccination et n'ayant pas d'anticorps dirigés contre *M. hyopneumoniae*. Administrez à chaque porc par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les porcs au moins 1 fois par jour pendant 14 jours. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 4 h après celle-ci, puis journellement pendant 2 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun porc ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin ; il peut se produire une augmentation transitoire de la température corporelle qui ne dépasse pas 2 °C.

3-4. **Mycoplasmes résiduels vivants**. Effectuez un essai des mycoplasmes résiduels vivants pour confirmer l'inactivation de *M. hyopneumoniae*. Le vaccin satisfait à un essai validé pour la recherche de *M. hyopneumoniae* résiduel vivant, effectué par une méthode de culture (voir par exemple *2.6.7*, en utilisant des milieux qui se sont révélés appropriés pour *M. hyopneumoniae*).

3-5. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-2-2) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:0870**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA PSEUDOPESTE AVIAIRE (MALADIE DE NEWCASTLE)

## Vaccinum pseudopestis aviariae inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la pseudopeste aviaire (maladie de Newcastle) (appelé également vaccin inactivé du paramyxovirus aviaire 1 dans le cas de vaccins destinés à certaines espèces) est une préparation d'une souche appropriée du virus de la maladie de Newcastle (paramyxovirus aviaire 1), inactivé en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des oiseaux contre la maladie de Newcastle.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poules embryonnés ou en cultures cellulaires. La récolte de virus est inactivée. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Oeufs de poule embryonnés**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poule embryonnés, ils proviennent d'élevages sains.

2-2-2. **Cultures cellulaires**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des cultures cellulaires, elles sont conformes aux spécifications pour les cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *LOTS DE SEMENCE*

2-3-1. **Agents étrangers**. Le lot de semence primaire satisfait à l'essai des agents étrangers dans les lots de semence (*2.6.24*). Lors de ces essais sur le lot de semence primaire, utilisez des organismes n'ayant pas subi, en début d'essai, plus de 5 passages depuis le lot de semence primaire.

2-4. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis de chacune des espèces et catégories d'oiseaux auxquelles il est destiné. Les essais suivants du Pouvoir immunogène (section 2-4-1) peuvent être utilisés pour démontrer l'efficacité.

2-4-1. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées. Le vaccin administré à chaque oiseau a une activité minimale.

L'essai des vaccins destinés au poulet (section 2-4-1-1) convient à la mise en évidence du pouvoir immunogène chez le poulet. L'essai des vaccins destinés à des espèces autres que le poulet (section 2-4-1-2) convient à la mise en évidence du pouvoir immunogène chez d'autres espèces d'oiseaux, notamment le pigeon ou le dindon.

2-4-1-1. *Vaccins destinés au poulet*. Utilisez au moins 70 poulets âgés de 21-28 jours, de la même origine et provenant d'un élevage exempt de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*). Constituez en vue de la vaccination au moins 3 groupes, d'au moins 20 poulets chacun. Choisissez un nombre de volumes différents de vaccin correspondant au nombre de groupes : par exemple, des volumes équivalant à 1/25, 1/50 et 1/100 d'une dose. Attribuez un volume différent à chaque groupe. Administrez à chaque poulet par voie intramusculaire le volume de vaccin attribué à son groupe. Gardez au minimum 10 poulets comme témoins. Après 17-21 jours, soumettez tous les poulets à une épreuve virulente en injectant par voie intramusculaire 6 $\log_{10}$ $DL_{50}$ (embryon) du paramyxovirus aviaire 1, souche Herts (Weybridge 33/56). Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 21 jours à compter de l'épreuve. A la fin de la période d'observation, calculez la $DP_{50}$ par les méthodes statistiques habituelles à partir du nombre de poulets qui, dans chaque groupe vacciné, survivent sans présenter de signes de la maladie de Newcastle pendant 21 jours. L'essai n'est valable que si tous les animaux témoins meurent dans les 6 jours suivant l'épreuve. Le vaccin satisfait à l'essai si la dose minimale indiquée sur l'étiquette correspond à au minimum 50 $DP_{50}$ et si la limite inférieure de confiance n'est pas inférieure à 35 $DP_{50}$ par dose. Si la limite inférieure de confiance est inférieure à 35 $DP_{50}$ par dose, répétez l'essai ; le vaccin doit s'avérer contenir au minimum 50 $DP_{50}$ dans l'essai répété.

2-4-1-2. *Vaccins destinés à des espèces autres que le poulet*. Utilisez au moins 30 oiseaux de l'espèce cible, de la même origine et du même âge, exempts d'anticorps dirigés contre le paramyxovirus aviaire 1. Vaccinez, selon les indications d'emploi, au moins 20 oiseaux. Gardez au moins 10 oiseaux comme témoins. Après 4 semaines, soumettez tous les oiseaux à une épreuve virulente en leur administrant par voie intramusculaire une quantité suffisante de paramyxovirus aviaire 1 virulent. L'essai n'est pas valable si le sérum des oiseaux vaccinés ou des témoins prélevé au moment de la vaccination présente des anticorps dirigés contre le paramyxovirus aviaire 1, ni si le sérum des témoins prélevé au moment de l'épreuve virulente présente de tels anticorps. L'essai n'est pas valable si moins de 70 pour cent des témoins meurent ou présentent des signes marqués de la maladie de Newcastle. Le vaccin satisfait à l'essai si 90 pour cent des oiseaux vaccinés survivent sans présenter de signes marqués d'infection par le paramyxovirus aviaire 1.

2-5. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-5-1. **Virus vivant résiduel**. L'essai est effectué sur oeufs embryonnés ou sur cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*), en choisissant le système le plus sensible pour la souche de virus vaccinal. La quantité de virus inactivé utilisée dans cet essai correspond à au moins 10 doses de vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté.

2-5-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'activité (section 3-6) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. Les essais suivants peuvent être effectués. Dans la mesure du possible, effectuez l'essai de la teneur en antigène (section 2-5-2-1) en même temps que l'essai de l'adjuvant (section 2-5-2-2).

*Vaccins destinés au poulet*. L'essai de la teneur en antigène (section 2-5-2-1) associé à l'essai de l'adjuvant (section 2-5-2-2) peuvent être effectués ; si la nature du vaccin ne permet pas d'obtenir des résultats valables avec ces essais, ou si le vaccin n'y est pas conforme, l'essai du titrage sérologique (section 2-5-2-3) peut être effectué. Si le vaccin n'est pas conforme à ce dernier essai, l'essai des vaccins destinés au poulet (section 2-4-1-1) peut être effectué. Un essai comportant des groupes de moins de 20 animaux et une période d'observation après l'épreuve plus courte peut être utilisé s'il a été démontré que ceci constitue un essai d'activité valable.

*Vaccins destinés à des espèces autres que le poulet*. Effectuez un essai approprié après l'établissement d'une corrélation satisfaisante avec l'essai des vaccins destinés à des espèces autres que le poulet (section 2-4-1-2), les critères d'acceptation étant fixés par rapport à un lot qui a donné des résultats satisfaisants dans ce dernier essai. Un essai chez des poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) consistant en une mesure de la réponse sérologique à des doses croissantes du vaccin peut être utilisé ; l'administration de 1/25, 1/50 et 1/100 d'une dose et le prélèvement de sérum 17-21 jours plus tard peuvent convenir. Par ailleurs, l'essai de la teneur en antigène (section 2-5-2-1) associé à l'essai de l'adjuvant (section 2-5-2-2) peuvent être effectués s'il a été démontré qu'ils garantissent un essai d'activité valable.

2-5-2-1. *Teneur en antigène*. La teneur relative en antigène est déterminée en comparant la teneur en antigènes hémagglutinine-neuraminidase par dose de vaccin avec celle d'une préparation de référence d'antigènes hémagglutinine-neuraminidase, au moyen d'un immunotitrage à enzyme conjuguée (*2.7.1*). Pour cette comparaison, l'*antigène de référence du virus de la maladie de Newcastle PBR*, l'*antigène témoin du virus de la maladie de Newcastle PBR*, l'*anticorps de capture du virus de la maladie de Newcastle PBR* et l'*anticorps conjugué de détection du virus de la maladie de Newcastle PBR* sont appropriés. Avant estimation, l'antigène peut être extrait à partir de l'émulsion en utilisant du *myristate d'isopropyle R* ou une autre méthode appropriée. Le vaccin satisfait à l'essai si la teneur estimée en antigène n'est pas significativement inférieure à celle obtenue avec un lot ayant donné des résultats satisfaisants dans l'essai du Pouvoir immunogène (section 2-4-1).

Vaccins

2-5-2-2. *Adjuvant.* Si le titrage immunochimique (section 2-5-2-1) est réalisé et si le vaccin contient un adjuvant, celui-ci est contrôlé à l'aide de méthodes physiques et chimiques appropriées. Pour les vaccins à adjuvant huileux, l'adjuvant est soumis aux contrôles décrits dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062).* L'essai de teneur en antigène ne peut pas être utilisé en tant qu'essai d'activité du lot si l'adjuvant ne peut pas être caractérisé de manière convenable.

2-5-2-3. *Titrage sérologique.* Utilisez au moins 15 poulets âgés de 21-28 jours, de la même origine et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez à au moins 10 poulets par voie intramusculaire un volume de vaccin correspondant à 1/50 d'une dose. Gardez au moins 5 poulets comme témoins. Après 17-21 jours, prélevez des échantillons de sérum sur chaque poulet. Mesurez les taux en anticorps des sérums par l'essai d'inhibition de l'hémagglutination (HI) décrit ci-après ou par une technique équivalente qui utilise le même nombre d'unités hémagglutinantes et la même quantité d'érythrocytes. L'essai doit comporter des sérums témoins négatif et positif, le témoin positif ayant un titre HI de 5,0 $\log_2$ à 6,0 $\log_2$. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre HI moyen du groupe vacciné est égal ou supérieur à 4,0 $\log_2$ et celui du groupe non vacciné est de 2,0 $\log_2$ ou moins. Si les titres HI ne satisfont pas à ces critères, effectuez l'essai des vaccins destinés au poulet (section 2-4-1-1).

**Inhibition de l'hémagglutination**. Inactivez les sérums à examiner par chauffage à 56 °C pendant 30 min. Placez 25 µL de sérum inactivé dans la première rangée de cupules d'une plaque de microtitrage et 25 µL de solution tamponnée de *chlorure de sodium R* à 9 g/L à pH 7,2-7,4 dans les autres cupules. Préparez sur la plaque une série de dilutions de raison 2 du sérum. Dans chacune des cupules, ajoutez 25 µL d'une suspension contenant 4 unités hémagglutinantes du virus inactivé de la maladie de Newcastle. Faites incuber la plaque à 4 °C pendant 1 h. Ajoutez 25 µL d'une suspension à 1 pour cent *V/V* d'érythrocytes, prélevés sur des poulets âgés de 3-4 semaines et n'ayant pas d'anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Newcastle. Faites incuber la plaque à 4 °C pendant 1 h. Le titre HI est égal à la dilution la plus élevée qui produit une inhibition complète.

Vaccins

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le vaccin stimule la formation d'anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Newcastle, lorsqu'il est injecté à des animaux dépourvus de ces anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062).*

3-3. **Agents étrangers**. Utilisez 10 poulets âgés de 14-28 jours, de même origine et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez à chaque poulet par une voie recommandée une double dose de vaccin. Après 3 semaines, administrez 1 dose de vaccin par la même voie. 2 semaines plus tard, recueillez des échantillons de sérum sur chaque poulet et recherchez les anticorps dirigés contre les agents suivants par les méthodes prescrites dans le chapitre général *5.2.2. Elevages de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés pour la production et le contrôle de qualité des vaccins* : virus de l'encéphalomyélite aviaire, virus de la bronchite infectieuse aviaire, virus de la leucose aviaire, virus du syndrome de chute de ponte, virus de la bursite aviaire, virus de la laryngotrachéite infectieuse aviaire, virus de la grippe de type A, virus de la maladie de Marek. Le vaccin ne stimule pas la formation d'anticorps dirigés contre ces agents.

3-4. **Innocuité**. Si le vaccin est destiné au poulet, utilisez 10 poulets âgés de 14-28 jours, provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Si le vaccin n'est pas destiné au poulet, utilisez 10 oiseaux d'une des espèces auxquelles le vaccin est destiné, exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Newcastle. Administrez à chaque oiseau, par une voie d'administration recommandée, une double dose de vaccin. Observez les animaux au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des oiseaux ne présente de signes notables de la maladie de Newcastle ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-5. **Virus vivant résiduel**. La recherche du virus vivant résiduel est effectuée pour confirmer l'inactivation du virus de la maladie de Newcastle.

Utilisez 10 oeufs de poule embryonnés, provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) (oeufs EOPS), âgés de 9-11 jours. Injectez les 2/5$^{e}$ d'une dose de vaccin dans la cavité allantoïdienne de chaque oeuf et faites incuber. Observez les oeufs pendant 6 jours et recueillez séparément le liquide allantoïdien des oeufs contenant des embryons vivants et celui des oeufs contenant des embryons morts, à l'exclusion de ceux qui meurent dans les 24 h suivant l'injection. Effectuez sur les embryons qui meurent dans les 24 h une recherche du virus de la maladie de Newcastle ; le vaccin ne satisfait pas à l'essai si la présence du virus de la maladie de Newcastle est confirmée.

Dans la cavité allantoïdienne de 10 oeufs EOPS âgés de 9-11 jours, injectez 0,2 mL du liquide allantoïdien recueilli sur les embryons vivants et dans 10 oeufs semblables, 0,2 mL du liquide recueilli sur des embryons morts. Incubez-les pendant 5-6 jours. Effectuez une recherche d'hémagglutinines dans le liquide allantoïdien de chaque oeuf en utilisant des érythrocytes de poulet.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun signe d'activité hémagglutinante n'est observé et si au maximum 20 pour cent des embryons meurent pendant l'essai. Si plus de 20 pour cent des embryons meurent à l'une des étapes de l'essai, répétez cette étape ; le vaccin satisfait à l'essai si aucun signe d'activité hémagglutinante n'est alors observé et si au maximum 20 pour cent des embryons meurent à cette étape.

Des antibiotiques peuvent être utilisés dans l'essai pour empêcher toute infection bactérienne.

3-6. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-4-1.) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:1361**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA RHINITE ATROPHIQUE PROGRESSIVE DU PORC

## Vaccinum rhinitidis atrophicantis ingravescentis suillae inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la rhinite atrophique progressive du porc est une préparation qui contient soit l'exotoxine dermonécrotique de *Pasteurella multocida*, traitée de façon à la rendre inoffensive tout en maintenant des propriétés immunogènes appropriées, soit une forme génétiquement modifiée de l'exotoxine qui a des propriétés immunogènes appropriées et qui est exempte de propriétés toxiques ; le vaccin peut également contenir des cellules et/ou des composés antigéniques d'une ou de plusieurs souches appropriées de *P. multocida* et/ou de *Bordetella bronchiseptica*. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des truies et cochettes pour la protection passive de leur progéniture contre la rhinite atrophique progressive du porc.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Les souches bactériennes utilisées pour la production sont cultivées séparément sur des milieux appropriés. Les toxines et/ou cellules subissent un traitement destiné à assurer leur innocuité. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *DÉTOXIFICATION*

Un essai de détoxification de l'exotoxine dermonécrotique de *P. multocida* est effectué immédiatement après la détoxification. La concentration d'exotoxine détoxifiée utilisée dans l'essai n'est pas inférieure à celle du vaccin. La suspension d'exotoxine satisfait à l'essai si aucune trace d'exotoxine dermonécrotique toxique n'est détectée. L'essai de détoxification n'est pas nécessaire lorsque le vaccin est préparé à partir d'une protéine apparentée à la toxine mais exempte de propriétés toxiques et produite par l'expression d'une forme modifiée du gène correspondant.

2-3. *TENEUR EN ANTIGÈNE*

La teneur en exotoxine dermonécrotique de *P. multocida* de la suspension détoxifiée ou la teneur en la forme modifiée de l'exotoxine de la récolte sont déterminées par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), par exemple un immunotitrage à enzyme conjuguée. La valeur trouvée est utilisée dans la formulation du vaccin. La teneur des autres antigènes indiqués sur l'étiquette est également déterminée (*2.7.1*).

2-4. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il est démontré que les souches utilisées pour la préparation du vaccin sont satisfaisantes quant à la production de l'exotoxine dermonécrotique et des autres antigènes qui suscitent une réponse immunitaire protectrice et que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des truies et cochettes auxquelles il est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Production d'antigènes (section 2-4-1.), Innocuité (2-4-2.) et Pouvoir immunogène (section 2-4-3.) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-4-1. **Production d'antigènes**. La production des antigènes qui suscitent une réponse immunitaire protectrice est vérifiée par un titrage biologique ou une méthode immunochimique (*2.7.1*) appropriée, appliqués aux antigènes obtenus à partir de chacune des souches vaccinales dans les conditions qui seront utilisées pour la production du vaccin.

2-4-2. **Innocuité**

2-4-2-1. *Essai de laboratoire*. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination. Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin.

Pour chaque essai, utilisez au minimum 10 truies ou cochettes gestantes exemptes d'anticorps dirigés contre les composants du vaccin, provenant d'un ou plusieurs élevages ne présentant aucun signe de rhinite atrophique et où les animaux ne sont pas vaccinés contre la rhinite atrophique. Administrez à chaque porc une double dose de vaccin au stade recommandé de la gestation puis une dose après l'intervalle recommandé. Observez les porcs au moins une fois par jour pendant 14 jours. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 2 h, 4 h et 6 h après, puis journellement pendant 4 jours ; notez pour chaque porc l'augmentation maximale de température.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des porcs ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si l'augmentation moyenne de la température corporelle de tous les porcs n'est pas supérieure à 1,5 °C et aucun porc ne présente une augmentation supérieure à 2 °C.

2-4-2-2. *Essais sur le terrain*. Evaluez l'innocuité sur les mêmes porcs que ceux utilisés pour les essais sur le terrain. Effectuez l'essai sur au moins 3 groupes d'au moins 20 porcs chacun, et autant de groupes témoins d'au moins 10 porcs. Examinez le site d'injection après la vaccination pour rechercher les réactions locales. Enregistrez la température corporelle le jour précédent la vaccination, au moment de la vaccination, au moment où une augmentation de la température corporelle a été constatée lors de l'essai 2-4-2-1. le cas échéant, puis journellement pendant les 2 jours suivant la vaccination ; notez pour chaque porc l'augmentation maximale de température.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des porcs ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si l'augmentation moyenne de la température corporelle de tous les porcs n'est pas supérieure à 1,5 °C et aucun porc ne présente une augmentation supérieure à 2 °C.

2-4-3. **Pouvoir immunogène**. Effectuez chaque essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des porcs exempts d'anticorps dirigés contre les composants du vaccin et provenant d'un ou plusieurs élevages où il n'y a aucun signe de rhinite atrophique et où les animaux ne sont pas vaccinés contre la rhinite atrophique. Le vaccin administré à chaque porc a une activité minimale.

2-4-3-1. *Vaccins contenant l'exotoxine dermonécrotique de* P. multocida *(avec ou sans cellules de* P. multocida). Utilisez au minimum 12 reproductrices, en gestation ou non. Vaccinez selon le schéma recommandé au moins 6 truies prises au hasard et gardez-en au moins 6 autres comme témoins. Veillez à ce que, dès la naissance, les porcelets issus des truies vaccinées et des truies non vaccinées soient tous allaités par leur propre mère. Constituez de manière aléatoire, en vue de l'épreuve virulente, 2 groupes de porcelets : chaque groupe doit comporter au minimum 30 porcelets dont au moins 3 porcelets de chaque portée utilisée pour former le groupe. Chacun des 2 jours précédant l'épreuve, la muqueuse nasale de chaque porcelet peut être traitée par instillation de 0,5 mL d'une solution d'acide acétique (10 g/L de $C_2H_4O_2$) dans une solution saline isotonique tamponnée à pH 7,2. A l'âge de 10 jours, soumettez tous les porcelets à une épreuve virulente en leur administrant par voie intranasale une quantité suffisante d'une souche toxigène de *P. multocida*. A l'âge de 42 jours, euthanasiez les porcelets des 2 groupes et effectuez une coupe transversale des naseaux au niveau de la prémolaire 1. Examinez les cornets ventraux et dorsaux et la cloison nasale et notez les signes de distorsion ou d'atrophie selon les échelles suivantes :

*Cornets*

| | |
|---|---|
| 0 | aucune atrophie |
| 1 | très légère atrophie |
| 2 | légère atrophie |
| 3 | atrophie marquée |
| 4 | atrophie très marquée accompagnée de disparition presque complète du cornet. |

Le score maximal par cornet est de 4 et, pour la somme des 2 cornets dorsaux et des 2 cornets ventraux, de 16.

*Cloison nasale*

| | |
|---|---|
| 0 | aucune déviation |
| 1 | très légère déviation |
| 2 | déviation de la cloison |

Le score global maximal pour les cornets et la cloison est de 18.

L'essai n'est pas valable si, dans chacun des groupes issus de cochettes non vaccinées, la proportion de porcelets présentant un score global supérieur ou égal à 10 est inférieure à 80 pour cent. Le vaccin satisfait à l'essai s'il y a une diminution significative du score global dans le groupe issu des truies vaccinées par rapport au groupe issu des truies non vaccinées.

2-4-3-2. *Vaccins contenant l'exotoxine dermonécrotique de* P. multocida *(avec ou sans cellules de* P. multocida*) et des cellules ou des composants antigéniques de* B. bronchiseptica. Utilisez au minimum 24 reproductrices, en gestation ou non. Vaccinez selon le schéma recommandé au moins 12 de ces truies prises au hasard et gardez-en au moins 12 autres comme témoins. Veillez à ce que, dès la naissance, les porcelets issus des

Vaccins

truies vaccinées et des truies non vaccinées soient tous allaités par leur propre mère. A partir de groupes d'au moins 6 truies, constituez de manière aléatoire, en vue de l'épreuve virulente, 2 groupes de la progéniture des truies vaccinées et 2 groupes de la progéniture des truies non vaccinées ; chaque groupe doit comporter au minimum 30 porcelets dont au moins 3 porcelets de chaque portée utilisée pour former le groupe. Chacun des 2 jours précédant l'épreuve, la muqueuse nasale de chacun des porcelets peut être traitée par instillation de 0,5 mL d'une solution d'acide acétique (10 g/L de $C_2H_4O_2$) dans de la solution saline isotonique tamponnée à pH 7,2. Pour un des groupes de porcelets issus d'au moins 6 truies vaccinées et pour un des groupes de porcelets issus d'au moins 6 truies non vaccinées, soumettez tous les porcelets, à l'âge de 10 jours, à une épreuve virulente, en leur administrant par voie intranasale une quantité suffisante d'une souche toxigène de *P. multocida*. Soumettez les porcelets issus de l'autre groupe d'au moins 6 truies vaccinées et de l'autre groupe de 6 truies non vaccinées à 2 épreuves virulentes, en leur inoculant par voie intranasale une quantité suffisante de *B. bronchiseptica* à l'âge de 7 jours, puis une quantité suffisante d'une souche toxigène de *P. multocida* à l'âge de 10 jours. A l'âge de 42 jours, euthanasiez les porcelets des 4 groupes et effectuez une coupe transversale des naseaux au niveau de la prémolaire 1. Examinez les cornets ventraux et dorsaux et la cloison nasale et notez les signes de distorsion ou d'atrophie selon l'échelle décrite ci-dessus.

L'essai n'est pas valable si, dans chacun des groupes issus de cochettes non vaccinées, la proportion de porcelets présentant un score global supérieur ou égal à 10 est inférieure à 80 pour cent. Le vaccin satisfait à l'essai s'il y a une diminution significative du score global dans les groupes issus des reproductrices vaccinées par rapport aux groupes correspondants issus des reproductrices non vaccinées.

2-5. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-5-1. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-4.) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Utilisez au moins 7 porcs âgés d'au moins 3 semaines et exempts d'anticorps dirigés contre les composants du vaccin. Vaccinez au moins 5 porcs par la voie et selon le schéma recommandés pour la vaccination et gardez-en au moins 2 autres de même origine comme témoins, en les plaçant dans les mêmes conditions. Si la nature des antigènes permet l'obtention de résultats reproductibles, il est également admis d'effectuer l'essai sur des animaux de laboratoire exempts d'anticorps dirigés contre les composants du vaccin. Pour que l'essai soit valable, il peut alors être nécessaire d'utiliser plusieurs groupes d'animaux, dont chacun reçoit une quantité différente de vaccin. Pour chaque quantité de vaccin, procédez comme suit : administrez à au moins 5 animaux, une quantité appropriée du vaccin et gardez-en au moins 2 autres de même espèce et de même origine comme témoins. Si le schéma recommandé pour la vaccination comporte une injection de rappel, un rappel de vaccination peut également être fait lors de cet essai s'il a été démontré que cela constitue un système d'essai de sensibilité appropriée. Au bout d'un intervalle de temps donné, compris entre 14-21 jours après la dernière administration, effectuez un prélèvement sanguin sur chaque animal, et préparez des échantillons de sérum. Par une méthode validée telle qu'un immunotitrage à enzyme conjuguée, mesurez la réponse en anticorps vis-à-vis de chacun des antigènes mentionnés sur l'étiquette.

L'essai n'est pas valable si un titre en anticorps significatif est obtenu chez les témoins. Le vaccin satisfait à l'essai si la réponse en anticorps des animaux vaccinés n'est pas significativement inférieure à celle obtenue avec un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai ou les essais, selon le cas, décrits sous Activité.

Lorsque l'on ne dispose pas d'animaux exempts d'anticorps dirigés contre les antigènes mentionnés sur l'étiquette, il est admis de réaliser l'essai décrit ci-dessus sur des animaux séropositifs. Il faut alors veiller, lors du développement de l'essai, à établir que celui-ci est suffisamment sensible, et à définir des critères adéquats d'acceptation, de rejet ou de répétition. Il est nécessaire de prendre en compte l'étendue des titres possibles avant la vaccination et d'établir, par rapport à ces titres, l'augmentation minimale acceptable résultant de la vaccination.

2-5-2. **Endotoxines bactériennes**. Un essai des endotoxines bactériennes (*2.6.14*) est effectué sur chaque lot final ou, si la nature de l'adjuvant rend cet essai impossible, sur l'antigène en vrac ou le mélange d'antigènes en vrac juste avant addition de l'adjuvant. La teneur maximale acceptable en endotoxines bactériennes est celle trouvée pour un lot de vaccin qui a satisfait à l'essai d'innocuité 2-4-2-1. décrit sous Choix de la composition du vaccin ou à l'essai d'innocuité décrit sous Essai, effectué en utilisant 10 porcs. Lorsque ce dernier essai est utilisé, notez pour chaque porc l'augmentation maximale de température ; le vaccin satisfait à l'essai si l'augmentation moyenne de la température corporelle pour tous les porcs n'est pas supérieure à 1,5 °C. La méthode choisie pour déterminer la teneur en endotoxines bactériennes présente dans le lot de vaccin utilisé dans l'essai d'innocuité afin de déterminer le taux maximal acceptable d'endotoxines est utilisée par la suite pour le contrôle des lots.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Administré à des animaux exempts d'anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes mentionnés sur l'étiquette, le vaccin stimule la production de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez au moins 2 porcs exempts d'anticorps dirigés contre *P. multocida* et, de préférence, contre *B. bronchiseptica*. Administrez à chaque porc par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les porcs au moins une fois par jour pendant 14 jours. Enregistrez la température corporelle le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 2 h, 4 h et 6 h après, puis journellement pendant 2 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des porcs ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin ; il peut se produire une augmentation transitoire de la température corporelle qui ne dépasse pas 2 °C.

3-4. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences des essais du pouvoir immunogène (section 2-4-3.) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:1207**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA RHINOTRACHÉITE VIRALE DU CHAT

## Vaccinum rhinotracheitidis viralis felinae inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la rhinotrachéite virale du chat est une préparation d'une souche appropriée du virus de la rhinotrachéite du chat (virus herpès félin type 1), inactivée en maintenant des propriétés immunogènes appropriées ou une suspension d'une fraction inactivée de ce virus ayant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des chats contre la rhinotrachéite virale du chat.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires. La récolte virale est inactivée ; le virus peut subir une fragmentation et les fragments être purifiés et concentrés. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des chats auxquels il est destiné.

L'essai décrit ci-après sous Pouvoir immunogène (section 2-3-1) peut être utilisé pour établir l'efficacité.

2-3-1. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des chats âgés de 8-12 semaines. Le vaccin administré à chaque chat a une activité minimale.

Utilisez au moins 20 chats exempts d'anticorps dirigés contre l'herpèsvirus félin type 1 ou contre une fraction du virus. Administrez le vaccin à au moins 10 chats, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 10 autres comme témoins. Après 4 semaines, soumettez tous les chats à une épreuve virulente en leur administrant par voie intranasale une quantité de suspension d'une forme virulente de l'herpèsvirus félin type 1, suffisante pour provoquer des signes typiques de la maladie tels que fièvre, écoulement nasal, toux chez un chat exempt d'anticorps dirigés contre l'herpèsvirus félin type 1 ou une fraction du virus. Observez les chats au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de l'épreuve. Effectuez un lavage nasal quotidien du 2$^{e}$ au 14$^{e}$ jour suivant l'épreuve virulente, afin de déterminer l'excrétion du virus. Relevez la température quotidiennement ainsi que les signes de maladie selon la grille de cotation ci-après.

Le vaccin satisfait à l'essai si la cote des chats vaccinés est inférieure de façon significative à celle des témoins.

| **Signes observés** | **Cote** |
|---|---|
| Mort | 10 |
| Etat dépressif | 2 |
| Température : | |
| 39,5-40,0 °C | 1 |
| ≥ 40,0 °C | 2 |
| ≤ 37,0 °C | 3 |
| Glossite | 3 |
| Ecoulement nasal léger | 1 |
| Ecoulement nasal abondant | 2 |
| Toux | 2 |
| Eternuements | 1 |
| Eternuements paroxystiques | 2 |
| Ecoulement oculaire léger | 1 |
| Ecoulement oculaire abondant | 2 |
| Conjonctivite | 2 |
| Perte de poids ≥ 5,0 pour cent | 5 |
| Excrétion virale (nombre total de jours) : | |
| ≤ 4 jours | 1 |
| 5-7 jours | 2 |
| > 7 jours | 3 |

2-4. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-4-1. **Virus vivant résiduel**. La recherche d'herpèsvirus félin type 1 vivant résiduel est effectuée au moyen de 2 passages soit sur des cultures cellulaires du même type que celui qui a été utilisé dans la préparation du vaccin soit sur des cultures cellulaires dont il a été démontré qu'elles sont au moins aussi sensibles ; la quantité de récolte virale inactivée utilisée dans cet essai correspond à au moins 25 doses de vaccin. La récolte virale inactivée satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté.

2-4-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-5) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Utilisez un groupe de 15 souris séronégatives. Administrez à chaque souris une moitié de dose du vaccin et 7 jours plus tard, répétez l'administration. 21 jours après la première administration de vaccin, prélevez des échantillons de sang et déterminez le taux des anticorps dirigés contre l'herpèsvirus félin type 1 par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), par exemple un essai d'immunofluorescence pratiqué sur des mélanges de sérum provenant de groupes de 3 souris. Le vaccin satisfait à l'essai si le taux d'anticorps n'est pas inférieur de façon significative à celui obtenu avec un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Injecté à des animaux exempts d'anticorps spécifiques dirigés contre l'herpèsvirus félin type 1 ou contre la fraction du virus utilisée pour la production du vaccin, le vaccin stimule la formation de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 chats âgés de 8-12 semaines, de préférence exempts d'anticorps dirigés contre l'herpèsvirus félin type 1 ou contre une fraction du virus ou, dans des cas justifiés, utilisez des chats ayant un faible taux de ces anticorps, n'ayant pas été vaccinés contre la rhinotrachéite du chat et pour lesquels l'administration du vaccin n'entraîne pas de réponse anamnestique. Administrez à chaque chat par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les chats au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des chats ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Virus vivant résiduel**. Effectuez une recherche d'herpèsvirus félin type 1 vivant résiduel en utilisant 10 doses de vaccin et en faisant 2 passages sur des cultures cellulaires du même type que celui qui a été utilisé dans la préparation du vaccin ou sur d'autres cultures cellulaires de sensibilité appropriée. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté. Si le vaccin contient un adjuvant qui interfère avec la réalisation de l'essai, séparez si possible l'adjuvant de la phase liquide par une méthode qui n'inactive pas le virus et qui n'empêche pas autrement la détection de virus vivant.

3-5. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-1) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:1947**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA SALMONELLOSE À SALMONELLA ENTERITIDIS POUR LE POULET

## Vaccinum Salmonellae Enteritidis inactivatum ad pullum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la salmonellose à Salmonella Enteritidis pour le poulet est une préparation d'une ou de plusieurs souches appropriées de *Salmonella enterica* Enteritidis, inactivées en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à être administrés aux poulets pour réduire la colonisation par *S. enterica* Enteritidis et l'excrétion fécale de *S. enterica* Enteritidis.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

La semence est cultivée dans un milieu approprié ; chaque souche est cultivée séparément. Des paramètres tels que le taux de croissance sont contrôlés en cours de production par des méthodes appropriées ; les valeurs mesurées se situent dans les limites établies pour le vaccin considéré. La pureté et l'identité des cultures sont vérifiées sur la récolte par des méthodes appropriées. Après culture, les suspensions bactériennes sont récoltées séparément, inactivées par une méthode appropriée et mélangées. Le vaccin peut contenir des adjuvants.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant en ce qui concerne son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des oiseaux auxquels il est destiné. Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-2-1) et Pouvoir immunogène (section 2-2-2) peuvent être utilisés pour démontrer l'innocuité et l'efficacité.

2-2-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies d'administration recommandées pour la vaccination, en utilisant dans chaque cas des poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé. Utilisez un lot de vaccin dont l'activité est au moins égale à l'activité maximale susceptible d'être atteinte dans un lot de vaccin.

Utilisez au minimum 10 poulets provenant d'un élevage exempt de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*). Administrez à chaque poulet, par une voie et une méthode recommandées, une double dose de vaccin. Si le schéma de vaccination recommandé comprend l'administration d'une seconde dose, administrez une dose supplémentaire à chaque poulet, après au moins 14 jours. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant au moins 21 jours à compter de la dernière administration du vaccin.

L'essai n'est pas valable si plus de 10 pour cent des poulets présentent des signes anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun poulet ne présente de réaction locale ou générale anormale ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

2-2-2. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées. Le vaccin administré à chaque animal a une activité minimale.

Utilisez au moins 60 poulets EOPS (*5.2.2*) qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Vaccinez au moins 30 poulets avec au plus le nombre minimal de doses de vaccin recommandées. Gardez au moins 30 poulets comme témoins pour chaque groupe de poulets vaccinés. Soumettez à une épreuve virulente les 2 groupes, 4 semaines après la dernière administration du vaccin, en administrant par voie orale à chaque poulet une quantité suffisante d'une souche de *S. enterica* Enteritidis capable de coloniser les poulets. Effectuez des prélèvements sanguins sur les poulets témoins le jour précédant l'épreuve. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 4 semaines. Effectuez des prélèvements de fèces fraîches le 1er jour après l'épreuve et au moins 2 fois par semaine (y compris au 7e jour) pendant 14 jours après l'épreuve. Examinez les échantillons de fèces fraîches pour détecter la présence de *S. enterica* Enteritidis par dénombrement sur plaque. Euthanasiez tous les poulets survivants à la fin de la période d'observation, prélevez des échantillons de foie et de rate, et recherchez la présence de *S. enterica* Enteritidis par une méthode appropriée.

L'essai n'est pas valable si des anticorps dirigés contre *S. enterica* Enteritidis sont décelés chez un témoin avant l'épreuve.

Le vaccin satisfait à l'essai si :

- le nombre de *S. enterica* Enteritidis déterminé aux différents jours d'échantillonnage après l'épreuve sur les échantillons de fèces fraîches, prélevés sur des poulets vaccinés, est inférieur de manière significative à celui observé chez les témoins et demeure inférieur jusqu'à la fin de l'essai ;
- le nombre d'échantillons positifs de foie et de rate observés chez les poulets vaccinés est inférieur de manière significative à celui observé chez les témoins.

2-3. *ESSAI DU FABRICANT*

2-3-1. **Essai d'activité effectué sur chaque lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'activité (section 3-4) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, une autre méthode validée appropriée est utilisée, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Utilisez au minimum 15 poulets EOPS (*5.2.2*). Gardez au minimum 5 poulets EOPS comme témoins. Administrez à 10 poulets une dose de vaccin par une voie recommandée. Si le schéma de vaccination indiqué sur l'étiquette comporte une injection de rappel, un rappel de vaccination peut également être fait lors de cet essai s'il a été démontré que cela constitue un système d'essai de sensibilité appropriée. A un temps donné après la dernière injection, prélevez du sang de chacun des poulets vaccinés et témoins et préparez des échantillons de sérum. Mesurez le titre en anticorps dirigés contre *S. enterica* Enteritidis dans chaque échantillon de sérum en utilisant une méthode sérologique validée appropriée. Calculez le titre pour le groupe de poulets vaccinés.

L'essai n'est pas valable si des anticorps spécifiquement dirigés contre *S. enterica* Enteritidis sont détectés à partir d'un ou plusieurs sérums des témoins à un temps donné après l'administration du vaccin au groupe de poulets vaccinés.

Le vaccin satisfait à l'essai si les titres en anticorps du groupe des poulets vaccinés à un temps donné après chaque vaccination, dans les cas appropriés, ne sont pas inférieurs de façon significative à la valeur obtenue avec un lot de vaccin ayant donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité (section 3-4).

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Chez des animaux dépourvus d'anticorps dirigés contre *S. enterica* Enteritidis, le vaccin stimule la production de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez au moins 10 poulets EOPS (*5.2.2*) et ayant au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Administrez à chacun d'eux une double dose de vaccin par une voie recommandée. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 20 pour cent des poulets présentent des signes anormaux

Vaccins

ou meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun poulet ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-2-2) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:2361**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA SALMONELLOSE À SALMONELLA TYPHIMURIUM POUR LE POULET

## Vaccinum Salmonellae Typhimurium inactivatum ad pullum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la salmonellose à Salmonella Typhimurium pour le poulet est une préparation d'une ou de plusieurs souches appropriées de *Salmonella enterica* Typhimurium, inactivées en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à être administrés aux poulets pour réduire la colonisation par *S. enterica* Typhimurium et l'excrétion fécale de *S. enterica* Typhimurium.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

La semence est cultivée dans un milieu approprié ; chaque souche est cultivée séparément. Des paramètres tels que le taux de croissance sont contrôlés en cours de production par des méthodes appropriées ; les valeurs mesurées se situent dans les limites établies pour le vaccin considéré. La pureté et l'identité des cultures sont vérifiées sur la récolte par des méthodes appropriées. Après culture, les suspensions bactériennes sont récoltées séparément, inactivées par une méthode appropriée et mélangées. Le vaccin peut contenir des adjuvants.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant en ce qui concerne son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des oiseaux auxquels il est destiné. Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-2-1) et Pouvoir immunogène (section 2-2-2) peuvent être utilisés pour démontrer l'innocuité et l'efficacité.

2-2-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé. Utilisez un lot de vaccin dont l'activité est au moins égale à l'activité maximale susceptible d'être atteinte dans un lot de vaccin.

Utilisez au minimum 10 poulets provenant d'un élevage exempt de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*). Administrez à chaque poulet, par une voie et une méthode recommandées, une double dose de vaccin. Si le schéma de vaccination recommandé comprend l'administration d'une seconde dose, administrez une dose supplémentaire à chaque poulet, après au moins 14 jours. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant au moins 21 jours à compter de la dernière administration du vaccin.

L'essai n'est pas valable si plus de 10 pour cent des poulets présentent des signes anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun poulet ne présente de réaction locale ou générale anormale ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

2-2-2. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées. Le vaccin administré à chaque animal a une activité minimale.

Utilisez au moins 60 poulets EOPS (*5.2.2*) qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Vaccinez au moins 30 poulets avec au plus le nombre minimal de doses de vaccin recommandées. Gardez au moins 30 poulets comme témoins pour chaque groupe de poulets vaccinés. Soumettez à une épreuve virulente les 2 groupes, 4 semaines après la dernière administration du vaccin, en administrant par voie orale à chaque poulet une quantité suffisante d'une souche de *S. enterica* Typhimurium capable de coloniser les poulets. Effectuez des prélèvements sanguins sur les poulets témoins le jour précédant l'épreuve. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 4 semaines. Effectuez des prélèvements de fèces fraîches le 1er jour après l'épreuve et au moins 2 fois par semaine (y compris au 7e jour) pendant 14 jours après l'épreuve. Examinez les échantillons de fèces fraîches pour détecter la présence de *S. enterica* Typhimurium par dénombrement sur plaque. Euthanasiez tous les poulets survivants à la fin de la période d'observation, prélevez des échantillons de foie et de rate, et recherchez la présence de *S. enterica* Typhimurium par une méthode appropriée.

L'essai n'est pas valable si des anticorps dirigés contre *S. enterica* Typhimurium sont décelés chez un témoin avant l'épreuve.

Le vaccin satisfait à l'essai si :

- le nombre de *S. enterica* Typhimurium déterminé aux différents jours d'échantillonnage après l'épreuve sur les échantillons de fèces fraîches prélevés sur des poulets vaccinés, est inférieur de manière significative à celui observé chez les témoins et demeure inférieur jusqu'à la fin de l'essai ;
- le nombre d'échantillons positifs de foie et de rate observés chez les poulets vaccinés est inférieur de manière significative à celui observé chez les témoins.

2-3. *ESSAI DU FABRICANT*

2-3-1. **Essai d'activité effectué sur chaque lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'activité (section 3-4) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, une autre méthode validée appropriée est utilisée, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Utilisez au minimum 15 poulets EOPS (*5.2.2*). Gardez au minimum 5 poulets EOPS comme témoins. Administrez à 10 poulets une dose de vaccin par une voie recommandée. Si le schéma de vaccination indiqué sur l'étiquette comporte une injection de rappel, un rappel de vaccination peut également être fait lors de cet essai s'il a été démontré que cela constitue un système d'essai de sensibilité appropriée. A un temps donné après la dernière injection, prélevez du sang de chacun des poulets vaccinés et témoins et préparez des échantillons de sérum. Mesurez le titre en anticorps dirigés contre *S. enterica* Typhimurium dans chaque échantillon de sérum en utilisant une méthode sérologique validée appropriée. Calculez le titre pour le groupe de poulets vaccinés.

L'essai n'est pas valable si des anticorps spécifiquement dirigés contre *S. enterica* Typhimurium sont détectés à partir d'un ou plusieurs sérums des témoins à un temps donné après l'administration du vaccin au groupe des poulets vaccinés.

Le vaccin satisfait à l'essai si les titres en anticorps du groupe des poulets vaccinés à un temps donné après chaque vaccination, dans les cas appropriés, ne sont pas inférieurs de façon significative à la valeur obtenue avec un lot de vaccin ayant donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité (section 3-4).

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Chez des animaux dépourvus d'anticorps dirigés contre *S. enterica* Typhimurium, le vaccin stimule la production de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez au moins 10 poulets EOPS (*5.2.2*) et ayant au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Administrez à chacun d'eux une double dose de vaccin par une voie recommandée. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 20 pour cent des poulets présentent des signes anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun poulet ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-2-2) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**07/2010:1580**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA VIBRIOSE DES EAUX FROIDES POUR SALMONIDÉS

## Vaccinum vibriosidis aquae frigidae inactivatum ad salmonidas

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la vibriose des eaux froides pour salmonidés est préparé à partir de cultures d'une ou de plusieurs souches appropriées de *Vibrio salmonicida,* inactivées en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immmunisation active des salmonidés contre la vibriose des eaux froides.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Les souches de *V. salmonicida* sont cultivées et récoltées séparément. Les récoltes sont ensuite inactivées par une méthode appropriée. Elles peuvent être purifiées et concentrées. Il est possible d'utiliser des cellules entières, ou des cellules fragmentées ; le vaccin peut contenir des produits extracellulaires sécrétés par la bactérie dans le milieu de croissance.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Le vaccin est produit à partir d'une ou de plusieurs souches de *V. salmonicida* qui sont satisfaisantes quant à la production des antigènes considérés comme importants du point de vue protecteur. Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) pour les espèces ichtyennes auxquelles il est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (2-2-1) et Pouvoir immunogène (section 2-2-2) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-2-1. **Innocuité**

2-2-1-1. *Essais de laboratoire*. L'innocuité est démontrée par l'essai 2-2-1-1-1, l'essai 2-2-1-1-2 ou les deux, selon les recommandations pour l'emploi du vaccin.

Effectuez l'essai pour chacune des espèces auxquelles le vaccin est destiné, en utilisant des poissons de la masse corporelle minimale recommandée pour la vaccination. Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin. Effectuez l'essai dans les conditions recommandées pour l'emploi du vaccin, la température de l'eau n'étant pas inférieure à 10 °C.

2-2-1-1-1. *Vaccins destinés à être administrés par injection*. Utilisez au minimum 50 poissons provenant d'une population exempte d'anticorps spécifiques dirigés contre *V. salmonicida* et qui n'a pas été vaccinée contre, ni exposée à la vibriose des eaux froides. Administrez à chaque poisson par voie intrapéritonéale une double dose de vaccin. Observez les poissons au moins une fois par jour pendant 21 jours.

L'essai n'est pas valable si plus de 6 pour cent des poissons meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des poissons ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

2-2-1-1-2. *Vaccins destinés à être administrés par immersion*. Utilisez au minimum 50 poissons provenant d'une population exempte d'anticorps spécifiques dirigés contre *V. salmonicida* et qui n'a pas été vaccinée contre, ni exposée à la vibriose des eaux froides. Préparez un bain d'immersion de concentration double de celle recommandée pour la vaccination et immergez les poissons dans le bain pendant 2 fois le temps recommandé. Observez les poissons au moins une fois par jour pendant 21 jours.

L'essai n'est pas valable si plus de 6 pour cent des poissons meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des poissons ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

2-2-1-2. *Essais sur le terrain*. L'innocuité du vaccin est également établie au moyen d'essais sur le terrain, par administration de la dose recommandée à un nombre suffisant de poissons répartis dans au moins 2 sites d'élevage différents.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des poissons ne présente de réaction anormale ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

2-2-2. **Pouvoir immunogène**. Effectuez un essai d'activité pour chaque espèce de poisson et pour chaque souche présente dans le vaccin, selon un protocole qui définit la source d'eau, le débit de l'eau, les limites de température et la préparation d'une épreuve virulente normalisée. Effectuez chaque essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées. Le vaccin administré à chaque poisson a une activité minimale.

Utilisez au moins 200 poissons de la masse corporelle minimale recommandée pour la vaccination, provenant d'une population exempte d'anticorps spécifiques dirigés contre *V. Salmonicida* et qui n'a pas été vaccinée contre, ni exposée à la vibriose des eaux froides. Vaccinez au moins 100 poissons selon le mode d'emploi. Effectuez une vaccination à blanc d'un groupe d'au moins 100 poissons témoins ; marquez les poissons vaccinés et les poissons témoins afin de pouvoir les identifier. Les poissons vaccinés et les poissons témoins sont soit maintenus dans le même bac, soit répartis en nombre égal dans chaque bac si plus d'un bac est utilisé. Dans les cas justifiés et lorsque les poissons ne peuvent pas être marqués, des poissons non marqués peuvent être utilisés et les poissons vaccinés et les poissons témoins peuvent alors être maintenus dans le même bac mais physiquement séparés (par ex. par des filets de pêche). Après un intervalle défini suivant la vaccination, soumettez tous les poissons à une épreuve virulente en leur administrant, selon une voie d'administration appropriée, une quantité suffisante d'une culture d'une souche de *V. salmonicida* dont la virulence a été vérifiée. L'intervalle correspond à l'apparition de l'immunité revendiquée. Observez les poissons au moins une fois par jour jusqu'au moment où le taux de mortalité spécifique chez les poissons témoins atteint au moins 60 pour cent. Portez sur un graphique le taux de mortalité spécifique par rapport au temps pour les 2 groupes et déterminez par interpolation le temps qui correspond à un taux de mortalité spécifique de 60 pour cent chez les poissons témoins.

L'essai n'est pas valable si, 21 jours après la mort du premier poisson, le taux de mortalité spécifique des poissons témoins est inférieur à 60 pour cent. Notez la mortalité $M$ chez les poissons vaccinés au temps qui correspond à 60 pour cent de mortalité chez les poissons témoins. Calculez le pourcentage de survie relatif à l'aide de l'expression suivante :

$$\left(1 - \frac{M}{60}\right) \times 100$$

Le vaccin satisfait à l'essai si le pourcentage de survie relatif n'est pas inférieur à 60 pour cent dans le cas d'un vaccin administré par immersion et à 90 pour cent dans le cas d'un vaccin administré par injection.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Activité du lot**. L'essai d'activité (section 3-4) peut être effectué sur chaque lot de vaccin avec des groupes d'au moins 30 poissons d'une des espèces auxquelles le vaccin est destiné. Les poissons vaccinés et les poissons témoins sont soit maintenus dans le même bac, soit répartis en nombre égal dans chaque bac si plus d'un bac est utilisé. Dans les cas justifiés et lorsque les poissons ne peuvent pas être marqués, des poissons non marqués peuvent être utilisés et les poissons vaccinés et les poissons témoins peuvent alors être maintenus dans le même bac mais physiquement séparés (par ex. par des filets de pêche). Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié fondé sur la réponse en anticorps peut être effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Utilisez au moins 35 poissons qui proviennent d'une population exempte d'anticorps spécifiques dirigés contre *V. salmonicida* et qui ont une masse corporelle comprise dans des limites définies. Effectuez l'essai à une température définie. Vaccinez au moins 25 poissons avec une dose de vaccin selon le mode d'emploi. Effectuez une vaccination à blanc d'un groupe d'au moins 10 poissons témoins. Prélevez des échantillons de sang après un délai défini. Déterminez pour chaque échantillon le taux d'anticorps spécifiques dirigés contre *V. salmonicida* par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). L'essai n'est pas valable si des anticorps spécifiques dirigés contre *V. salmonicida* sont retrouvés chez les poissons témoins. Le vaccin satisfait à l'essai si le taux moyen d'anticorps obtenu chez les poissons vaccinés n'est pas inférieur de façon significative à celui obtenu pour un lot ayant donné des résultats satisfaisants à l'essai décrit sous Activité.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Administré à des poissons exempts d'anticorps spécifiques dirigés contre *V. salmonicida*, le vaccin stimule la production de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez au moins 10 poissons d'une des espèces auxquelles le vaccin est destiné et ayant, si possible, la masse corporelle minimale recommandée pour la vaccination ; si des poissons ayant la masse minimale ne sont pas disponibles, utilisez des poissons ayant jusqu'à 2 fois cette masse. Utilisez des poissons qui proviennent d'une population exempte d'anticorps spécifiques dirigés contre *V. salmonicida* et qui n'a pas été vaccinée contre, ni exposée à la vibriose des eaux froides. Effectuez l'essai dans les conditions recommandées pour l'administration du vaccin, la température de l'eau n'étant pas inférieure à 10 °C.

Pour les vaccins pouvant être administrés à la fois par injection et par immersion, administrez à chaque poisson par voie intrapéritonéale une double dose de vaccin. Pour les vaccins administrés seulement par immersion, utilisez un bain de concentration double de celle recommandée pour la vaccination et immergez les poissons dans ce bain pendant 2 fois le temps d'immersion recommandé. Observez les poissons au moins une fois par jour pendant 21 jours.

L'essai n'est pas valable si plus de 10 pour cent des poissons meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des poissons ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai du pouvoir immunogène (section 2-2-2) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

4. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique les informations concernant le temps nécessaire pour le développement de l'immunité après vaccination dans les différentes conditions correspondant au mode d'emploi recommandé.

**07/2010:1581**

# VACCIN INACTIVÉ DE LA VIBRIOSE POUR SALMONIDÉS

## Vaccinum vibriosidis inactivatum ad salmonidas

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de la vibriose pour salmonidés est préparé à partir de cultures d'une ou de plusieurs souches ou sérovars appropriés de *Listonella anguillarum (Vibrio anguillarum)*, inactivées en maintenant des propriétés immunogènes appropriées ; il peut également contenir *Vibrio ordalii*. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des salmonidés contre la vibriose.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Les souches de *L. anguillarum* et de *V. ordalii* sont cultivées et récoltées séparément. Les récoltes sont ensuite inactivées par une méthode appropriée. Elles peuvent être purifiées et concentrées. Il est possible d'utiliser des cellules entières, ou des cellules fragmentées ; le vaccin peut contenir des produits extracellulaires sécrétés par la bactérie dans le milieu de croissance.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Le vaccin est produit à partir de souches de *L. anguillarum* et de *V. ordalii* qui sont satisfaisantes quant à la production des antigènes considérés comme importants du point de vue protecteur . Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) pour les espèces ichtyennes auxquelles il est destiné.
Les essais décrits ci-après sous Innocuité (2-2-1) et Pouvoir immunogène (section 2-2-2) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-2-1. **Innocuité**

2-2-1-1. *Essais de laboratoire*. L'innocuité est démontrée par l'essai 2-2-1-1-1, l'essai 2-2-1-1-2 ou les deux, selon les recommandations pour l'emploi du vaccin.

Effectuez l'essai pour chacune des espèces auxquelles le vaccin est destiné, en utilisant des poissons de la masse corporelle minimale recommandée pour la vaccination. Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin. Effectuez l'essai dans les conditions recommandées pour l'emploi du vaccin, la température de l'eau n'étant pas inférieure à 10 °C.

2-2-1-1-1. *Vaccins destinés à être administrés par injection*. Utilisez au minimum 50 poissons provenant d'une population exempte d'anticorps spécifiques dirigés contre *L. anguillarum* et dans les cas appropriés, *V. ordalii* et qui n'a pas été vaccinée contre, ni exposée à la vibriose. Administrez à chaque poisson par voie intrapéritonéale une double dose de vaccin. Observez les poissons au moins une fois par jour pendant 21 jours.

L'essai n'est pas valable si plus de 6 pour cent des poissons meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des poissons ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

Vaccins

2-2-1-1-2. *Vaccins destinés à être administrés par immersion*. Utilisez au minimum 50 poissons provenant d'une population exempte d'anticorps spécifiques dirigés contre *L. anguillarum* et dans les cas appropriés, *V. ordalii* et qui n'a pas été vaccinée contre, ni exposée à la vibriose. Préparez un bain d'immersion de concentration double de celle recommandée pour la vaccination et immergez les poissons dans le bain pendant 2 fois le temps recommandé. Observez les poissons au moins une fois par jour pendant 21 jours.

L'essai n'est pas valable si plus de 6 pour cent des poissons meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des poissons ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

2-2-1-2. *Essais sur le terrain*. L'innocuité du vaccin est également établie au moyen d'essais sur le terrain, par administration de la dose recommandée à un nombre suffisant de poissons répartis dans au moins 2 sites d'élevage différents.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des poissons ne présente de réaction anormale ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

2-2-2. **Pouvoir immunogène**. Effectuez un essai d'activité pour chaque espèce de poisson et pour chaque sérovar présent dans le vaccin, selon un protocole qui définit la source d'eau, le débit de l'eau, les limites de température et la préparation d'une épreuve virulente normalisée. Effectuez chaque essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées. Le vaccin administré à chaque poisson a une activité minimale.

Utilisez au moins 200 poissons de la masse corporelle minimale recommandée pour la vaccination, provenant d'une population exempte d'anticorps spécifiques dirigés contre *L. anguillarum* et dans les cas appropriés, *V. ordalii* et qui n'a pas été vacciné contre, ni exposée à la vibriose. Vaccinez au moins 100 poissons selon le mode d'emploi. Effectuez une vaccination à blanc d'un groupe d'au moins 100 poissons témoins ; marquez les poissons vaccinés et les poissons témoins afin de pouvoir les identifier. Les poissons vaccinés et les poissons témoins sont soit maintenus dans le même bac, soit répartis en nombre égal dans chaque bac si plus d'un bac est utilisé. Dans les cas justifiés et lorsque les poissons ne peuvent pas être marqués, des poissons non marqués peuvent être utilisés et les poissons vaccinés et les poissons témoins peuvent alors être maintenus dans le même bac mais physiquement séparés (par ex. par des filets de pêche). Après un intervalle défini suivant la vaccination, soumettez tous les poissons à une épreuve virulente en leur administrant, selon une voie d'administration appropriée, une quantité suffisante d'une culture d'une souche de *L. anguillarum* ou de *V. ordalii* dont la virulence a été vérifiée. L'intervalle correspond à l'apparition de l'immunité revendiquée. Observez les poissons au moins une fois par jour jusqu'au moment où le taux de mortalité spécifique chez les poissons témoins atteint au moins 60 pour cent. Portez sur un graphique le taux de mortalité spécifique par rapport au temps pour les 2 groupes et déterminez par interpolation le temps qui correspond à un taux de mortalité spécifique de 60 pour cent chez les poissons témoins.

L'essai n'est pas valable si, 21 jours après la mort du premier poisson, le taux de mortalité spécifique des poissons témoins est inférieur à 60 pour cent. Notez la mortalité $M$ chez les poissons vaccinés au temps qui correspond à 60 pour cent de mortalité chez les poissons témoins. Calculez le pourcentage de survie relatif à l'aide de l'expression suivante :

$$\left(1 - \frac{M}{60}\right) \times 100$$

Le vaccin satisfait à l'essai si le pourcentage de survie relatif n'est pas inférieur à 60 pour cent dans le cas d'un vaccin administré par immersion et à 75 pour cent dans le cas d'un vaccin administré par injection.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Activité du lot**. L'essai d'activité (section 3-4) peut être effectué sur chaque lot de vaccin avec des groupes d'au moins 30 poissons d'une des espèces auxquelles le vaccin est destiné. Les poissons vaccinés et les poissons témoins sont soit maintenus dans le même bac soit répartis en nombre égal dans chaque bac si plus d'un bac est utilisé. Dans les cas justifiés et lorsque les poissons ne peuvent pas être marqués, des poissons non marqués peuvent être utilisés et les poissons vaccinés et les poissons témoins peuvent alors être maintenus dans le même bac mais physiquement séparés (par ex. par des filets de pêche). Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié fondé sur la réponse en anticorps peut être effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Utilisez au moins 35 poissons qui proviennent d'une population exempte d'anticorps spécifiques dirigés contre *L. anguillarum* et, le cas échéant, contre *V. ordalii* et qui ont une masse corporelle comprise dans des limites définies. Effectuez l'essai à une température définie. Vaccinez au moins 25 poissons avec une dose de vaccin selon le mode d'emploi. Effectuez une vaccination à blanc d'un groupe d'au moins 10 poissons témoins. Prélevez des échantillons de sang après un délai défini. Déterminez pour chaque échantillon le taux d'anticorps spécifiques dirigés contre *L. anguillarum* et, le cas échéant, contre *V. ordalii* par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). L'essai n'est pas valable si des anticorps dirigés contre *L. anguillarum* ou, le cas échéant, contre *V. ordalii* sont retrouvés chez les poissons témoins. Le vaccin satisfait à l'essai si le taux moyen d'anticorps obtenu chez les poissons vaccinés n'est pas inférieur de façon significative à celui obtenu pour un lot ayant donné des résultats satisfaisants à l'essai décrit sous Activité.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Administré à des poissons exempts d'anticorps spécifiques dirigés contre *L. anguillarum* et, le cas échéant, *V. ordalii*, le vaccin stimule la production de ces anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez au moins 10 poissons d'une des espèces auxquelles le vaccin est destiné et ayant, si possible, la masse corporelle minimale recommandée pour la vaccination ; si des poissons ayant la masse minimale ne sont pas disponibles, utilisez des poissons ayant jusqu'à 2 fois cette masse. Utilisez des poissons qui proviennent d'une population exempte d'anticorps spécifiques dirigés contre *L. anguillarum* et, le cas échéant, contre *V. ordalii* et qui n'a pas été vaccinée contre, ni exposée à la vibriose. Effectuez l'essai dans les conditions recommandées pour l'administration du vaccin, la température de l'eau n'étant pas inférieure à 10 °C.

Pour les vaccins pouvant être administrés à la fois par injection et par immersion, administrez à chaque poisson par voie intrapéritonéale une double dose de vaccin . Pour les vaccins administrés seulement par immersion, utilisez un bain de concentration double de celle recommandée pour la vaccination et immergez les poissons dans ce bain pendant 2 fois le temps d'immersion recommandé. Observez les poissons au moins une fois par jour pendant 21 jours.

L'essai n'est pas valable si plus de 10 pour cent des poissons meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des poissons ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-2-2) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

4. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique les informations concernant le temps nécessaire pour le développement de l'immunité après vaccination dans les différentes conditions correspondant au mode d'emploi recommandé.

**01/2008:1613**

# VACCIN INACTIVÉ DE L'HERPÈSVIRUS ÉQUIN

## Vaccinum herpesviris equini inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de l'herpèsvirus équin est une préparation d'une ou plusieurs souches appropriées de l'herpèsvirus 1 et/ou de l'herpèsvirus 4 des équidés, inactivées en maintenant des propriétés immunogènes appropriées, ou une suspension d'une fraction inactivée du virus. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des chevaux contre les maladies causées par l'herpèsvirus 1 et/ou l'herpèsvirus 4 des équidés.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Chaque souche du virus vaccinal est multipliée séparément en cultures cellulaires. Les suspensions virales peuvent être purifiées et concentrées, et sont inactivées ; elles peuvent faire l'objet d'un traitement visant à fractionner le virus, et les fractions virales peuvent être purifiées et concentrées. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des chevaux auxquels il est destiné. Lorsqu'une race chevaline est connue pour être particulièrement sensible au vaccin, des chevaux de cette race figurent parmi ceux utilisés pour l'essai d'innocuité. Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1) et Pouvoir immunogène (section 2-3-2) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées et pour les chevaux de chacune des catégories auxquelles le vaccin est destiné. Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccins.

2-3-1-1-1. *Innocuité générale.* Utilisez au minimum 10 chevaux qui n'ont pas été vaccinés avec un vaccin de l'herpèsvirus des équidés, ayant au plus un faible taux d'anticorps qui n'indique pas une infection récente et qui n'excrètent pas d'herpèsvirus des équidés. Administrez à chaque cheval une double dose de vaccin, puis une dose après 14 jours. Observez les chevaux au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de la dernière administration.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des chevaux ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin pendant les 28 jours de l'essai.

2-3-1-1-2. *Innocuité chez la jument gravide.* Si le vaccin est destiné à la jument gravide, utilisez au minimum 10 juments gravides pendant le ou les trimestres appropriés selon le schéma recommandé. Administrez à chaque jument une double dose de vaccin, puis une dose après 14 jours. Observez les juments au moins une fois par jour jusqu'à la mise bas.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucune des juments ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-3-2. **Pouvoir immunogène**. Le type d'essai du pouvoir immunogène à effectuer est fonction des indications prophylactiques du vaccin. Effectuez l'essai 2-3-2-1 pour les vaccins destinés à protéger contre les affections respiratoires, avec une épreuve virulente au moyen de l'herpèsvirus 1 ou 4 des équidés, selon les indications de protection. Effectuez l'essai 2-3-2-2 pour les vaccins destinés à protéger contre l'avortement.

Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des chevaux qui n'ont pas été vaccinés avec un vaccin de l'herpèsvirus des équidés, ayant au plus un faible taux d'anticorps qui n'indique pas une infection récente, et qui n'excrètent pas d'herpèsvirus des équidés. Pour démontrer qu'il n'y a pas d'infection récente, immédiatement avant la vaccination : prélevez du sang sur chaque cheval et effectuez sur chaque échantillon une recherche d'anticorps dirigés contre les herpèsvirus 1 et 4 des équidés ; prélevez 10 mL de sang hépariné et effectuez une recherche d'herpèsvirus 1 et 4 des équidés sur les leucocytes lavés ; pratiquez un écouvillonage nasopharyngien et effectuez une recherche des herpèsvirus 1 et 4 des équidés. Il n'y a aucune indication d'une infection active. Immédiatement avant l'épreuve virulente pratiquez un écouvillonage nasopharyngien et effectuez une recherche des herpèsvirus 1 et 4 des équidés. S'il y a une indication d'excrétion virale, écartez le cheval de l'essai. Maintenez les chevaux en isolement strict. Le vaccin administré à chaque cheval a une activité minimale.

2-3-2-1. *Vaccins destinés à la protection contre les affections respiratoires.* Utilisez au moins 10 chevaux, âgés d'au moins 6 mois. Vaccinez au moins 6 chevaux selon le schéma recommandé et gardez-en 4 au minimum autres comme témoins. Après au moins 2 semaines à compter de la dernière vaccination, soumettez tous les chevaux à une épreuve virulente en leur administrant par instillation nasale une quantité d'herpèsvirus 1 ou 4 des équidés suffisante pour produire chez un cheval réceptif des signes caractéristiques de la maladie, tels que la pyrexie et l'excrétion virale (et, éventuellement, jetage et toux). Observez les chevaux au moins une fois par jour pendant 14 jours. Effectuez journellement sur chaque cheval des écouvillonnages nasopharyngiens afin d'isoler le virus.

Le vaccin satisfait à l'essai si les chevaux vaccinés présentent tout au plus des signes légers, et les éventuels signes observables chez les chevaux vaccinés sont moins sévères que chez les chevaux témoins. Le nombre moyen de jours pendant lesquels le virus est excrété, ainsi que les titres en virus respectivement obtenus, sont significativement plus faibles chez les chevaux vaccinés que chez les chevaux témoins.

2-3-2-2. *Vaccins destinés à la protection contre l'avortement.* Utilisez au moins 10 juments gravides. En complément aux essais décrits ci-dessus, prélevez un échantillon du sang de chaque cheval aux mois 6, 4, 3, 2 et 1 avant la première vaccination, et effectuez une recherche d'anticorps dirigés contre les herpèsvirus 1 et 4 des équidés sur chaque prélèvement. Il n'apparaît aucune indication d'une infection récente ou d'excrétion virale. Vaccinez au moins 6 des juments selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 4 autres comme témoins. Entre les jours 260 et 290 de la gestation, mais pas avant 3 semaines à compter de la dernière vaccination, soumettez toutes les juments à une épreuve virulente en leur administrant par instillation nasale une quantité d'herpèsvirus 1 des équidés suffisante pour produire l'avortement chez une jument réceptive. Observez les juments au moins une fois par jour jusqu'à la fin de la gestation (mise bas ou avortement). Prélevez des échantillons de tissus des poumons et du foie des foetus avortés et effectuez des recherches de virus en cultures cellulaires.

L'essai n'est pas valable si plus d'une jument témoin donne naissance à un poulain sain et si le virus d'épreuve n'est pas retrouvé chez les foetus avortés. Le vaccin satisfait à l'essai s'il y a un avortement au plus chez les juments vaccinées.

2-4. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-4-1. **Virus vivant résiduel**. La recherche de virus vivant résiduel est effectuée au moyen de 2 passages dans le même type de culture cellulaire que celui utilisé en production ou dans des cultures cellulaires de sensibilité au moins équivalente. La quantité de récolte virale inactivée utilisée à cet effet est au moins équivalente à 25 doses de vaccin. La récolte virale inactivée satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté.

2-4-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-5) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Utilisez au moins 5 lapins, cobayes ou souris. Administrez à chacun d'eux, en une seule fois, une dose appropriée du vaccin. Si le schéma recommandé pour la vaccination comporte une seconde injection, ce schéma recommandé peut être appliqué aux animaux de laboratoire à condition qu'il ait été démontré qu'il constitue un système d'essai de sensibilité appropriée. A un temps donné compris entre 14-21 jours à compter de la dernière injection, effectuez un prélèvement sanguin sur chaque animal et préparez des échantillons de sérum. Utilisez un essai validé approprié, par exemple un dosage par immunoadsorption à enzyme conjuguée, pour mesurer la réponse en anticorps à chacun des antigènes indiqués sur l'étiquette. Le vaccin satisfait à l'essai si les taux d'anticorps ne sont pas significativement inférieurs aux taux obtenus avec un lot ayant donné des résultats satisfaisants à l'essai décrit sous Activité.



3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Administré à des animaux exempts d'anticorps dirigés contre les herpèsvirus équins 1 ou 4, ou contre une fraction de ces virus, le vaccin stimule la formation d'anticorps spécifiques du ou des types viraux contenus dans le produit. La méthode utilisée doit permettre de différencier les anticorps dirigés contre les herpèsvirus 1 ou 4 des équidés.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062).*

3-3. **Innocuité**. Utilisez au moins 2 chevaux qui n'ont pas été vaccinés contre les herpèsvirus 1 et 4 des équidés. Administrez à chaque cheval par une voie recommandée une double dose de vaccin puis une dose de vaccin après 2 semaines. Observez les chevaux au moins une fois par jour pendant 10 jours à compter de la dernière administration.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des chevaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Virus vivant résiduel**. Effectuez une recherche de virus vivant résiduel par inoculation d'au moins 25 doses de vaccin à des cultures cellulaires sensibles aux herpèsvirus 1 et 4 des équidés. Effectuez un passage après 5-7 jours et maintenez les cultures pendant 14 jours. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté. Si le vaccin contient un adjuvant, séparez cet adjuvant de la phase liquide par une méthode n'induisant ni inactivation du virus ni aucune autre forme d'interférence dans la détection du virus vivant, ou effectuez un essai d'inactivation sur le mélange d'antigènes en vrac avant l'addition de l'adjuvant.

3-5. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai du pouvoir immunogène (section 2-3-2) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:1942**

# VACCIN INACTIVÉ DE MYCOPLASMA GALLISEPTICUM

## Vaccinum Mycoplasmatis galliseptici inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé de Mycoplasma gallisepticum est une préparation d'une ou de plusieurs souches appropriées de *Mycoplasma gallisepticum*, inactivées de façon à maintenir des propriétés immunogènes suffisantes. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des poulets et/ou des dindes.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le vaccin est préparé selon un système de lot de semence. La semence est cultivée dans un milieu solide et/ou liquide approprié pour garantir une croissance optimale dans les conditions d'incubation choisies, chaque souche faisant l'objet d'une culture séparée dont l'identité est vérifiée par une méthode appropriée. Des paramètres tels que le taux de croissance sont contrôlés en cours de production par des méthodes appropriées ; les valeurs mesurées se situent dans les limites établies pour le vaccin considéré. La pureté et l'identité des récoltes sont vérifiées par des méthodes appropriées. Après culture, les suspensions de mycoplasmes sont récoltées séparément et inactivées par une méthode appropriée. Les suspensions de mycoplasmes peuvent faire l'objet d'un traitement visant à fractionner les mycoplasmes, et les fractions peuvent être purifiées et concentrées. Le vaccin peut contenir un adjuvant.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant en ce qui concerne son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) chez les animaux cibles. L'essai du pouvoir immunogène (section 2-2-1) décrit ci-après peut être effectué lors de la démonstration de l'efficacité. Si les indications du vaccin comprennent la protection contre la chute des performances de ponte ou la protection contre la sinusite infectieuse chez les dindes, des essais appropriés du pouvoir immunogène supplémentaires sont nécessaires.

2-2-1. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies d'administration recommandées pour la vaccination et pour chacune des espèces aviaires auxquelles le vaccin est destiné. Utilisez pour chaque essai au minimum 40 oiseaux ayant au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Dans le cas des poulets, utilisez des poulets provenant d'un élevage exempt de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*) ; dans le cas des dindes, utilisez des oiseaux n'ayant pas été vaccinés et exempts d'anticorps dirigés contre *M. gallisepticum*. Pour chaque essai, administrez à au moins 20 oiseaux une quantité de vaccin ne dépassant pas une dose unique. Si une revaccination est recommandée, renouvelez cette opération après l'intervalle recommandé. Gardez au moins 20 oiseaux comme témoins. Soumettez chaque oiseau des 2 groupes à une épreuve virulente pas plus de 28 jours après la dernière administration par une voie appropriée d'une quantité suffisante de *M. gallisepticum* (souche R) virulent. Placez les oiseaux en observation et examinez-les au moins 1 fois par jour pendant 14 jours après l'épreuve. L'évaluation est effectuée 14 jours après l'épreuve lorsque les oiseaux sont euthanasiés. Notez les morts et le nombre d'oiseaux survivants

qui présentent des signes cliniques anormaux (par exemple, détresse respiratoire, écoulement nasal) et notez les lésions des sacs aériens. L'essai n'est pas valable si :

– au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, moins de 70 pour cent des oiseaux témoins meurent ou présentent des lésions ou des signes cliniques de la maladie ;

– et/ou pendant la période entre la vaccination et l'épreuve, plus de 10 pour cent des oiseaux du groupe témoin ou du groupe vacciné présentent des signes cliniques jugés anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin.

Les sacs aériens thoraciques et abdominaux sont évalués individuellement de chaque côté de l'animal. La grille de notation ci-après peut-être utilisée. Le vaccin satisfait à l'essai si la note des oiseaux vaccinés est inférieure de façon significative à celle des témoins et si la réduction n'est pas inférieure à 30 pour cent.

0 pas de lésion des sacs aériens

1 sur une zone limitée de 1 ou 2 sacs aériens : opacité et léger épaississement de la membrane du sac aérien ou mouchetures d'un exsudat jaunâtre

2 sur 1 sac aérien ou des portions de 2 sacs aériens : exsudat grisâtre ou jaune, parfois spumeux, et épaississement de la membrane du sac aérien

3 sur 3 sacs aériens : exsudat important et net épaississement de la plupart des sacs aériens

4 aérosacculite sévère avec exsudat considérable et épaississement de la plupart des sacs aériens.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Essai d'activité à effectuer sur chaque lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'activité (section 3-5) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Si l'essai n'est pas effectué sur un lot, une méthode alternative validée est utilisée, avec des critères d'acceptation fixés par rapport à un lot de vaccin ayant donné des résultats satisfaisants dans l'essai d'activité (section 3-5). L'essai suivant peut être utilisé.

Utilisez au moins 15 poulets, âgés de 3-4 semaines, provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) ou au moins 15 dindes, âgées de 3-4 semaines, exemptes d'anticorps dirigés contre *M. gallisepticum* et qui n'ont jamais été vaccinées contre *M. gallisepticum*, provenant d'élevages sains. Prélevez des échantillons de sérum sur chaque oiseau vacciné et chaque oiseau témoin juste avant la vaccination et contrôlez l'absence d'anticorps dirigés contre *M. gallisepticum*. Administrez à au moins 10 oiseaux une dose de vaccin par une voie recommandée. Gardez au moins 5 oiseaux comme témoins. Prélevez des échantillons de sérum 5 semaines après la vaccination sur chacun des oiseaux vaccinés et témoins. Mesurez les titres en anticorps sériques dirigés contre *M. gallisepticum* en utilisant une méthode appropriée. Calculez les titres moyens pour le groupe des oiseaux vaccinés. L'essai n'est pas valable si des anticorps dirigés spécifiquement contre *M. gallisepticum* sont trouvés dans un ou plusieurs des sérums provenant des oiseaux témoins 5 semaines après l'administration du vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si les titres moyens en anticorps du groupe des oiseaux vaccinés sont supérieurs ou égaux aux titres obtenus avec un lot ayant donné des résultats satisfaisants dans l'essai d'activité (section 3-5).

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le vaccin stimule la production d'anticorps dirigés contre la (les) souche(s) de *M. gallisepticum* lorsqu'il est injecté à des poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) ou à des dindes provenant d'élevages sains.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062).*

3-3. **Mycoplasmes résiduels vivants**. Le vaccin satisfait à un essai validé pour la recherche de *M. gallisepticum* résiduel vivant, effectué par une méthode de culture (voir par exemple *2.6.7*, en utilisant des milieux qui se sont révélés appropriés pour *M. gallisepticum*).

3-4. **Innocuité**. Utilisez au minimum 10 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) ou, si le vaccin est destiné exclusivement aux dindes, utilisez au moins 10 dindes, de l'âge minimal recommandé pour la vaccination, provenant d'un élevage non vacciné et n'ayant pas d'anticorps dirigés contre *M. gallisepticum*. Administrez à chaque oiseau, par une voie recommandée, une double dose de vaccin. Placez les oiseaux en observation et examinez-les au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. Le vaccin satisfait à l'essai si tous les oiseaux demeurent en bonne santé et s'il ne se produit aucune réaction locale ou générale anormale.

3-5. **Activité**. Le vaccin satisfait à l'essai du pouvoir immunogène (section 2-2-1).

**01/2008:1953**

# VACCIN INACTIVÉ DES DIARRHÉES À CORONAVIRUS DES VEAUX

## Vaccinum inactivatum diarrhoeae vituli coronaviro illatae

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé des diarrhées à coronavirus des veaux est une préparation d'une ou de plusieurs souches appropriées de coronavirus bovin, inactivées en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des vaches pour la protection passive de leur progéniture contre les diarrhées à coronavirus bovin dans les premières semaines de la vie.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Chaque virus vaccinal est multiplié séparément en cultures cellulaires. Après culture, les suspensions virales de chaque virus vaccinal sont récoltées séparément et inactivées par une méthode qui évite de détruire le pouvoir immunogène. Les suspensions virales peuvent être purifiées et concentrées. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des vaches gestantes auxquelles il est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1.) et Pouvoir immunogène (section 2-3-2.) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination, en utilisant dans chaque cas des vaches n'ayant pas été vaccinées contre le coronavirus bovin. Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin.

Pour chaque essai, utilisez au minimum 10 vaches au stade de gestation recommandé ou à plusieurs stades selon le schéma recommandé. Administrez à chaque vache une double dose de vaccin, puis une dose après l'intervalle recommandé. Après chaque injection, relevez la température corporelle de chaque vache le jour de la vaccination ainsi que les 4 jours suivants. Observez les vaches au moins une fois par jour jusqu'à la mise bas.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucune des vaches ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-3-2. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées. Le vaccin administré à chaque vache a une activité minimale.

Utilisez au moins 15 vaches gestantes de préférence exemptes d'anticorps dirigés contre le coronavirus bovin. A défaut, utilisez des vaches qui : n'ont pas été vaccinées contre le coronavirus bovin ; proviennent d'un élevage où il n'y a pas d'historique d'infection récente par le coronavirus bovin et ont un taux faible d'anticorps dirigés contre le coronavirus bovin, les taux étant comparables pour toutes les vaches. Administrez le vaccin à au moins 10 vaches gestantes selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 5 autres comme témoins. A partir de la mise bas, prélevez le colostrum puis le lait de chaque vache et conservez-le dans des conditions appropriées. Le pouvoir protecteur de chaque colostrum est éprouvé individuellement sur des veaux obtenus de vaches saines, si nécessaire par césarienne, et maintenus dans des conditions ne les exposant pas à une contamination par le coronavirus bovin. Administrez du colostrum puis du lait à chaque veau toutes les 6 h ou selon le schéma recommandé. 5-7 jours après la naissance, soumettez tous les veaux à une épreuve virulente en leur administrant *per os* une quantité suffisante d'une forme virulente du coronavirus bovin. Observez les veaux au moins une fois par jour pendant 7 jours. Notez l'incidence et la sévérité de la diarrhée ainsi que la durée et la quantité d'excrétion virale.

Le vaccin satisfait à l'essai s'il y a une réduction significative de la diarrhée et de l'excrétion virale chez les veaux qui ont reçu le colostrum puis le lait provenant de vaches vaccinées, comparé à ceux qui ont reçu du colostrum puis du lait provenant de vaches témoins.

2-4. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-4-1. **Virus vivant résiduel**. La recherche de virus vivant résiduel est effectuée en faisant 2 passages sur le même type de cellules que celui utilisé pour la production du vaccin ou sur d'autres cellules dont la sensibilité aura été démontrée égale ou supérieure. La quantité de récolte virale inactivée utilisée dans cet essai correspond à au moins 10 doses de vaccin. La récolte virale inactivée satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté.

2-4-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-6.) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Pour que l'essai soit valable, il peut être nécessaire d'utiliser plusieurs groupes dont chacun reçoit une dose différente. Pour chaque dose, effectuez l'essai comme suit. Utilisez au minimum 7 animaux d'une espèce appropriée, exempts d'anticorps spécifiques dirigés contre le coronavirus bovin. Administrez le vaccin à au moins 5 animaux en réalisant 1 seule injection d'une dose appropriée et gardez-en au minimum 2 autres comme témoins. Si le schéma recommandé comporte une injection de rappel, un rappel de vaccination peut également être fait lors de cet essai s'il a été démontré que cela constitue un système d'essai de sensibilité appropriée. A un temps donné, au moins 14 jours après la dernière injection, prélevez du sang de chaque animal et préparez des échantillons de sérum. Utilisez un essai validé approprié pour mesurer le titre en anticorps. Le vaccin satisfait à l'essai si le taux d'anticorps obtenu chez les animaux vaccinés n'est pas significativement inférieur à celui obtenu avec un lot ayant donné des résultats satisfaisants dans l'épreuve décrite sous Activité et il n'y a aucune augmentation significative du titre des anticorps chez les témoins.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Injecté à des animaux exempts d'anticorps spécifiques dirigés contre le coronavirus bovin, le vaccin stimule la production de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 bovins âgés d'au moins 6 mois et de préférence exempts d'anticorps dirigés contre le coronavirus bovin ou dans des cas justifiés, utilisez des bovins présentant un faible taux de ces anticorps, n'ayant pas été vaccinés contre le coronavirus bovin et pour lesquels l'administration du vaccin n'entraîne pas de réponse anamnestique. Administrez à chaque bovin par une voie recommandée une double dose de vaccin puis une dose après 14 jours. Observez les bovins au moins une fois par jour pendant 14 jours après la dernière administration.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des bovins ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Virus vivant résiduel**. Effectuez une recherche de virus vivant résiduel en utilisant 10 doses de vaccin et en faisant 2 passages sur des cultures cellulaires du même type que celles qui ont été utilisées dans la préparation du vaccin ou sur d'autres cultures cellulaires de sensibilité appropriée. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté. Si le vaccin contient un adjuvant qui interfère avec la réalisation de l'essai, séparez si possible l'adjuvant de la phase liquide par une méthode qui n'inactive pas les virus et qui n'empêche pas autrement la détection de virus vivants.

3-5. **Agents étrangers**. Effectuez une recherche d'anticorps sur les bovins ayant servi à l'essai d'innocuité. Prélevez un échantillon de sang à la fin de la seconde période d'observation. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne provoque pas l'apparition d'anticorps contre l'herpèsvirus bovin 1 (BHV1), le virus de la leucose bovine (BLV) et le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV).

3-6. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-2.) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

4. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique le schéma d'administration recommandé du colostrum et du lait, *post-partum*.

**01/2008:1954**

# VACCIN INACTIVÉ DES DIARRHÉES À ROTAVIRUS DES VEAUX

## Vaccinum inactivatum diarrhoeae vituli rotaviro illatae

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé des diarrhées à rotavirus des veaux est une préparation d'une ou de plusieurs souches appropriées de rotavirus bovin, inactivées en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des vaches pour la protection passive de leur progéniture contre les diarrhées à rotavirus bovin dans les premières semaines de la vie.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Chaque virus vaccinal est multiplié séparément en cultures cellulaires. Après culture, les suspensions virales de chaque virus vaccinal sont récoltées séparément et inactivées par une

méthode qui évite de détruire le pouvoir immunogène. Les suspensions virales peuvent être purifiées et concentrées. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des vaches gestantes auxquelles il est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1.) et Pouvoir immunogène (section 2-3-2.) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination, en utilisant dans chaque cas des vaches n'ayant pas été vaccinées contre le rotavirus bovin. Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin.

Pour chaque essai, utilisez au minimum 10 vaches au stade de gestation recommandé ou à plusieurs stades selon le schéma recommandé. Administrez à chaque vache une double dose de vaccin, puis une dose après l'intervalle recommandé. Après chaque injection, relevez la température corporelle de chaque vache le jour de la vaccination ainsi que les 4 jours suivants. Observez les vaches au moins une fois par jour jusqu'à la mise bas.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucune des vaches ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-3-2. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées. Le vaccin administré à chaque vache a une activité minimale.

Utilisez au moins 15 vaches gestantes de préférence exemptes d'anticorps dirigés contre le rotavirus bovin. A défaut, utilisez des vaches qui : n'ont pas été vaccinées contre le rotavirus bovin ; proviennent d'un élevage où il n'y a pas d'historique d'infection récente par le rotavirus bovin et ont un taux faible d'anticorps dirigés contre le rotavirus bovin, les taux étant comparables pour toutes les vaches. Administrez le vaccin à au moins 10 vaches gestantes selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 5 autres comme témoins. A partir de la mise bas, prélevez le colostrum puis le lait de chaque vache et conservez-le dans des conditions appropriées. Le pouvoir protecteur de chaque colostrum est éprouvé individuellement sur des veaux obtenus de vaches saines et qui peuvent être nés par césarienne, et qui sont maintenus dans des conditions ne les exposant pas à une contamination par le rotavirus bovin. Administrez du colostrum puis du lait à chaque veau toutes les 6 h ou selon le schéma recommandé. 5-7 jours après la naissance, soumettez tous les veaux à une épreuve virulente en leur administrant *per os* une quantité appropriée d'une forme virulente du rotavirus bovin. Observez les veaux au moins une fois par jour pendant 7 jours. Notez l'incidence et la sévérité de la diarrhée ainsi que la durée et la quantité d'excrétion virale.

Le vaccin satisfait à l'essai s'il y a une réduction significative de la diarrhée et de l'excrétion virale chez les veaux qui ont reçu le colostrum puis le lait provenant de vaches vaccinées, comparé à ceux qui ont reçu du colostrum puis du lait provenant de vaches témoins.

2-4. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-4-1. **Virus vivant résiduel**. La recherche de virus vivant résiduel est effectuée en faisant 2 passages sur le même type de cellules que celui utilisé pour la production du vaccin ou sur d'autres cellules dont la sensibilité aura été démontrée égale ou supérieure. La quantité de récolte virale inactivée utilisée dans cet essai correspond à au moins 100 doses de vaccin. La récolte virale inactivée satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté.

2-4-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-6.) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Pour que l'essai soit valable, il peut être nécessaire d'utiliser plusieurs groupes dont chacun reçoit une dose différente. Pour chaque dose, effectuez l'essai comme suit. Utilisez au minimum 7 animaux d'une espèce appropriée, exempts d'anticorps dirigés contre le rotavirus bovin. Administrez le vaccin à au moins 5 animaux en réalisant 1 seule injection d'une dose appropriée et gardez-en 2 autres comme témoins. Si le schéma recommandé comporte une injection de rappel, un rappel de vaccination peut également être fait lors de cet essai s'il a été démontré que cela constitue un système d'essai de sensibilité appropriée. A un temps donné, au moins 14 jours après la dernière injection, prélevez du sang de chaque animal et préparez des échantillons de sérum. Utilisez un essai validé approprié pour mesurer le titre en anticorps. Le vaccin satisfait à l'essai si le taux d'anticorps obtenu chez les animaux vaccinés n'est pas significativement inférieur à celui obtenu avec un lot ayant donné des résultats satisfaisants dans l'épreuve décrite sous Activité et il n'y a aucune augmentation significative du titre des anticorps chez les témoins.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Injecté à des animaux exempts d'anticorps spécifiques dirigés contre le rotavirus bovin, le vaccin stimule la production de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 bovins âgés d'au moins 6 mois et de préférence exempts d'anticorps dirigés contre le rotavirus bovin ou dans des cas justifiés, utilisez des bovins présentant un faible taux de ces anticorps, n'ayant pas été vaccinés contre le rotavirus bovin et pour lesquels l'administration du vaccin n'entraîne pas de réponse anamnestique. Administrez à chaque bovin par une voie recommandée une double dose de vaccin puis une dose après 14 jours. Observez les bovins au moins une fois par jour pendant 14 jours après la dernière administration.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des bovins ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Virus vivant résiduel**. Effectuez une recherche de virus vivant résiduel en utilisant 10 doses de vaccin et en faisant 2 passages sur des cultures cellulaires du même type que celles qui ont été utilisées dans la préparation du vaccin ou sur d'autres cultures cellulaires de sensibilité appropriée. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté. Si le vaccin contient un adjuvant qui interfère avec la réalisation de l'essai, séparez si possible l'adjuvant de la phase liquide par une méthode qui n'inactive pas les virus et qui n'empêche pas autrement la détection de virus vivants.

3-5. **Agents étrangers**. Effectuez des recherches d'anticorps sur les bovins ayant servi à l'essai d'innocuité. Prélevez un échantillon de sang à la fin de la seconde période d'observation. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne provoque pas l'apparition d'anticorps contre l'herpèsvirus bovin 1 (BHV1), le virus de la leucose bovine (BLV) et le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV).

3-6. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-2.) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

4. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique le schéma d'administration recommandée du colostrum et du lait, *post-partum*.

**01/2008:1945**

# VACCIN INACTIVÉ DU CHOLÉRA AVIAIRE

## Vaccinum cholerae aviariae inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé du choléra aviaire est une préparation d'une ou plusieurs souches appropriées d'un ou plusieurs sérovars de *Pasteurella multocida*, inactivé en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. La présente monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des poulets, des dindons, des canards et des oies contre le choléra aviaire aigu.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

La semence est cultivée dans un milieu approprié. Si le vaccin contient plusieurs souches de cette bactérie, elles sont cultivées et récoltées séparément. Les récoltes bactériennes sont inactivées. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2.*CHOIX DE LA COMPOSITION VACCINALE*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des espèces auxquelles il est destiné. Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-2-1) et Pouvoir immunogène (section 2-2-2) peuvent être utilisés pour démontrer l'innocuité et l'efficacité.

2-2-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies d'administration recommandées pour la vaccination et sur chacune des espèces aviaires auxquelles le vaccin est destiné.

Pour chaque essai, utilisez au minimum 20 oiseaux de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. S'il s'agit de poulets, ils proviennent d'un élevage exempt de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*). S'il s'agit de dindons, de canards ou d'oies, ils n'ont pas été vaccinés et sont exempts d'anticorps dirigés contre *P. multocida*. Administrez à chaque oiseau, par une voie et une méthode recommandées, une double dose de vaccin. Si le schéma de vaccination recommandé comprend l'administration d'une seconde dose, administrez 1 dose supplémentaire à chaque oiseau, après le délai indiqué. Observez les oiseaux au moins une fois par jour jusqu'à 21 jours à compter de la dernière administration du vaccin. L'essai n'est pas valable si plus de 10 pour cent des oiseaux présentent des signes anormaux ou meurent de causes non imputables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des oiseaux ne présente de signes notables du choléra aviaire ni ne meurt de causes imputables au vaccin.

2-2-2. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies d'administration et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination, sur chacune des espèces aviaires auxquelles le vaccin est destiné et pour chaque sérovar de *P. multocida* contre lequel une protection est revendiquée. Pour chaque essai, utilisez au minimum 30 oiseaux de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Utilisez des oiseaux n'ayant pas été vaccinés et exempts d'anticorps dirigés contre *P. multocida*. Pour chaque essai, administrez à au moins 20 oiseaux une quantité de vaccin inférieure ou égale à 1 dose. Si une revaccination est recommandée, répétez cette opération après le délai conseillé. Gardez au minimum 10 oiseaux comme témoins. 21 jours après la dernière administration, soumettez chaque oiseau des 2 groupes à une épreuve virulente en lui injectant par voie intramusculaire une quantité suffisante d'une forme virulente de *P. multocida*. Observez les oiseaux pendant 14 jours à compter de l'épreuve. L'essai n'est pas valable si moins de 70 pour cent des témoins meurent ou présentent des signes d'infection (tels que des signes cliniques ou un réisolement bactérien dans les organes) au cours de la période d'observation suivant l'épreuve ou si, avant l'épreuve, plus de 10 pour cent des oiseaux témoins ou vaccinés présentent des signes anormaux ou meurent de causes non imputables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si, à la fin de la période d'observation suivant l'épreuve, au moins 70 pour cent des oiseaux vaccinés survivent sans présenter de signes du choléra aviaire. Des signes bénins et ne persistant pas au-delà de la période d'observation peuvent être tolérés.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-4) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères d'acceptation étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Utilisez au minimum 15 poulets EOPS (*5.2.2*), âgés de 3-4 semaines. Juste avant la vaccination, effectuez un prélèvement de sérum sur tous les poulets (témoins et à vacciner) et vérifiez l'absence d'anticorps dirigés contre chacun des sérovars de *P. multocida* du vaccin. Administrez 1 dose du vaccin à 10 poulets, par voie sous-cutanée. Gardez 5 poulets comme témoins. Après 5 semaines à compter de la vaccination, effectuez un prélèvement de sérum sur tous les poulets (témoins et vaccinés). Mesurez le titre en anticorps sériques dirigés contre chacun des sérovars de *P. multocida* indiqués sur l'étiquette, par une méthode sérologique appropriée et validée. Calculez le titre moyen du groupe des vaccinés. L'essai n'est pas valable si des anticorps spécifiquement dirigés contre *P. multocida* du vaccin sont détectés : à partir d'un ou plusieurs sérums des poulets témoins ou à vacciner avant la vaccination ; à partir d'un ou plusieurs sérums des poulets témoins 5 semaines après l'administration du vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en anticorps moyen du groupe des vaccinés est égal ou supérieur aux titres obtenus avec un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité.

2-3-2. **Endotoxines bactériennes**. Un essai d'endotoxines bactériennes (*2.6.14*) est effectué sur chaque lot final ou, si la nature de l'adjuvant le rend impossible, sur l'antigène en vrac ou le mélange d'antigènes en vrac immédiatement avant l'addition de l'adjuvant. La teneur maximale acceptable en endotoxines bactériennes est celle trouvée pour un lot de vaccin qui a satisfait à l'essai d'innocuité (section 2-2-1). La méthode choisie pour déterminer la teneur maximale acceptable en endotoxines bactériennes est utilisée par la suite pour le contrôle des lots.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le vaccin stimule la production d'anticorps dirigés contre chacun des sérovars de *P. multocida* qu'il contient lorsqu'il est injecté à des poulets EOPS (*5.2.2*).

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité spécifié dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Pour les vaccins destinés au poulet, utilisez au minimum 10 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) et de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Pour les vaccins destinés au dindon, canard ou oie, utilisez au minimum 10 oiseaux de l'espèce réputée la plus sensible au choléra aviaire, exempts d'anticorps dirigés contre *P. multocida* et de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Administrez à chaque oiseau, par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les animaux au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 20 pour cent des oiseaux présentent des signes anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des oiseaux ne présente de signes notables du choléra aviaire ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-2-2), lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le(s) sérovar(s) utilisé(s) pour la préparation du vaccin,
– le(s) sérovar(s) contre le(s)quel(s) la protection est revendiquée.

**01/2008:1392**

# VACCIN INACTIVÉ DU PARAMYXOVIRUS AVIAIRE 3

## Vaccinum paramyxoviris 3 aviarii inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé du paramyxovirus aviaire 3 est une préparation d'une souche appropriée de paramyxovirus aviaire 3, inactivé en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à la protection des dindes contre la chute de ponte et la diminution de la qualité des oeufs.

2. PRODUCTION

2-1. *PREPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est cultivé sur oeufs embryonnés ou sur des cultures cellulaires. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Oeufs embryonnés**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs embryonnés, ils proviennent d'un élevage sain.

2-2-2. **Cultures cellulaires**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des cultures cellulaires, elles satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *LOTS DE SEMENCE*

2-3-1. **Agents étrangers**. Le lot de semence primaire satisfait à l'essai des agents étrangers dans les lots de semence (*2.6.24*). Lors de ces essais sur le lot de semence primaire, utilisez des organismes n'ayant pas subi, en début d'essai, plus de 5 passages depuis le lot de semence primaire.

2-4. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis de chacune des catégories de dindes auxquelles il est destiné.
L'essai décrit ci-après sous Pouvoir immunogène (section 2-4-1) peut être utilisé pour établir l'efficacité.

2-4-1. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des dindes de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Le vaccin administré à chaque dinde a une activité minimale.

Utilisez 2 groupes chacun d'au moins 20 dindes de même âge et de même origine et exempts d'anticorps dirigés contre le paramyxovirus aviaire 3. Vaccinez un des groupes selon les instructions indiquées sur l'étiquette et gardez l'autre groupe comme témoins non vaccinés.

L'essai n'est pas valable si le sérum des vaccinés ou des témoins prélevé au moment de la première vaccination présente des anticorps dirigés contre le paramyxovirus aviaire 3, ni si le sérum des témoins prélevé au moment de l'épreuve virulente présente ces anticorps.

Au moment du pic de ponte, éprouvez les 2 groupes par voie oculo-nasale avec une quantité suffisante d'une souche virulente de paramyxovirus avaire 3. Pendant les 6 semaines au minimum suivant l'épreuve virulente, notez le nombre d'oeufs pondus par semaine et par groupe, en distinguant entre oeufs normaux et anormaux. Le vaccin satisfait à l'essai si la quantité et la qualité des oeufs dans le groupe vacciné sont améliorés de manière significative par rapport aux témoins.

2-5. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-5-1. **Virus vivant résiduel**. La recherche de virus vivant résiduel est effectuée sur oeufs embryonnés ou sur cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*), en choisissant le système le plus sensible pour la souche de virus vaccinal. La quantité de récolte virale inactivée utilisée dans cet essai correspond à au moins 10 doses de vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté.

2-5-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-6) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité.

3. ESSAIS EFFECTUES SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le vaccin stimule la formation d'anticorps dirigés contre le paramyxovirus aviaire 3 lorsqu'il est injecté à des animaux dépourvus de ces anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 10 dindons âgés de 14 à 28 jours et exempts d'anticorps dirigés contre le paramyxovirus aviaire 3. Administrez à chaque dindon par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les oiseaux au moins une fois par jour pendant 21 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des oiseaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Virus vivant résiduel**. La recherche de virus vivant résiduel est effectuée pour confirmer l'inactivation du paramyxovirus aviaire 3.

Utilisez 10 oeufs de poules embryonnés, provenant d'un élevage exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*), âgés de 9 à 11 jours. Injectez les 2/5$^{ème}$ d'une dose de vaccin dans la cavité allantoïdienne de chaque oeuf et faite incuber. Observez les oeufs pendant 6 jours et recueillez séparément le liquide allantoïdien des oeufs contenant des embryons vivants et celui des oeufs contenant des embryons morts, à l'exclusion de ceux qui meurent dans les 24 h suivant l'injection. Effectuez sur les embryons qui meurent dans les 24 h une recherche du paramyxovirus aviaire 3 ; le vaccin ne satisfait pas à l'essai si la présence du paramyxovirus aviaire 3 est confirmée.

Dans la cavité allantoïdienne d'au moins 10 oeufs de poule provenant d'un élevage EOPS âgés de 9 à 11 jours, injectez 0,2 mL du liquide allantoïdien recueilli sur les embryons morts et placez-les en incubation pendant 5 à 6 jours. Effectuez une recherche d'hémagglutinines dans le liquide allantoïdien de chaque oeuf en utilisant des érythrocytes de poulet.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun signe d'activité hémagglutinante n'est observé et si moins de 20 pour cent des embryons meurent à l'une des étapes de l'essai, répétez cette étape ; le vaccin satisfait à l'essai si aucun signe d'activité hémagglutinante n'est alors observé et si moins de 20 pour cent des embryons meurent à cette étape.

Des antibiotiques peuvent être utilisés dans l'essai pour empêcher toute infection bactérienne.

3-5. **Agents étrangers**. Administrez à chaque poulet par une voie recommandée une double dose de vaccin. Utilisez au moins 10 poulets âgés de 14 à 28 jours, provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Après 3 semaines, administrez 1 dose de vaccin par la

Vaccins

même voie. 2 semaines plus tard, recueillez des échantillons de sérum sur chaque poulet et effectuez des essais d'anticorps dirigés contre les agents suivants par les méthodes prescrites dans le chapitre général *5.2.2. Elevages de poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiés pour la production et le contrôle de qualité des vaccins* : virus de l'encéphalomyélite aviaire, virus de la bronchite infectieuse aviaire, virus de la leucose aviaire, virus de la maladie des oeufs hardés, virus de la bursite infectieuse aviaire, virus de la laryngotrachéite infectieuse aviaire, virus de la grippe de type A, virus de la maladie de Marek. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne stimule pas la formation d'anticorps dirigés contre ces agents.

3-6. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-4-1) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**01/2008:0064**

# VACCIN INACTIVÉ DU ROUGET DU PORC

## Vaccinum erysipelatis suillae inactivatum

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé du rouget du porc est une préparation d'une ou de plusieurs souches appropriées d'*Erysipelothrix rhusiopathiae*, inactivées en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des porcs contre le rouget du porc.

2. PRODUCTION

Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-1. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des porcs auxquels il est destiné.

L'essai décrit ci-après sous Pouvoir immunogène (section 2-1-1.) peut être utilisé pour établir l'efficacité.

2-1-1. **Pouvoir immunogène**. L'essai décrit ci-après convient à la mise en évidence du pouvoir immunogène du vaccin vis-à-vis des sérotypes 1 et 2 d'*E. rhusiopathiae*. Si le vaccin est indiqué pour un autre sérotype, une démonstration supplémentaire du pouvoir immunogène vis-à-vis de ce sérotype est nécessaire.

Si le vaccin contient plus de 1 sérotype, un essai pour 2 sérotypes peut être effectué sur un seul groupe en injectant aux porcs chaque sérotype d'épreuve sur un flanc différent. Les critères de validation et d'acceptabilité sont appliqués de façon séparée aux sites d'injection respectifs. Si le vaccin contient plus de 1 sérotype, l'essai du pouvoir immunogène peut également être effectué en utilisant des groupes de porcs distincts.

Effectuez l'essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des porcs âgés d'au moins 12 semaines et pesant au moins 20 kg. Le vaccin administré à chaque porc a une activité minimale.

Pour chaque essai, utilisez au moins 15 porcs exempts d'anticorps dirigés contre le rouget du porc. Répartissez les porcs en 2 groupes. Vaccinez un groupe d'au moins 10 porcs selon le schéma recommandé et gardez un groupe d'au moins 5 autres comme témoins. 3 semaines après la vaccination, soumettez tous les porcs à une épreuve virulente en leur administrant par voie intradermique des injections séparées de 0,1 mL de souches virulentes de *E. rhusiopathiae* de chacun des sérotypes 1 et 2. Observez les porcs au moins une fois par jour pendant 7 jours.

L'essai n'est pas valable si moins de 80 pour cent des porcs témoins présentent des signes typiques de la maladie, c'est-à-dire des lésions de la peau en losange aux sites d'injection. Le vaccin satisfait à l'essai si au moins 90 pour cent des porcs vaccinés ne présentent pas de lésions de la peau en losange aux sites d'injection.

L'*Erysipelothrix rhusiopathiae sérotype 1 PBR* et l'*Erysipelothrix rhusiopathiae sérotype 2 PBR* conviennent comme souches d'épreuve.

2-2. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-2-1. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-4.) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Utilisez 10 souris d'une souche appropriée (par exemple NMRI), pesant 17-20 g, d'un élevage homogène, et exemptes d'anticorps dirigés contre le rouget du porc. Administrez à chaque souris une dose appropriée du vaccin à examiner (en général 1/10 de la dose pour le porc) par voie sous-cutanée. A un intervalle déterminé en fonction du vaccin à examiner (par exemple entre 21 et 28 jours), saignez les souris sous anesthésie. Mélangez les sérums en prenant un volume égal de chaque souris. Déterminez le taux d'anticorps à l'aide d'une méthode immunochimique (*2.7.1*) appropriée, par exemple un immunodosage à enzyme conjuguée avec l'*antigène de capture rouget de porc (pour ELISA) PBR*. Le vaccin satisfait à l'essai si le taux d'anticorps obtenu n'est pas significativement inférieur à celui obtenu avec un lot ayant donné des résultats satisfaisants dans l'épreuve décrite sous Activité.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Injecté à des animaux exempts d'anticorps dirigés contre *E. rhusiopathiae*, le vaccin stimule la formation de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 2 porcs de l'âge minimal recommandé pour la vaccination et exempts d'anticorps dirigés contre le rouget du porc ou, dans des cas justifiés, utilisez des porcs présentant un faible taux de ces anticorps, qui n'ont pas été vaccinés contre le rouget du porc et pour qui l'administration du vaccin n'entraîne pas de réponse anamnestique. Administrez à chaque porc par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les porcs au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des porcs ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences des essais du pouvoir immunogène (section 2-1-1.) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

**07/2008:1521**

# VACCIN INACTIVÉ, INJECTABLE, À ADJUVANT HUILEUX, DE LA FURONCULOSE POUR SALMONIDÉS

## Vaccinum furunculosidis inactivatum ad salmonidas cum adiuvatione oleosa ad iniectionem

1. DÉFINITION

Le vaccin inactivé, injectable, à adjuvant huileux, de la furonculose pour salmonidés est préparé à partir de cultures d'une ou de plusieurs souches appropriées d'*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, inactivées en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des salmonidés contre la furonculose.

## 2. PRODUCTION

### 2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Les souches d'*A. salmonicida* subsp. *salmonicida* sont cultivées et récoltées séparément. Les récoltes sont ensuite inactivées par une méthode appropriée. Elles peuvent être purifiées et concentrées. Il est possible d'utiliser des cellules entières inactivées ou des cellules fragmentées ; le vaccin peut contenir des produits extracellulaires sécrétés par la bactérie dans le milieu de croissance. Le vaccin contient un adjuvant huileux.

### 2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Le vaccin est produit à partir de souches qui sont satisfaisantes quant à la production des antigènes considérés comme importants du point de vue immunologique. Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) pour les espèces ichtyennes auxquelles il est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (2-2-1) et Pouvoir immunogène (section 2-2-2) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-2-1. **Innocuité**

2-2-1-1. *Essai de laboratoire*. Effectuez l'essai pour chacune des espèces auxquelles le vaccin est destiné, en utilisant des poissons de la masse corporelle minimale recommandée pour la vaccination. Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin.

Utilisez au minimum 50 poissons provenant d'une population exempte d'anticorps spécifiques dirigés contre *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* et qui n'a pas été vaccinée contre, ni exposée à la furonculose. Effectuez l'essai dans les conditions recommandées pour l'emploi du vaccin, la température n'étant pas inférieure à 10 °C. Administrez à chaque poisson par voie intrapéritonéale une double dose de vaccin par unité de masse corporelle. Observez les poissons au moins une fois par jour pendant 21 jours.

L'essai n'est pas valable si plus de 6 pour cent des poissons meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des poissons ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

2-2-1-2. *Essais sur le terrain*. L'innocuité est également démontrée au moyen d'essais sur le terrain, par administration de la dose prévue à un nombre suffisant de poissons, répartis dans au moins 2 sites d'élevage différents. Des échantillons de 30 poissons sont prélevés après la vaccination, au milieu de la période d'élevage et à l'abattage ; ces poissons sont examinés pour déceler les réactions locales de la cavité abdominale. Des lésions modérées sous la forme d'adhésions localisées entre les viscères ou entre les viscères et la paroi abdominale et une opacité légère ou une pigmentation éparse du péritoine sont acceptables. Des lésions étendues sous la forme d'adhésions entre des parties plus importantes des organes abdominaux, une pigmentation importante ou un épaississement évident ou une opacification de parties plus étendues du péritoine sont inacceptables si elles se produisent dans plus de 10 pour cent des poissons d'un échantillonnage donné. Les lésions sous forme d'adhésions qui donnent aux viscères l'aspect d'être une seule entité ou qui donnent lieu à des lacérations prononcées du péritoine lors de l'éviscération sont également inacceptables.

2-2-2. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai selon un protocole qui définit les limites de masse corporelle des poissons, la source d'eau, le débit de l'eau, les limites de température et la préparation d'une épreuve virulente normalisée, pour la voie et la méthode d'administration recommandées. Le vaccin administré à chaque poisson a une activité minimale.

Utilisez au moins 200 poissons. Vaccinez au moins 100 poissons selon le mode d'emploi. Effectuez une vaccination à blanc d'un groupe d'au moins 100 poissons témoins ; marquez les poissons vaccinés et les poissons témoins afin de pouvoir les identifier. Les poissons vaccinés et les poissons témoins sont soit maintenus dans la même cuve, soit répartis en nombre égal dans chaque cuve si plus d'une cuve est utilisée. Après un intervalle défini suivant la vaccination, soumettez tous les poissons à une épreuve virulente en leur administrant par injection une quantité suffisante d'une culture d'une souche de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* dont la virulence a été vérifiée. L'intervalle est défini en fonction des indications sur le temps nécessaire pour le développement de l'immunité. Observez les poissons au moins une fois par jour jusqu'au moment où le taux de mortalité spécifique chez les poissons témoins atteint au moins 60 pour cent. Portez sur un graphique le taux de mortalité spécifique par rapport au temps pour les 2 groupes et déterminez par interpolation le temps qui correspond à un taux de mortalité spécifique de 60 pour cent chez les poissons témoins.

L'essai n'est pas valable si, 21 jours après la mort du premier poisson, le taux de mortalité spécifique des poissons témoins est inférieur à 60 pour cent. Notez la mortalité (*M*) chez les poissons vaccinés au temps qui correspond à 60 pour cent de mortalité chez les poissons témoins. Calculez le pourcentage de survie relatif à l'aide de l'expression suivante :

$$\left(1 - \frac{M}{60}\right) \times 100$$

Le vaccin satisfait à l'essai si le pourcentage de survie relatif n'est pas inférieur à 80 pour cent.

### 2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Activité du lot**. L'essai d'activité (section 3-4) peut être effectué sur chaque lot de vaccin avec des groupes d'au moins 30 poissons d'une des espèces auxquelles le vaccin est destiné. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié fondé sur la réponse en anticorps peut être effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

Utilisez au moins 35 poissons qui proviennent d'une population exempte d'anticorps spécifiques dirigés contre *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* et ayant une masse corporelle située dans des limites définies. Effectuez l'essai à une température définie. Vaccinez au moins 25 poissons par injection intrapéritonéale d'une dose de vaccin selon le mode d'emploi. Effectuez une vaccination à blanc d'un groupe d'au moins 10 poissons témoins. Prélevez des échantillons de sang après un délai défini. Déterminez pour chaque échantillon le taux d'anticorps spécifiques dirigés contre *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* par une méthode immunochimique (*2.7.1*) appropriée. L'essai n'est pas valable si des anticorps contre *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* sont retrouvés parmi le groupe des poissons témoins. Le vaccin satisfait à l'essai si le taux moyen d'anticorps obtenu chez les poissons vaccinés n'est pas inférieur de façon significative à celui trouvé pour un lot qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité.

## 3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Administré à des poissons exempts d'anticorps spécifiques contre *A. salmonicida*, le vaccin stimule la production de ces anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez au moins 10 poissons d'une des espèces auxquelles le vaccin est destiné et ayant, si possible, la masse corporelle minimale recommandée pour la vaccination ; si des poissons ayant la masse minimale ne sont pas disponibles, utilisez des poissons ayant jusqu'à 2 fois cette masse. Utilisez des poissons qui proviennent d'une population de préférence exempte d'anticorps spécifiques dirigés contre *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ou, dans des cas justifiés, utilisez des poissons qui proviennent d'une population ayant un faible

Vaccins

taux de ces anticorps, qui n'a pas été vaccinée contre, ni exposée à la furonculose et pour qui l'administration du vaccin n'entraîne pas de réponse anamnestique. Effectuez l'essai dans les conditions recommandées pour l'emploi du vaccin, la température de l'eau n'étant pas inférieure à 10 °C. Administrez à chaque poisson par voie intrapéritonéale une double dose de vaccin par unité de masse corporelle. Observez les poissons au moins une fois par jour pendant 21 jours.

L'essai n'est pas valable si plus de 10 pour cent des poissons meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des poissons ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-4. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai du pouvoir immunogène (section 2-2-2) lorsqu'il est administré par la voie et la méthode recommandées.

4. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique les informations concernant le temps nécessaire pour le développement de l'immunité après vaccination dans les différentes conditions correspondant au mode d'emploi recommandé.

**07/2010:0451**

# VACCIN RABIQUE INACTIVÉ POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Vaccinum rabiei inactivatum ad usum veterinarium

1. DÉFINITION

Le vaccin rabique inactivé pour usage vétérinaire est une préparation d'une souche appropriée de virus fixe de la rage, inactivée en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des animaux contre la rage.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le vaccin est obtenu par culture du virus soit dans des lignées de cellules appropriées soit sur des cultures cellulaires primaires provenant d'animaux sains (*5.2.4*). La suspension virale est récoltée en une ou plusieurs fois dans les 28 jours qui suivent l'inoculation. Plusieurs récoltes obtenues à partir d'une même culture cellulaire de production peuvent être réunies et considérées comme une récolte unique.
La récolte de virus est inactivée. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis à vis des espèces auxquelles il est destiné.
L'essai décrit ci-après sous Pouvoir immunogène (section 2-3-1) peut être utilisé pour établir l'efficacité chez le chat et le chien.

Dans le cas des carnivores (chats et chiens), la démonstration du Pouvoir immunogène (section 2-3-1) se fait par une épreuve directe. Dans le cas d'autres espèces, si un essai comportant une épreuve virulente a été effectué chez le chat ou le chien, un essai indirect est effectué par détermination du taux d'anticorps après vaccination de 20 animaux au moins selon le schéma recommandé ; le vaccin est satisfaisant si, après la période indiquée comme étant la durée minimale de protection, le taux moyen d'anticorps contre le virus rabique n'est pas inférieur à 0,5 UI/mL et 10 pour cent des animaux au plus présentent un taux inférieur à 0,1 UI/mL.

2-3-1. **Pouvoir immunogène**. Effectuez chaque essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des animaux de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Le vaccin administré à chaque animal a une activité minimale.

Utilisez au moins 35 animaux. Procédez à un prélèvement sanguin sur chaque animal et effectuez sur chaque prélèvement un essai de détection des anticorps contre le virus rabique pour confirmer la réceptivité. Administrez le vaccin à au moins 25 animaux, selon le schéma recommandé, et gardez-en au minimum 10 autres comme témoins. Observez tous les animaux pendant une période égale à la durée d'immunité déclarée. Aucun animal ne présente de signes de la rage. Au dernier jour de la durée d'immunité déclarée ou plus tard, soumettez tous les animaux à une épreuve virulente en leur administrant par voie intramusculaire une quantité suffisante d'une souche virulente du virus rabique approuvée par l'Autorité compétente. Observez les animaux au moins une fois par jour pendant 90 jours à compter de l'épreuve. Les animaux qui meurent pour des raisons non imputables à la rage sont éliminés. L'essai n'est pas valable si le nombre de ces morts réduit à moins de 25 le nombre d'animaux vaccinés à prendre en compte et l'essai n'est valable que si, sur les 10 animaux témoins, 8 au moins (ou un nombre statistiquement équivalent si plus de 10 animaux témoins ont été soumis à l'épreuve virulente) présentent des signes de la rage et si la présence du virus rabique dans leur cerveau est démontrée par un essai d'immunofluorescence ou toute autre méthode appropriée. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, sur les 25 animaux vaccinés, 2 au plus (ou un nombre statistiquement équivalent si plus de 25 animaux vaccinés ont été soumis à l'épreuve virulente) présentent des signes de la rage.

2-4. ESSAIS DU FABRICANT

2-4-1. **Virus vivant résiduel**. La recherche de virus vivant résiduel est effectuée par inoculation de la suspension virale inactivée à des cultures cellulaires du même type que celui utilisé pour la production ou à des cultures démontrées au moins aussi sensibles. La quantité de récolte virale inactivée utilisée pour cet essai correspond à au moins 25 doses de vaccin. Après 4 jours d'incubation puis traitement des cellules à la trypsine, une subculture est effectuée. Après 4 autres jours d'incubation, une recherche de virus infectieux résiduel est effectuée sur les cultures par immunofluorescence. La récolte virale inactivée satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté.

2-4-2. **Teneur en antigène de la récolte**. La teneur en glycoprotéine du virus rabique est déterminée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*). La teneur se situe dans les limites approuvées pour le produit particulier.

2-4-3. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-5) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale. Lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité. L'essai suivant peut être effectué.

A 5 souris pesant chacune 18-20 g, injectez par voie sous-cutanée ou intramusculaire un volume de vaccin correspondant à 1/5 de la dose recommandée. Effectuez des prélèvements sanguins 14 jours après l'injection et procédez sur chaque sérum à une recherche d'anticorps de la rage par l'essai rapide d'inhibition des foyers de fluorescence décrit dans la monographie *Immunoglobuline humaine rabique (0723).*

Le vaccin satisfait à l'essai si le titre n'est pas inférieur à celui trouvé avec un lot de vaccin ayant donné des résultats satisfaisants à l'essai décrit sous Activité.

2-4-4. **Teneur en antigène du lot**. La teneur en glycoprotéine du virus de la rage par dose, déterminée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), n'est pas inférieure à la teneur trouvée pour un lot de vaccin ayant donné des résultats satisfaisants à l'essai décrit sous Activité.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Administré à des animaux sains exempts d'anticorps dirigés contre le virus rabique, le vaccin stimule la production de tels anticorps.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062).*

3-3. **Virus vivant résiduel**. Effectuez l'essai sur le mélange du contenu de 5 récipients.

Dans le cas d'un vaccin ne contenant pas d'adjuvant, effectuez un essai d'enrichissement en virus vivant résiduel sur le même type de culture cellulaire que celui qui a été utilisé dans la production du vaccin ou sur une culture cellulaire démontrée au moins aussi sensible. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun virus vivant n'est détecté.

Dans le cas d'un vaccin contenant un adjuvant, utilisez au moins 10 souris, pesant 11-15 g ; injectez par voie intracérébrale à chacune d'elles 0,03 mL d'une quantité de vaccin obtenue par le mélange d'au moins 5 fois la plus petite dose prescrite. Afin d'éviter une interférence due à la présence éventuelle d'un conservateur antimicrobien ou à l'adjuvant, le vaccin peut être dilué au maximum 10 fois avant l'injection. Dans ce cas ou lorsque la souche vaccinale n'est pathogène que pour les souriceaux, effectuez l'essai sur les souriceaux âgés de 1 à 4 jours. Observez les souris ou les souriceaux pendant 21 jours. Si plus de 2 souris ou souriceaux meurent pendant les premières 48 h, répétez l'essai. Le vaccin satisfait à l'essai si pendant la période d'observation allant du 3$^{e}$ au 21$^{e}$ jour après l'injection, les animaux ne présentent pas de signes de la rage et des essais d'immunofluorescence effectués sur les cerveaux ne donnent aucune indication de la présence du virus de la rage.

3-4. **Innocuité**. Si le vaccin est destiné à plusieurs espèces dont une de l'ordre des carnassiers, conduisez l'essai sur des chiens. Dans le cas contraire, utilisez l'une des espèces auxquelles est destiné le vaccin. Utilisez 2 animaux exempts d'anticorps dirigés contre le virus rabique.

Administrez à chaque animal par une voie recommandée une double dose de vaccin. Observez les animaux au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-5. **Activité**.

L'activité du vaccin rabique est évaluée par détermination de la dose nécessaire pour obtenir chez la souris une protection contre les effets cliniques induits par l'administration intracérébrale de la quantité de virus rabique indiquée ci-après, et comparaison avec la quantité d'une préparation de référence, étalonnée en unités internationales, permettant d'obtenir la même protection.

L'Unité Internationale est l'activité d'une quantité donnée de l'étalon international. La correspondance entre les Unités Internationales et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

Le *vaccin rabique inactivé pour usage vétérinaire PBR* est étalonné en Unités Internationales par rapport à l'étalon international.

L'essai décrit ci-après emploie un modèle en lignes parallèles qui comporte au moins 3 points pour le vaccin à examiner et la préparation de référence. Une fois que l'analyste a acquis une certaine expérience avec la méthode pour chaque vaccin donné, il est possible d'utiliser un essai simplifié avec une seule dilution du vaccin à examiner. Un tel essai permet à l'analyste de vérifier que le vaccin a une activité supérieure de façon significative au minimum requis mais ne donnera pas d'information sur la validité de chaque détermination individuelle. L'emploi d'un essai avec une seule dilution permet une réduction considérable du nombre d'animaux nécessaire pour l'essai et devrait être pris en considération par chaque laboratoire en conformité avec les dispositions de la Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques.

*Sélection des animaux et répartition en groupes.* Utilisez des souris femelles saines âgées d'environ 4 semaines et provenant du même élevage. Répartissez les souris en au moins 10 groupes d'au moins 10 souris.

*Préparation de la suspension d'épreuve.* Inoculez à un des groupes de souris, par voie intracérébrale, la souche CVS du virus de la rage. Lorsque les souris présentent les signes de la rage, mais avant qu'elles ne meurent, euthanasiez-les puis prélevez leur cerveau et préparez une suspension homogène de tissu cérébral dans un liquide approprié. Centrifugez pour séparer les plus grosses particules et utilisez le surnageant comme suspension d'épreuve. Répartissez la suspension en ampoules, par petits volumes, scellez les ampoules et conservez-les à une température inférieure à – 60 °C. Décongelez le contenu d'une ampoule et préparez une série de dilutions de la suspension dans un liquide approprié. Attribuez chaque dilution à un groupe de souris et injectez à chaque souris, par voie intracérébrale, 0,03 mL de la dilution attribuée à son groupe. Observez les animaux au moins une fois par jour pendant 14 jours et notez, pour chaque groupe, le nombre d'animaux pour lesquels des signes de la rage apparaissent entre le 5$^{e}$ et le 14$^{e}$ jour. Calculez la $DI_{50}$ de la suspension non diluée.

*Détermination de l'activité du vaccin.* Préparez une série d'au moins 3 dilutions du vaccin à examiner, ainsi que de la préparation de référence, de telle sorte que les dilutions contenant les plus fortes quantités de vaccin soient supposées protéger plus de 50 pour cent des souris auxquelles elles ont été administrées et que les solutions contenant les plus faibles quantités de vaccin soient supposées protéger moins de 50 pour cent des souris auxquelles elles ont été administrées. Attribuez chacune des dilutions à un des groupes de souris. Injectez à chaque souris, par voie intrapéritonéale, 0,5 mL de la dilution attribuée à son groupe. 14 jours après l'injection, préparez une suspension du virus d'épreuve contenant environ, d'après le résultat du titrage préliminaire, 50 $DI_{50}$ par 0,03 mL. Injectez à chaque souris vaccinée, par voie intracérébrale, 0,03 mL de cette suspension. Préparez une série de 3 dilutions appropriées de la suspension d'épreuve. Attribuez respectivement la suspension d'épreuve et ses 3 dilutions à 4 groupes de 10 souris non vaccinées. Injectez à chaque souris, par voie intracérébrale, 0,03 mL de la suspension ou de la dilution attribuée à son groupe. Observez les souris au moins une fois par jour pendant 14 jours. L'essai n'est pas valable si le nombre de souris qui meurent dans les 4 premiers jours, dans un des groupes, est supérieur à 2. Notez, pour chaque groupe, le nombre de souris pour lesquelles des signes de la rage apparaissent entre le 5$^{e}$ et le 14$^{e}$ jour suivant l'inoculation.

L'essai n'est valable que si :

- pour le vaccin à examiner et pour la préparation de référence, la dose protectrice à 50 pour cent est comprise entre la plus forte et la plus faible des doses administrées aux souris ;
- le titrage de la suspension d'épreuve indique que 0,03 mL de la suspension contient au moins 10 $DI_{50}$ ;
- les limites de confiance ($P$ = 0,95) ne sont pas inférieures à 25 pour cent ni supérieures à 400 pour cent de l'activité estimée ; lorsque ce critère de validité n'est pas rempli, la limite inférieure de l'activité estimée n'est pas inférieure à 1 UI pour la plus petite dose prescrite ;
- l'analyse statistique donne des courbes dose/réponse ayant une pente significative ($P$ = 0,95) et ne présentant pas d'écarts significatifs ($P$ = 0,99) de linéarité ou de parallélisme.

Le vaccin satisfait à l'essai si l'activité mesurée est d'au moins 1 UI pour la plus petite dose prescrite.

*Application de points limites alternatifs.* Une fois qu'un laboratoire a établi, en utilisation de routine, le titrage d'activité ci-dessus, le point limite constitué par la mort de l'animal devra

Vaccins

être remplacé par une observation des signes cliniques et la mise en application d'un point limite plus précoce afin de réduire la souffrance de l'animal. Ce qui suit est donné à titre d'exemple.

La progression de l'infection rabique chez la souris suite à une injection intracérébrale peut être représentée par 5 étapes définies par des signes cliniques caractéristiques :

Etape 1 : poils hérissés, dos voûté,

Etape 2 : mouvements lents, animaux moins alertes (des mouvements circulaires peuvent également être observés),

Etape 3 : mouvements saccadés, tremblements, convulsions,

Etape 4 : signes de parésie ou de paralysie,

Etape 5 : état moribond.

Observez les souris au moins 2 fois par jour à partir du 4e jour après l'injection. Enregistrez les signes cliniques à l'aide d'un tableau semblable au tableau 0451.-1. L'expérience montre que l'utilisation de l'étape 3 comme point limite donne des résultats de titrage d'activité équivalents à ceux obtenus quand la mort de l'animal constitue le point limite. Ceci doit être vérifié par chaque laboratoire en évaluant un nombre approprié de titrages utilisant les 2 types de point limite (signes cliniques ou mort).

Tableau 0451.-1. – *Exemple de tableau utilisé pour enregistrer les signes cliniques dans le titrage de l'activité du vaccin rabique*

| | Nombre de jours après l'injection | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Signes cliniques** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **11** |
| Poils hérissés<br>Dos voûté | | | | | | | | |
| Mouvements lents<br>Animaux moins alertes<br>Mouvements circulaires | | | | | | | | |
| Mouvements saccadés<br>Tremblements<br>Convulsions | | | | | | | | |
| Parésie<br>Paralysie | | | | | | | | |
| Etat moribond | | | | | | | | |

4. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le type de culture cellulaire utilisée pour la préparation du vaccin et l'espèce d'origine,
– le nombre minimal d'Unités Internationales par dose,
– la durée minimale de protection.

**01/2008:0697**

# VACCIN TÉTANIQUE POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Vaccinum tetani ad usum veterinarium

1. DÉFINITION

Le vaccin tétanique pour usage vétérinaire est une préparation de la neurotoxine de *Clostridium tetani* inactivée pour éliminer sa toxicité en maintenant des propriétés immunogènes appropriées. Le vaccin peut être utilisé pour induire une immunité active et/ou passive.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

*C. tetani* utilisée pour la production est multipliée dans un milieu liquide approprié. La neurotoxine est purifiée puis détoxifiée, ou elle peut être détoxifiée avant la purification. La pureté antigénique est exprimée en unités Lf d'anatoxine tétanique par milligramme de protéine et doit être au minimum celle approuvée pour le produit considéré.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être demontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis à vis des animaux auxquels il est destiné. Les essais décrits ci-après sous Production d'antigènes (section 2-2-1), Innocuité (section 2-2-2) et Pouvoir immunogène (section 2-2-3) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

La souche de *C. tetani* utilisée pour la préparation du vaccin doit être satisfaisante quant à la production de neurotoxine.

2-2-1. **Production d'antigènes**. La production de la neurotoxine de *C. tetani* est vérifiée par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), appliquée à la neurotoxine obtenue à partir de la souche vaccinale dans les conditions de production du vaccin.

2-2-2. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination et pour chacune des espèces auxquelles le vaccin est destiné ; utilisez des animaux de l'âge minimum de vaccination recommandé pour cette espèce et de la catégorie la plus sensible. Utilisez un lot de vaccin contenant au moins l'activité maximale susceptible d'être contenue dans les lots de vaccin.

2-2-2-1. *Innocuité générale*

Pour chaque essai utilisez au moins 15 animaux ne possédant pas d'anticorps antitoxiques. Administrez à chaque animal une double dose de vaccin. Après le délai indiqué sur l'étiquette, administrez à chaque animal une simple dose de vaccin. Observez les animaux au moins une fois par jour pendant les 14 jours qui suivent la dernière administration. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux ne présente de signes notables de maladie, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

2-2-2-2. *Innocuité chez la femelle gestante*

Si le vaccin est destiné à des femelles gestantes, celles-ci sont vaccinées au stade de la gestation et selon le plan indiqués sur l'étiquette, et la période d'observation requise dans l'essai d'innocuité générale est prolongée jusqu'à 1 jour après la mise bas.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun animal ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin et si aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-2-3. **Pouvoir immunogène**

2-2-3-1. *Essai du pouvoir immunogène pour l'espèce cible*

Il convient de démontrer pour chaque espèce cible que le vaccin, lorsqu'il est administré selon le schéma recommandé et par une voie recommandée, induit une réponse immunitaire (par exemple, induction d'anticorps antitoxiques ou induction de taux d'anticorps antitoxiques protecteurs) en conformité avec les indications données pour le produit.

2-2-3-2. *Essai du pouvoir immunogène chez le cobaye*

Administrez à au moins 5 cobayes ne possédant pas d'anticorps dirigés contre la neurotoxine de *C. tetani* 1 dose de vaccin par la voie sous-cutanée. Après 28 jours, administrez à nouveau à chaque cobaye 1 dose de vaccin par la voie sous-cutanée. 14 jours après la seconde administration, effectuez un prélèvement sanguin sur chaque cobaye, et préparez des échantillons de sérum. Mesurez pour chaque sérum la réponse en anticorps de chaque échantillon vis-à-vis de la neurotoxine de *C. tetani* à l'aide d'une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), par exemple un essai d'inhibition de liaison

de la toxine (essai ToBI), et un sérum de référence homologue. Déterminez le titre en anticorps moyen des échantillons de sérum.

Le *sérum de cobaye anti-Clostridium tetani pour vaccins pour usage vétérinaire PBR* convient comme sérum de référence.

Dans le cas des vaccins tétaniques destinés à des animaux autres que le cheval, le vaccin satisfait à l'essai si le titre en anticorps moyen du sérum des cobayes vaccinés est au minimum de 7,5 UI/mL.

Dans le cas des vaccins tétaniques destinés au cheval, le vaccin satisfait à l'essai si le titre en anticorps moyen du sérum des cobayes vaccinés est au minimum de 30 UI/mL.

Pour les vaccins tétaniques présentés sous forme de vaccins multi-composants destinés à des animaux autres que le cheval, l'essai ci-dessus peut être réalisé sur des lapins réceptifs à la place des cobayes. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en anticorps moyen du sérum des lapins vaccinés est au minimum de 2,5 UI/mL.

Le *sérum composé de lapin anticlostridies PBR* et le *sérum de lapin anti-Clostridium tetani PBR* conviennent comme sérums de référence.

2-3. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-3-1. **Absence de toxine et irréversibilité de l'anatoxine**. Effectuez l'essai de l'irréversibilité de l'anatoxine en utilisant 2 groupes de 5 cobayes pesant chacun 350-450 g. Si le vaccin est adsorbé, effectuez l'essai dans le délai le plus court possible avant l'adsorption. Préparez une dilution de la récolte détoxifiée telle que les cobayes reçoivent chacun 10 fois la quantité d'anatoxine d'une dose de vaccin (mesurée en unités Lf). Divisez cette dilution en 2 parties égales et conservez-les pendant 6 semaines, l'une à 5 ± 3 °C et l'autre à 37 °C. Attribuez chaque échantillon à un groupe de cobaye différent et injectez à chaque cobaye la dilution attribuée à son groupe. Observez les animaux au moins une fois par jour pendant 21 jours. L'anatoxine satisfait à l'essai si aucun cobaye ne présente de signes de la maladie ni ne meurt de causes imputables à la neurotoxine de *C. tetani*.

2-3-2. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-4) sur chaque lot de vaccin s'il a été réalisé en utilisant un lot de vaccin ayant une activité minimale.

Si l'essai décrit sous Activité est utilisé en tant qu'essai d'activité sur chaque lot, le vaccin satisfait à l'essai si le titre en anticorps, exprimé en Unités Internationales, n'est pas inférieur à celui trouvé pour un lot de vaccin démontré satisfaisant en ce qui concerne son pouvoir immunogène chez l'espèce cible.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**

*Si la nature de l'adjuvant le permet, effectuez de préférence l'identification A. Dans le cas contraire, effectuez l'identification B.*

A. Dissolvez dans le vaccin du *citrate de sodium R* de façon à obtenir une solution à 100 g/L. Maintenez la solution à 37 °C pendant environ 16 h, puis centrifugez jusqu'à obtention d'un surnageant limpide. Le surnageant réagit avec une antitoxine tétanique appropriée, en donnant un précipité.

B. Le vaccin stimule la formation d'anticorps dirigés contre la neurotoxine de *C. tetani* lorsqu'il est injecté à des animaux dépourvus de ces anticorps.

3-2. **Contamination bacterienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Innocuité**. Utilisez 5 cobayes en bonne santé, pesant chacun 350-450 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injectez à chacun d'eux par voie sous-cutanée 5 mL du vaccin divisés en 2 parties égales et administrés en des points différents. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin. Si, dans les 21 jours qui suivent l'injection, un des animaux présente des signes de tétanos ou meurt de cette infection, le vaccin ne satisfait pas à l'essai. Si plus de 1 animal meurt de causes non spécifiques, répétez l'essai. Si un animal meurt dans le second essai, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

3-4. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai du Pouvoir immunogène (section 2-2-3-2).

**04/2008:0442**

# VACCIN VIVANT DE LA BRONCHITE INFECTIEUSE AVIAIRE

## Vaccinum bronchitidis infectivae aviariae vivum

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de la bronchite infectieuse aviaire est une préparation d'une ou plusieurs souches appropriées de différents types du virus de la bronchite infectieuse aviaire. La présente monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des poulets contre la maladie respiratoire due au virus de la bronchite infectieuse aviaire.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poules embryonnés ou en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Oeufs de poules embryonnés**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poules embryonnés, ils proviennent d'élevages exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*).

2-2-2. **Cultures cellulaires**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des cultures cellulaires, elles sont conformes aux spécifications pour les cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *LOTS DE SEMENCE*

2-3-1. **Agents étrangers**. Le lot de semence primaire satisfait à l'essai des agents étrangers dans les lots de semence (*2.6.24*). Lors de ces essais sur le lot de semence primaire, utilisez des organismes n'ayant pas subi, en début d'essai, plus de 5 passages depuis le lot de semence primaire.

2-4. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des poulets auxquels le vaccin est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-4-1), Augmentation de la virulence (section 2-4-2) et Pouvoir immunogène (section 2-4-3) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-4-1. **Innocuité**

2-4-1-1. *Innocuité pour le tractus respiratoire et les reins*. Effectuez l'essai sur des poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Utilisez le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin.

Utilisez au minimum 15 poulets de même origine et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez par voie oculonasale à chaque poulet une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans 1 dose de vaccin. Au 5$^{e}$, 7$^{e}$ et 10$^{e}$ jour suivant l'administration du virus, euthanasiez au moins 5 poulets. Prélevez des échantillons de la trachée et des reins. Préparez les échantillons de reins pour un examen histologique. Retirez les trachées et préparez des coupes transversales de la partie

Vaccins

supérieure (3), moyenne (4) et inférieure (3) de la trachée de chaque poulet. Examinez tous les explants trachéaux par microscopie sous faible grossissement, dès que possible et au plus tard 2 h après le prélèvement, pour observer l'activité ciliaire. Notez la ciliostase sur une échelle allant de 0 (activité ciliaire de 100 pour cent) à 4 (aucune activité, ciliostase complète) ; calculez la notation moyenne de la ciliostase (le maximum par trachée étant de 40) pour les 5 poulets sacrifiés au 5e, 7e et 10e jour. L'essai n'est pas valable si plus de 10 pour cent des poulets meurent de causes non attribuables au virus vaccinal. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si :

– aucun des poulets ne présente de signes cliniques notables de la bronchite infectieuse aviaire ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal,
– les lésions inflammatoires éventuellement observées lors de l'examen histologique des reins sont tout au plus modérées.

Une analyse de risque/bénéfice est réalisée en tenant compte des notations moyennes de la ciliostase obtenues par rapport aux bénéfices attendus de l'utilisation du vaccin.

2-4-1-2. *Innocuité vis-à-vis de l'appareil reproducteur*. Si les indications d'emploi sont telles que le vaccin peut être utilisé chez des femelles âgées de moins de 3 semaines et qui seront ensuite conservées jusqu'à la maturité sexuelle, il doit être démontré qu'il n'y a pas d'effet indésirable sur le développement de l'appareil reproducteur lorsque le vaccin est administré à des poulets de l'âge minimal recommandé pour la vaccination.

L'essai suivant peut être effectué. Utilisez au moins 40 poulets femelles qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination et qui proviennent d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Utilisez le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué qui sera présent dans un lot de vaccin. Administrez à chaque poulet par une voie recommandée une quantité de virus vaccinal équivalente au titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans 1 dose de vaccin. Au moins 10 semaines après l'administration du virus vaccinal, euthanasiez les poulets et procédez à un examen macroscopique des oviductes. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si des anomalies sont présentes dans au maximum 5 pour cent des cas lors de l'examen macroscopique.

2-4-2. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin, à un groupe de 5 poulets âgés de 2 semaines et issus d'un élevage EOPS (*5.2.2*), puis à effectuer des passages successifs sur d'autres groupes similaires, 5 si possible, et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Si les propriétés du virus vaccinal permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon, effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents.

Administrez à chaque poulet par instillation oculaire une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après. Après 2-4 jours, préparez une suspension de la muqueuse trachéale de chaque poulet. Mélangez ces suspensions et administrez par instillation oculaire 0,05 mL du mélange à 5 autres poulets âgés de 2 semaines et issus d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Procédez ainsi à au moins 5 passages, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages. Effectuez l'essai d'innocuité pour le tractus respiratoire et les reins (section 2-4-1-1) et dans les cas appropriés, l'essai d'innocuité vis-à-vis de l'appareil reproducteur (section 2-4-1-2) au moyen du virus avant passage et du virus au niveau de passage maximal où le réisolement a été possible. Choisissez, parmi les voies d'administration recommandées, celle réputée la plus défavorable du point de vue de l'innocuité.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal, ou si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la 1ère et de la 2ème série.

2-4-3. **Pouvoir immunogène**. Le pouvoir immunogène de chaque souche de virus constituant le vaccin doit être démontré. Effectuez un essai pour chacune des voies d'administration et des méthodes d'administration recommandées en utilisant dans chaque cas des poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination et issus d'un élevage EOPS (*5.2.2*). La quantité de virus vaccinal administrée à chaque poulet n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette, et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

L'un des essais ou les 2 essais ci-après peuvent être utilisés pour démontrer le pouvoir immunogène.

2-4-3-1. *Activité ciliaire d'explants trachéaux*. Utilisez au moins 25 poulets de même origine et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez le virus vaccinal par l'une des voies recommandées à au moins 20 de ces poulets et gardez-en au minimum 5 autres comme témoins. Après 21 jours, soumettez tous les poulets à une épreuve virulente en leur administrant par instillation oculaire une quantité suffisante d'une souche virulente du virus de la bronchite infectieuse aviaire du même type que celui à examiner. Euthanasiez tous les poulets 4-7 jours après l'épreuve et préparez des coupes transversales de la partie supérieure (3), moyenne (4) et inférieure (3) de la trachée de chaque poulet. Examinez tous les explants trachéaux par microscopie sous faible grossissement, dès que possible et au plus tard 2 h après le prélèvement, pour observer l'activité ciliaire. Pour une section tranchéale donnée, l'activité ciliaire est considérée normale si au moins 50 pour cent des anneaux internes présentent des mouvements ciliaires vigoureux. Un poulet n'est pas considéré atteint si au minimum 9 anneaux sur 10 présentent une activité ciliaire normale. L'essai n'est pas valable si :

– moins de 80 pour cent des témoins présentent un arrêt ou un extrême affaiblissement de l'activité ciliaire,
– et/ou dans l'intervalle de temps séparant la vaccination de l'épreuve, plus de 10 pour cent des poulets témoins ou vaccinés présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si au moins 80 pour cent des poulets vaccinés présentent une activité ciliaire normale.

2-4-3-2. *Réisolement du virus à partir de prélèvements trachéaux*. Utilisez au moins 30 poulets de même origine et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez le virus vaccinal par l'une des voies recommandées à au moins 20 de ces poulets et gardez-en au minimum 10 autres comme témoins. Après 21 jours, soumettez tous les poulets à une épreuve virulente en leur administrant par instillation oculaire une quantité suffisante d'une forme virulente du virus de la bronchite infectieuse aviaire du même type que celui à examiner. Euthanasiez tous les poulets 4-7 jours après l'épreuve et préparez pour chacun d'eux une suspension de prélèvements de la muqueuse trachéale obtenus par écouvillonnage de la trachée. Inoculez 0,2 mL de chaque suspension dans la cavité allantoïdienne de 5 oeufs de poules embryonnés, âgés de 9-11 jours, provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Placez les oeufs en incubation pendant 6-8 jours à compter de l'inoculation. Les oeufs ne contenant pas d'embryon vivant après 1 jour d'incubation sont éliminés et considérés comme morts non spécifiques. Notez les autres morts d'embryons puis, après les 6-8 jours d'incubation, examinez chacun des oeufs contenant encore un embryon vivant pour rechercher des lésions caractéristiques de la bronchite infectieuse aviaire. Procédez ainsi à 3 passages successifs. Si 1 des embryons d'une série d'oeufs meurt ou présente des lésions caractéristiques, l'inoculum est considéré comme vecteur du virus de la bronchite

infectieuse aviaire. L'examen d'une série d'oeufs est considéré comme définitivement négatif si aucun des inoculums concernés n'est vecteur. L'essai n'est pas valable si :

– le virus d'épreuve est réisolé chez moins de 80 pour cent des poulets témoins,
– et/ou dans l'intervalle de temps séparant la vaccination de l'épreuve, plus de 10 pour cent des poulets témoins ou vaccinés présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin,
– et/ou plus de 1 oeuf d'un groupe est éliminé en raison d'une mort non spécifique de l'embryon.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si le virus d'épreuve est réisolé chez au maximum 20 pour cent des poulets vaccinés.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**

3-1-1. *Vaccins contenant un seul type viral.* Mélangez le vaccin, dilué si nécessaire, à un immunosérum spécifique du type du virus de la bronchite infectieuse aviaire : le vaccin n'exerce plus de pouvoir infectieux lorsqu'il est inoculé à des oeufs de poules embryonnés provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) ou à des cultures cellulaires sensibles (*5.2.4*).

3-1-2. *Vaccins contenant plusieurs types viraux.* Mélangez le vaccin, dilué si nécessaire, à des immunosérums spécifiques de tous les types viraux présents à l'exception de celui à identifier : le vaccin exerce toujours un pouvoir infectieux lorsqu'il est inoculé à des oeufs de poules embryonnés provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) ou à des cultures cellulaires sensibles (*5.2.4*), mais perd ce pouvoir infectieux après addition au mélange d'un immunosérum spécifique du type viral à identifier.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**

Les vaccins pour administration par injection satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

Les vaccins qui ne sont pas pour administration par injection satisfont soit à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)* soit à l'essai suivant : effectuez le contrôle de la contamination bactérienne et fongique par une technique quantitative ; effectuez des essais pour identifier les microorganismes retrouvés dans le vaccin ; le vaccin ne contient pas de microorganisme pathogène et contient au maximum 1 microorganisme non pathogène par dose.

Tout liquide fourni avec le vaccin satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes**. Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes (*2.6.7*).

3-4. **Agents étrangers**. Le vaccin satisfait aux essais des agents étrangers dans les lots de produit fini (*2.6.25*).

3-5. **Innocuité**. Utilisez au minimum 10 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*), de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Administrez par une voie recommandée 10 doses de vaccin à chaque poulet. Observez les animaux au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 20 pour cent des poulets présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des poulets ne présente de signes cliniques notables de la bronchite infectieuse aviaire ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des oeufs de poules embryonnés provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) ou à des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*). Si le vaccin contient plusieurs types viraux, titrez séparément chacun d'eux après avoir neutralisé les autres avec des immunosérums monospécifiques. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en chaque virus vaccinal dans 1 dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'un des essais prescrits sous Pouvoir immunogène (section 2-4-3) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées, et selon le schéma recommandé. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre minimal indiqué sur l'étiquette.

**01/2008:0793**
**corrigé 6.0**

# VACCIN VIVANT DE LA BRUCELLOSE (BRUCELLA MELITENSIS SOUCHE REV. 1) POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Vaccinum brucellosis (Brucella melitensis stirpe Rev. 1) vivum ad usum veterinarium

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de la brucellose (Brucella melitensis souche Rev. 1) pour usage vétérinaire est une suspension de *Brucella melitensis* de la souche vivante Rev. 1. Le vaccin contient au minimum $0,5 \times 10^9$ et au maximum $4 \times 10^9$ bactéries vivantes par dose. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des espèces ovines et caprines contre les maladies causées par *B. melitensis*.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

La souche Rev. 1 de *B. melitensis* est cultivée en milieu approprié. Les modalités de culture sont telles qu'elles permettent d'éviter les dissociations bactériennes dans le but de conserver à la culture son caractère lisse. Les bactéries sont mises en suspension dans une solution tampon qui peut être additionnée d'un stabilisant approprié ; la suspension est ensuite répartie.

2-2. *CHOIX DE LA COMPOSITION DU VACCIN*

Il doit être démontré que le vaccin est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des espèces ovines et caprines auxquelles il est destiné.
L'essai décrit ci-après sous Pouvoir immunogène (section 2-2-1) peut être utilisé pour établir l'efficacité.

2-2-1. **Pouvoir immunogène**. Effectuez chaque essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des agnelles âgées de 4-5 mois. La quantité de souche vaccinale administrée à chaque agnelle n'est pas supérieure au titre minimal en bactéries vivantes qui sera indiqué sur l'étiquette.

Utilisez au moins 40 agnelles issues d'un troupeau indemne de brucellose et non vacciné. La souche d'épreuve est une culture de 24 h de *B. melitensis* H38 en gélose trypticase. Effectuez un essai préliminaire sur des agnelles de même race et de même âge que pour l'essai principal afin de déterminer la dose d'épreuve, qui se situe entre $10^7$ et $10^8$ UFC (unités formant colonie) et qui est choisie pour provoquer l'avortement chez toutes les brebis non vaccinées. Administrez la souche vaccinale à au moins 20 agnelles à l'âge de 4-6 mois, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 20 autres comme témoins. L'oestrus est synchronisé chez les 40 agnelles et l'insémination pratiquée à l'âge de 10-12 mois. Effectuez un diagnostic de gestation sur l'ensemble des brebis 2-3 mois après l'insémination et éliminez les brebis non gravides. Soumettez toutes les brebis gravides à une épreuve virulente en leur administrant par voie conjonctivale une quantité suffisante de *B. melitensis* H38. Notez l'incidence d'avortement et confirmez l'étiologie par mise en évidence de la souche d'épreuve sur l'avorton et la brebis (milieux sélectifs de Kuzdas et Morse ou de Farrell). Effectuez une recherche de la souche d'épreuve sur chaque brebis au moment du part. Effectuez une recherche de la souche

Vaccins

d'épreuve dans les ganglions préscapulaires et rétromammaires prélevés à l'abattage des brebis 4 à 6 semaines après le part.

L'essai n'est valable que si au moins 70 pour cent des brebis non vaccinées :

– présentent un avortement causé par la souche d'épreuve,
– sont infectées par la souche d'épreuve au moment du part,
– et présentent une infection des ganglions préscapulaires et rétromammaires au moment de l'abattage.

Le vaccin satisfait à l'essai si :

– au maximum 30 pour cent des brebis vaccinées présentent un avortement causé par la souche d'épreuve,
– la souche d'épreuve est retrouvée chez au maximum 50 pour cent des brebis vaccinées au moment du part,
– et si la souche d'épreuve est retrouvée chez au maximum 40 pour cent des brebis vaccinées au moment de l'abattage.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. *B. melitensis* présente dans le vaccin à examiner est identifiée par des essais morphologiques, sérologiques et biochimiques appropriés et par culture : la souche Rev. 1 est inhibée par addition dans le milieu de culture approprié de 3 µg de benzylpénicilline sodique par millilitre et elle croît sur une gélose contenant 2,5 µg de streptomycine par millilitre.

3-2. **Innocuité**. Utilisez 2 ovins âgés de 4-6 mois, exempts d'anticorps dirigés contre *B. melitensis.* Administrez à chaque ovin par une voie recommandée une dose de vaccin. Observez les ovins au moins une fois par jour pendant 21 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des ovins ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-3. **Détermination de la phase de dissociation**. Examinée par une technique appropriée, la culture de la souche vaccinale se présente en phase lisse (S). Examinez au minimum 200 colonies.

Le vaccin satisfait à l'essai si au moins 95 pour cent des colonies sont de type lisse.

3-4. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne contient pas de microorganismes étrangers. Vérifiez l'absence de microorganismes autres que *Brucella melitensis* souche Rev. 1 selon les prescriptions de l'essai de stérilité décrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-5. **Titre en bactéries vivantes**. Effectuez le dénombrement des bactéries vivantes sur milieu solide approprié à la culture de *Brucella melitensis* souche Rev. 1.

Le vaccin satisfait à l'essai s'il contient au minimum $0,5 \times 10^9$ et au maximum $4 \times 10^9$ bactéries vivantes par dose.

3-6. **Temps de persistance 50 pour cent**. Utilisez 32 souris femelles de souche CD1, âgées de 5 à 6 semaines. Administrez à chaque souris par voie sous-cutanée une suspension contenant $10^8$ bactéries vivantes du vaccin à examiner. Euthanasiez les souris par lot de 8 randomisé, 3, 6, 9 et 12 semaines après l'inoculation. Prélevez les rates et broyez-les individuellement et aseptiquement dans 10 volumes de *solution saline tamponnée phosphate pH 6,8 R*. Etalez la suspension à la surface de boîtes de milieu approprié, à raison de 0,4 mL par boîte et d'au moins 3 boîtes par rate (seuil de détection : 5 germes par rate). Effectuez en parallèle un essai semblable sur *Brucella melitensis souche Rev. 1 PBR* (souche de référence). Calculez le temps de persistance 50 pour cent par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*) pour l'analyse par probits.

Le vaccin satisfait à l'essai si le temps de persistance 50 pour cent ne diffère pas de manière significative de celui de la souche de référence.

4. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– que le vaccin peut être dangereux pour l'homme,
– que le vaccin ne doit pas être utilisé chez les animaux gravides ni pendant la lactation,
– que le vaccin peut être dangereux pour les bovins, qui ne doivent pas être gardés en contact avec des animaux vaccinés.

**01/2008:0587**

# VACCIN VIVANT DE LA BURSITE INFECTIEUSE AVIAIRE

## Vaccinum bursitidis infectivae aviariae vivum

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de la bursite infectieuse aviaire (vaccin vivant de la maladie de Gumboro) est une préparation d'une souche appropriée du virus de la bursite infectieuse type 1. La présente monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des poulets ; elle s'applique aux vaccins contenant des souches de faible virulence mais pas à ceux contenant des souches de virulence plus élevée qui peuvent être nécessaires pour la prophylaxie dans certaines conditions épidémiologiques.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poules embryonnés ou en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Oeufs de poules embryonnés**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poules embryonnés, ils proviennent d'élevages exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*).

2-2-2. **Cultures cellulaires**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des cultures cellulaires, elles sont conformes aux spécifications pour les cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *LOTS DE SEMENCE*

2-3-1. **Agents étrangers**. Le lot de semence primaire satisfait à l'essai des agents étrangers dans les lots de semence (*2.6.24*). Lors de ces essais sur lot de semence primaire, utilisez des organismes n'ayant pas subi, en début d'essai, plus de 5 passages depuis le lot de semence primaire.

2-4. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des poulets auxquels le vaccin est destiné.
Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-4-1), Lésions de la bourse de Fabricius (section 2-4-2), Immunodépression (section 2-4-3), Augmentation de la virulence (section 2-4-4) et Pouvoir immunogène (section 2-4-5) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et le pouvoir immunogène.

2-4-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies d'administration et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Utilisez le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin. Pour chaque essai, utilisez au minimum 20 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez à chaque poulet une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans 1 dose de vaccin. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 10 pour cent des poulets meurent de causes non attribuables au virus vaccinal. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun

Vaccins

des poulets ne présente de signes cliniques notables de la bursite infectieuse aviaire ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal.

2-4-2. **Lésions de la bourse de Fabricius**. Effectuez l'essai sur des poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Choisissez, parmi les voies d'administration recommandées, celle réputée la plus défavorable du point de vue de l'innocuité. Utilisez le virus au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin. Utilisez au minimum 20 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez à chacun d'eux une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans 1 dose de vaccin. Après 7, 14, 21 et 28 jours à compter de l'administration du virus vaccinal, euthanasiez chaque fois 5 poulets au moins et préparez pour chacun 1 coupe de la bourse de Fabricius du diamètre le plus large. Procédez à un examen histologique de la coupe pour évaluer le degré de lésion selon l'échelle suivante.

| | |
|---|---|
| 0 | Absence de lésions, bourse normale. |
| 1 | 1 pour cent à 25 pour cent des follicules présentent une déplétion lymphocytaire (avec moins de 50 pour cent de déplétion au niveau des follicules affectés). Un afflux de cellules hétérophiles est observé au niveau des lésions. |
| 2 | 26 pour cent à 50 pour cent des follicules présentent une déplétion lymphocytaire presque totale (avec plus de 75 pour cent de déplétion au niveau des follicules affectés). Les follicules affectés présentent des lésions de nécrose et un afflux important de cellules hétérophiles peut être observé. |
| 3 | 51 pour cent à 75 pour cent des follicules présentent une déplétion lymphocytaire presque totale. Les follicules affectés présentent des lésions de nécrose et un afflux important de cellules hétérophiles est observé. |
| 4 | 76 pour cent à 100 pour cent des follicules présentent une déplétion lymphocytaire presque totale. Une hyperplasie et des structures kystiques sont observées. Les follicules affectés présentent des lésions de nécrose et un afflux important de cellules hétérophiles est observé. |
| 5 | 100 pour cent des follicules présentent une déplétion lymphocytaire presque totale. La structure folliculaire est totalement détruite. L'épithélium est épaissi et plissé. Le tissu de la bourse présente une dégénérescence fibreuse. |

Calculez la note moyenne pour chaque groupe de poulets. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si :

– aucun des poulets ne présente de signes cliniques notables de la bursite infectieuse aviaire ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal,

– dans les 21 jours suivant l'administration du virus vaccinal, la note moyenne de lésions de la bourse est inférieure ou égale à 2,0 et dans les 28 jours suivant l'administration, la note moyenne de lésions de la bourse est inférieure ou égale à 0,6,

– dans les 21 jours suivant l'administration, il se produit une recolonisation notable de la bourse par les lymphocytes.

2-4-3. **Immunodépression**. Effectuez les essais sur des poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Choisissez, parmi les voies d'administration recommandées, celle réputée la plus défavorable du point de vue de l'innocuité. Utilisez le virus au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin. Utilisez au minimum 30 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Répartissez-les au hasard en 3 groupes d'au minimum 10 animaux et maintenez les groupes séparés. Administrez à chaque poulet de l'un des groupes, par instillation oculaire, une quantité de virus vaccinal au moins équivalente au titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans 1 dose de vaccin. Après le nombre de jours pour lequel, d'après les résultats de l'essai des lésions de la bourse de Fabricius (section 2-4-2), le degré de lésions de la bourse est supposé être à son maximum, administrez à chacun des poulets du groupe vacciné et d'un autre des 3 groupes, 1 dose du vaccin vivant de la pseudopeste aviaire de la souche Hitchner B1. Attendez 14 jours, puis déterminez la réponse sérologique de chacun des poulets des 2 groupes au virus de la pseudopeste aviaire. Soumettez les poulets des 3 groupes à une épreuve virulente en leur administrant par voie intramusculaire au minimum $10^5$ $DIO_{50}$ d'une forme virulente du virus de la pseudopeste aviaire. Comparez le degré de protection respectivement atteint, vis-à-vis de la pseudopeste aviaire, dans les 2 groupes vaccinés avec la souche Hitchner B1 et dans le groupe témoin. L'essai n'est pas valable si 1 ou plusieurs des poulets non vaccinés ont survécu après 7 jours à compter de l'épreuve. Le degré d'immunosuppression est estimé par comparaison des réponses sérologiques et des taux de protection entre les 2 groupes vaccinés avec la souche Hitchner B1. Le vaccin satisfait à l'essai s'il n'y a pas de différence significative entre ces 2 groupes.

2-4-4. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin, à un groupe de 5 poulets de l'âge minimal recommandé pour la vaccination et issus d'un élevage EOPS (*5.2.2*), puis à effectuer des passages successifs, 5 si possible, sur d'autres groupes similaires, et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Si les propriétés du virus vaccinal permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon, effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents. Administrez par instillation oculaire une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après. Après 3-4 jours, préparez une suspension à partir de la bourse de Fabricius de chaque poulet. Mélangez ces suspensions et administrez par instillation oculaire 0,05 mL du mélange à 5 autres poulets de même âge et de même origine. Procédez ainsi à au moins 5 passages, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages. Effectuez l'essai des lésions de la bourse de Fabricius (section 2-4-2) au moyen du virus avant passage et du virus au niveau de passage maximal où le réisolement a été possible. Choisissez, parmi les voies d'administration recommandées, celle réputée la plus défavorable du point de vue de l'innocuité. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal, ou si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde série.

2-4-5. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies d'administration et des méthodes d'administration recommandées en utilisant dans chaque cas des poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque poulet n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette, et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin. Utilisez au moins 30 poulets de même origine et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez le virus vaccinal par l'une des voies recommandées à au moins 20 de ces poulets et gardez-en au minimum 10 autres comme témoins. Après 14 jours, soumettez tous les poulets à une épreuve virulente en leur administrant par instillation oculaire une quantité suffisante d'une forme virulente du virus de la bursite infectieuse aviaire. Observez tous les poulets au moins 1 fois par jour pendant 10 jours à compter de l'épreuve. Notez les morts dus à la bursite infectieuse aviaire et le nombre de poulets survivants qui présentent des signes cliniques de la bursite infectieuse aviaire. A la fin de la période d'observation, euthanasiez tous les poulets survivants et

Vaccins

procédez à un examen histologique pour rechercher des lésions de la bourse de Fabricius. L'essai n'est pas valable si une ou plusieurs des situations suivantes se présentent :

– au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, moins de 50 pour cent des poulets témoins présentent des signes caractéristiques de la bursite infectieuse aviaire,
– un ou plusieurs des poulets témoins qui ont survécu à l'épreuve ne présentent pas de lésions de degré 3 de la bourse de Fabricius,
– dans l'intervalle de temps séparant la vaccination de l'épreuve, plus de 10 pour cent des poulets témoins ou vaccinés présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, au moins 90 pour cent des poulets vaccinés survivent sans présenter de signes cliniques notables de la bursite infectieuse aviaire ni de lésions de degré 3 de la bourse de Fabricius.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Mélangez le vaccin, dilué si nécessaire, à un immunosérum monospécifique du virus de la bursite infectieuse aviaire type 1 : le vaccin n'exerce plus de pouvoir infectieux lorsqu'il est inoculé à des oeufs de poules embryonnés provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) ou à des cultures cellulaires sensibles (*5.2.4*).

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**

Les vaccins pour administration par injection satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

Les vaccins qui ne sont pas pour administration par injection satisfont soit à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)* soit à l'essai suivant : effectuez le contrôle de la contamination bactérienne et fongique par une technique quantitative ; effectuez des essais pour identifier les microorganismes retrouvés dans le vaccin ; le vaccin ne contient pas de microorganisme pathogène et contient au maximum 1 microorganisme non pathogène par dose.

Tout liquide fourni avec le vaccin satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes**. Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes (*2.6.7*).

3-4. **Agents étrangers**. Le vaccin satisfait aux essais des agents étrangers dans les lots de produit fini (*2.6.25*).

3-5. **Innocuité**. Utilisez au minimum 10 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*), de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Administrez à chaque poulet 10 doses de vaccin par l'une des voies et méthodes recommandées. Observez les animaux au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 20 pour cent des poulets présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des poulets ne présente de signes cliniques notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des oeufs de poules embryonnés provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) ou à des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*). Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans 1 dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-4-5) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.

**01/2008:1102**
**corrigé 6.0**

# VACCIN VIVANT DE LA CALICIVIROSE DU CHAT

## Vaccinum calicivirosis felinae vivum

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de la calicivirose du chat est une préparation d'une ou de plusieurs souches appropriées du calicivirus du chat. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des chats contre la calicivirose du chat.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*
Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*
Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (y compris l'innocuité pour la chatte gestante si le vaccin n'est pas contre-indiqué chez ces chattes) (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des chats auxquels le vaccin est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1), Augmentation de la virulence (section 2-3-2) et Pouvoir immunogène (section 2-3-3) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination. Utilisez le virus au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin.

Pour chaque essai, utilisez au minimum 10 chats de l'âge minimal recommandé pour la vaccination, exempts d'anticorps dirigés contre le calicivirus du chat. Administrez à chaque chat une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin. Observez les chats au moins une fois par jour pendant 21 jours.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun chat ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal.

2-3-2. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin, à 2 chats exempts d'anticorps dirigés contre le calicivirus du chat, puis à effectuer des passages successifs, 5 si possible, sur d'autres groupes similaires et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Si les propriétés du virus vaccinal permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon, effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi

Vaccins

le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents.

Administrez à chaque chat par une voie recommandée une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après. Choisissez, parmi les voies d'administration recommandées, celle réputée la plus favorable au retour à la virulence. Après 5 jours, prélevez le mucus nasal, les amygdales et la trachée de chaque chat. Mélangez-les, broyez-les dans 10 mL de solution saline tamponnée puis décantez. Administrez par voie intranasale le surnageant à 2 autres chats. Procédez ainsi à 5 passages au minimum, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages.

Effectuez l'essai d'innocuité (section 2-3-1) au moyen du virus vaccinal avant passage et du virus au niveau de passage maximal où le réisolement a été possible.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal ou si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde séries.

2-3-3. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des souches incorporées dans le vaccin, pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination, en utilisant dans chaque cas des chats âgés de 8-12 semaines. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque chat n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

Utilisez au moins 20 chats exempts d'anticorps dirigés contre le calicivirus du chat. Administrez le virus vaccinal à au moins 10 chats, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 10 autres comme témoins. Après 4 semaines, soumettez tous les chats à une épreuve virulente en leur administrant par voie intranasale une quantité suffisante de suspension d'une forme virulente du calivirus du chat. Observez les chats au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de l'épreuve. Effectuez un lavage nasal chaque jour entre le 2e et le 14e jour afin de déterminer l'excrétion du virus. Relevez la température quotidiennement ainsi que les signes cliniques selon la grille de notation ci-après.

| **Signes observés** | **Notation** |
|---|---|
| Mort | 10 |
| Etat dépressif | 2 |
| Température ≥ 39,5 °C | 1 |
| Température ≤ 37 °C | 2 |
| Ulcères (oraux ou du nez) | |
| – petits et peu nombreux | 1 |
| – importants et nombreux | 3 |
| Ecoulement nasal | |
| – léger | 1 |
| – important | 2 |
| Ecoulement oculaire | 1 |
| Perte de poids | 2 |
| Excrétion virale : | |
| ≤ 4 jours | 1 |
| 5-7 jours | 2 |
| > 7 jours | 3 |

L'essai n'est pas valable si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, moins de 80 pour cent des chats témoins présentent des signes notables de la calicivirose du chat (fièvre, ulcères buccaux, troubles respiratoires). Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, la notation des chats vaccinés est inférieure de façon significative à celle des témoins.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Neutralisé par un ou plusieurs immunosérums monospécifiques, le vaccin n'est plus en mesure d'infecter des cultures cellulaires sensibles dans lesquelles il a été inoculé.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes** (*2.6.7*). Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes.

3-4. **Agents étrangers**. Neutralisez le virus vaccinal à l'aide d'un ou plusieurs immunosérums monospécifiques appropriés dirigés contre le calicivirus du chat et inoculez le mélange à des cultures cellulaires sensibles aux virus pathogènes pour le chat. Effectuez au moins un passage et maintenez les cultures pendant 14 jours. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne se produit pas d'effet cytopathogène et s'il n'est observé aucun signe de la présence d'agents hémadsorbants.

3-5. **Innocuité**. Utilisez 2 chats âgés de 8-12 semaines, exempts d'anticorps dirigés contre le calicivirus du chat. Administrez à chaque chat par une voie recommandée 10 doses de vaccin. Observez les chats au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des chats ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des cultures cellulaires appropriées, à une température qui favorise la multiplication du virus. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans une dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-3) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.

Vaccins

**07/2008:2326**

# VACCIN VIVANT DE LA COCCIDIOSE POUR LE POULET

## Vaccinum coccidiosidis vivum ad pullum

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de la coccidiose pour le poulet est une préparation d'oocystes sporulés obtenue à partir d'une ou de plusieurs lignées appropriées d'espèces de parasites coccidiens (espèces du genre *Eimeria*). Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des poulets.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Les oocystes sont produits sur des poulets provenant d'un élevage exempt de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*) ou dans des oeufs de poules embryonnés provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Les oeufs doivent être désinfectés et/ou incubés dans des conditions validées pour assurer l'inactivation de toute *Eimeria* qui pourrait être sur les coquilles. Les poussins éclos doivent être élevés dans des locaux désinfectés, dans des conditions d'isolement qui assurent l'absence d'infection par *Eimeria*. Les poulets doivent n'avoir pas été traités par des coccidiostatiques.

Les oocystes sont recueillis à partir de la fiente ou du contenu du tractus intestinal des poulets infectés pendant la patence. Les oocystes de différentes lignées d'*Eimeria* sont produits séparément. Les oocystes sont isolés, purifiés, désinfectés, sporulés et dénombrés. Le vaccin est produit par mélange en milieu approprié d'un nombre défini d'oocystes sporulés de chaque lignée.

2-2. *LOTS DE SEMENCE*

2-2-1. **Identification**. L'identité de chaque semence primaire d'*Eimeria* doit être établie à partir des caractéristiques des coccidies qui en sont issues, en se basant sur une sélection appropriée des caractéristiques suivantes : taille et forme de l'oocyste, localisation des étapes du développement dans l'intestin du poulet, lésions pathognomoniques (*E. tenella, E. acervulina, E. necatrix, E. maxima* et *E. brunetti*) et l'absence de lésions macroscopiques (*E. praecox* et *E. mitis*), taille des schizontes dans la muqueuse intestinale, taille des gamétocytes dans la muqueuse, différences de mobilité électrophorétique de certaines isoenzymes comme la lactate déshydrogénase et la glucose phosphate isomérase, et par l'utilisation de techniques de biologie moléculaire. Les lignées atténuées artificiellement peuvent être distinguées des souches parentes en étudiant des paramètres appropriés liés à la méthode d'atténuation.

2-2-2. **Agents étrangers**. Effectuez les essais 1-6 du chapitre *2.6.24. Vaccins viraux aviaires : recherche des agents étrangers dans les lots de semence*. Les dispositions générales *a-d, f* et *h* ainsi que la section 7 du chapitre *2.6.24* sont également applicables. Pour ces essais sur le lot de semence primaire, utilisez des organismes n'ayant subi, en début d'essai, pas plus de 5 passages depuis le lot de semence primaire. Chaque lot de semence primaire satisfait aux exigences de chacun de ces essais.

2-3. *CHOIX DE LA COMPOSITION VACCINALE*

Seules des lignées coccidiennes qui ont été reconnues conformes aux caractéristiques de pathogénicité résiduelle et d'augmentation de la virulence peuvent être utilisées dans la préparation du vaccin. Ces caractéristiques peuvent être démontrées en utilisant les essais décrits ci-après (sections 2-3-2 et 2-3-3). Il doit être démontré que le vaccin possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des poulets auxquels il est destiné. Les essais décrits ci-après sous Essai spécifique d'innocuité de la composition vaccinale (section 2-3-1) et Pouvoir immunogène (section 2-3-4) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Essai spécifique d'innocuité de la composition vaccinale**. Effectuez l'essai avec une préparation contenant des oocystes de chaque espèce au niveau de passage le moins atténué qui sera présent dans un lot de vaccin. Utilisez au minimum 20 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Les poulets doivent être éclos et élevés comme décrit dans la section 2-1 et n'avoir pas été traités par des coccidiostatiques. Utilisez des poulets appartenant à la catégorie présumée être la plus sensible, c'est-à-dire des poulets âgés de 14 jours. Pendant l'essai, placez les poulets dans des conditions appropriées en utilisant des enclos ou des cages avec des planchers pleins pour favoriser une réinfection par les oocystes. Administrez à chacun des poulets, par gavage ou par une autre voie appropriée, une quantité d'oocystes vaccinaux contenant l'équivalent d'au moins 10 fois la quantité maximale d'oocystes de chaque espèce coccidienne susceptible d'être présente dans 1 dose de vaccin. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 10 pour cent des poulets vaccinés meurent de causes non attribuables aux oocystes vaccinaux. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun poulet vacciné ne présente de signes cliniques notables de la coccidiose ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

2-3-2. **Essai de pathogénicité résiduelle**. Effectuez un essai séparé avec chacune des espèces et lignées coccidiennes devant être contenues dans le vaccin. Utilisez à chaque fois une préparation contenant des oocystes au passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin. Pour chaque essai, utilisez au moins 20 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Les poulets doivent être éclos et élevés comme décrit dans la section 2-1 et n'avoir pas été traités par des coccidiostatiques. Utilisez des poulets appartenant à la catégorie présumée être la plus sensible, c'est-à-dire des poulets âgés de 14 jours. Pendant l'essai, placez les poulets dans des cages (ou tout autre mode de logement approprié qui prévienne la réinfection et permette la collecte des fientes). Administrez à chaque poulet, par gavage ou par une autre voie appropriée, une quantité d'oocystes vaccinaux contenant l'équivalent d'au moins 10 fois la quantité maximale susceptible d'être présente dans 1 dose de vaccin. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 14 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 10 pour cent des poulets meurent de causes non attribuables aux oocystes vaccinaux. Du 3[e] jour au 14[e] jour après l'administration, recueillez la fiente et déterminez quotidiennement la production d'oocystes. Entre le 4[e] et le 8[e] jour, selon la durée de la période de prépatence, lorsque les lésions sont présumées êtres maximales, et au 14[e] jour, euthanasiez au moins 9 poulets et recherchez sur le tractus intestinal la présence de lésions spécifiques indicatives d'une infection coccidienne ou, pour les espèces dont il a été établi qu'elles n'induisent pas de lésions macroscopiques (*E. mitis* et *E. praecox*), d'autres signes microscopiques d'infection comme la présence d'oocystes ou d'oocystes en développement dans le contenu intestinal ou sur des prélèvements de la paroi intestinale. En ce qui concerne les espèces pouvant potentiellement produire des changements macroscopiques pathologiques pertinents si elles ne sont pas atténuées, utilisez la grille de cotation suivante, allant de 0 à 4, pour enregistrer les lésions spécifiques d'une espèce visibles sur l'intestin.

*Eimeria acervulina*

0 Pas de lésion apparente.

1 Les lésions, blanches, dispersées, semblables à des plaques et contenant des oocystes en développement, sont confinées au duodénum. Ces lésions sont allongées et orientées transversalement sur les parois de l'intestin, tels les barreaux d'une échelle. Elles peuvent être visibles sur les surfaces séreuses ou muqueuses de l'intestin. Il est possible d'observer jusqu'à 5 lésions au maximum par centimètre carré.

2 Les lésions sont beaucoup plus proches les unes des autres, sans être coalescentes. Les lésions peuvent s'étendre postérieurement jusqu'à 20 cm sous le duodénum chez des oiseaux âgés de 3 semaines. Les parois intestinales ne présentent pas d'épaississement. Le contenu du tube digestif est normal.

3 Les lésions sont assez nombreuses pour causer une coalescence avec une réduction de la taille des lésions, l'intestin semblant recouvert d'un enduit. La paroi intestinale est épaissie et le contenu de l'intestin est aqueux. Les lésions peuvent s'étendre postérieurement jusqu'au diverticule du sac vitellin.

4 La paroi muqueuse est grisâtre et présente des colonies complètement coalescentes. La congestion peut être réduite à de petites pétéchies ou, en cas d'infections extrêmement importantes, la muqueuse entière peut prendre une coloration rouge vif. Les lésions individuelles peuvent ne pas se distinguer dans l'intestin supérieur. Des lésions typiques en barreaux d'échelle apparaissent dans la partie moyenne de l'intestin. La paroi intestinale est très épaissie et l'intestin est rempli d'un exsudat caséeux pouvant contenir un grand nombre d'oocystes. La note 4 est attribuée aux oiseaux mourant de coccidiose.

*Eimeria brunetti*

0 Pas de lésion apparente.

1 Pas de lésion apparente. En l'absence de lésions distinctes, la présence de parasites peut ne pas être décelée s'il n'est pas effectué d'examen microscopique des biopsies des zones suspectes.

2 La paroi intestinale peut apparaître grisée. La portion inférieure peut être épaissie et des mouchetures d'une matière rose issue de l'intestin sont observées.

3 La paroi intestinale est épaissie et un exsudat catarrhal teinté de sang est présent. Des stries transversales rouges peuvent être présentes dans le rectum inférieur et des lésions sont visibles dans les amygdales cæcales. De plus, cette dernière zone peut présenter des bouchons muqueux mous.

4 Une importante nécrose de coagulation de la surface muqueuse de l'intestin inférieur peut être présente. Chez certains oiseaux, une membrane nécrotique sèche peut tapisser l'intestin et des dépôts caséeux peuvent obturer les cæcums. Les lésions peuvent s'étendre à l'intestin moyen ou supérieur. La note 4 est attribuée aux oiseaux mourant de cocciodiose.

*Eimeria maxima*

0 Pas de lésion apparente.

1 Des petites pétéchies rouges peuvent apparaître sur la surface séreuse de l'intestin moyen. Il n'est pas observé de ballonnement ni d'épaississement de l'intestin, mais des petites quantités de mucus orangé peuvent être présentes.

2 La surface séreuse peut être tachetée de nombreuses pétéchies rouges. L'intestin peut être rempli de mucus orangé, mais le ballonnement de l'intestin est léger ou inexistant. Un épaississement de la paroi est observé.

3 La paroi intestinale est ballonnée et épaissie. La surface muqueuse est rugueuse. Le contenu de l'intestin est composé de mucus et de caillots sanguins formant des petits points.

4 La paroi intestinale peut être ballonnée sur la majeure partie de sa longueur. Elle contient de nombreux caillots sanguins et des érythrocytes digérés qui lui donnent une coloration caractéristique et une odeur putride. La paroi est très épaissie. La note 4 est attribuée aux oiseaux mourant de cocciodiose.

*Eimeria necatrix*

0 Pas de lésion apparente.

1 Des petites pétéchies dispersées et des points blancs sont aisément visibles sur la surface séreuse. Peu ou pas de lésions apparentes sur la surface muqueuse sont observées.

2 De nombreuses pétéchies sont observées sur la surface séreuse. Un léger ballonnement confiné à la région de l'intestin moyen peut être présent.

3 Une hémorragie importante est observée dans la lumière de l'intestin. La surface séreuse est recouverte de pétéchies rouges et/ou de plaques blanches, et elle est rugueuse et épaissie, avec de nombreux petits points hémorragiques. Le contenu intestinal normal est absent. Le ballonnement s'étend à la moitié inférieure de l'intestin grêle.

4 Une hémorragie importante donne une coloration sombre à l'intestin et le contenu de l'intestin est composé de mucus rouge ou brun. Le ballonnement peut s'étendre sur la majeure partie de la longueur de l'intestin. La note 4 est attribuée aux oiseaux mourant de cocciodiose.

*Eimeria tenella*

0 Pas de lésion apparente.

1 Très peu de pétéchies dispersées sont observées sur la paroi cæcale et il n'y a pas d'épaississement des parois cæcales. Le contenu cæcal normal est présent.

2 Les lésions sont plus nombreuses avec présence notable de sang dans le contenu cæcal. La paroi cæcale est relativement épaissie. Le contenu cæcal normal est présent.

3 De grandes quantités de sang ou des dépôts cæcaux sont présents. Les parois cæcales sont très épaissies. Le contenu fécal normal est absent ou présent en petite quantité dans les cæcums.

4 La paroi cæcale est très distendue avec du sang ou de grands dépôts caséeux. Les débris fécaux sont absents ou inclus dans des dépôts. La note 4 est attribuée aux oiseaux mourant de cocciodiose.

L'espèce et la lignée satisfont à l'essai d'atténuation si les signes observés se limitent à de légères lésions coccidiennes ou à d'autres signes limités d'infection ; si la grille de cotation décrite ci-dessus est appropriée, la note moyenne des lésions au jour de prélèvement entre le 4^e^ et le 8^e^ jour et au 14^e^ jour est au maximum de 1,5 points et aucune note individuelle ne dépasse 3 points. La quantité d'oocystes produits et le moment de la production sont déterminés.

2-3-3. **Augmentation de la virulence**. Effectuez un essai séparé avec chaque espèce et lignée coccidiennes devant être incluses dans le vaccin. Utilisez une préparation contenant des oocystes au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin. Pour chaque essai, utilisez des poulets âgés de 14 jours provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Les poulets doivent être éclos et élevés comme décrit dans la section 2-1 et n'avoir pas été traités par des coccidiostatiques. Pendant l'essai, les poulets sont placés dans des cages (ou tout autre mode de logement approprié qui prévienne la réinfection et permette la collecte des fientes). Administrez à un groupe de 5 poulets, par gavage ou par une autre voie appropriée, une quantité d'oocystes permettant la récupération des oocystes pour les passages décrits ci-après. Recueillez la fiente quotidiennement du 2^e^ jour au 14^e^ jour après infection et préparez une suspension du mélange des oocystes sporulés provenant des 5 poulets. Administrez, par gavage ou par une autre voie appropriée, une quantité appropriée à un autre groupe de 5 poulets. Effectuez ce passage au moins 5 fois, en vérifiant la présence d'oocystes à chaque passage. Répétez l'essai de pathogénicité résiduelle (section 2-3-2) en utilisant les oocystes récupérés au niveau de passage le plus élevé et administrez une quantité d'oocystes sporulés par poulet semblable à celle utilisée dans l'essai effectué avec des oocystes n'ayant pas subi de passage. Comparez les résultats de la recherche de signes de lésion ou d'infection dans le tractus intestinal et la production d'oocystes après administration d'oocystes n'ayant pas subi de passage et d'oocystes après passages. La lignée satisfait à l'essai s'il n'est observé aucune indication d'augmentation de la virulence entre les oocystes au niveau de passage maximal et les oocystes n'ayant pas subi de passage. L'essai n'est valable que si des oocystes sont récupérés à tous les niveaux de passage.

2-3-4. **Pouvoir immunogène**. L'efficacité de chaque espèce et lignée coccidiennes incluses dans le vaccin doit être déterminée par une étude séparée avec une souche d'épreuve appropriée. Pour chaque composant, un essai est effectué en administrant le vaccin par chacune des voies et méthodes d'administration recommandées, en utilisant à chaque fois des poulets ayant au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. La quantité de chacun des composants du lot de vaccin administrée à chaque poulet n'est pas supérieure au nombre minimal d'oocystes indiqué sur l'étiquette et les oocystes sont au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin. Pour l'essai, utilisez au moins 40 poulets provenant

Vaccins

d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Les poulets doivent être éclos et élevés comme décrit dans la section 2-1 et n'avoir pas été traités par des coccidiostatiques. Vaccinez au moins 20 poulets et gardez au moins 20 poulets comme témoins. Le nombre de poulets utilisés peut être plus grand pour l'évaluation du gain de poids avec des souches d'*Eimeria* présentant un faible pouvoir pathogène. L'essai peut exiger différentes doses d'épreuve pour différents paramètres et peut ainsi être évalué à l'aide de groupes d'épreuve séparés. Par exemple, une dose d'épreuve plus faible peut être nécessaire pour déterminer l'effet sur la production d'oocystes par rapport à la dose nécessaire pour déterminer l'effet sur le gain de poids et la cotation des lésions. Après la vaccination, placez les poulets dans des conditions appropriées en utilisant des enclos ou des cages avec des planchers pleins pour favoriser une réinfection par les oocystes. A un jour approprié entre le 14$^{e}$ et le 21$^{e}$ jour après la vaccination, pesez chacun des poulets, placez-les dans des cages (ou tout autre mode de logement approprié qui prévienne la réinfection et permette la collecte des fientes) et soumettez chaque poulet à une épreuve virulente, par gavage ou par une autre voie appropriée, avec une quantité de coccidies virulentes suffisante pour induire chez les témoins non vaccinés des signes de maladie caractéristiques de l'espèce d'*Eimeria* utilisée pour l'épreuve. Observez les poulets au moins 1 fois par jour jusqu'à la fin de l'essai. Notez le nombre de morts et de poulets survivants présentant des signes cliniques de maladie. Recueillez la fiente et déterminez la production d'oocystes du 3$^{e}$ jour après l'épreuve jusqu'à la fin de l'essai. A un jour approprié entre le 4$^{e}$ et le 8$^{e}$ jour après l'épreuve, selon la durée de la période de prépatence de la souche d'épreuve, pesez chaque poulet. Euthanasiez 10 d'entre eux dans chaque groupe et recherchez des lésions dans le tractus intestinal. Dans les cas appropriés, notez les lésions spécifiques indicatives de l'espèce coccidienne d'épreuve (en utilisant la grille de cotation décrite en section 2-3-2). Pour les espèces dont il a été établi qu'elles n'induisent pas de lésions macroscopiques (*E. mitis* et *E. praecox*), examinez les poulets en recherchant des preuves d'infection microscopiques comme la présence d'oocystes ou d'oocystes en développement dans le contenu intestinal ou sur des prélèvements de la paroi intestinale. Au 14$^{e}$ jour après l'épreuve, pesez chacun des poulets restants.

L'essai n'est pas valable si :

- lors de la période entre la vaccination et l'épreuve, plus de 10 pour cent des poulets vaccinés ou témoins présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin ;
- lorsque l'épreuve est réalisée avec *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. necatrix*, *E. maxima* ou *E. brunetti*, moins de 80 pour cent des poulets témoins euthanasiés entre le 4$^{e}$ et le 8$^{e}$ jour présentent des lésions caractéristiques prononcées d'infection par la souche d'épreuve dans l'intestin lors de l'examen post-mortem (par exemple, notes de lésion au minimum de 2),
- pour les épreuves avec *E. mitis* ou *E. praecox*, moins de 80 pour cent des poulets témoins euthanasiés entre le 4$^{e}$ et le 8$^{e}$ jour sont infectés.

Le vaccin satisfait à l'essai si :

- pour toutes les espèces d'épreuve d'*Eimeria*, en comparaison des poulets témoins, la production des oocystes diminue de manière significative chez les poulets vaccinés ;
- pour toutes les espèces d'épreuve d'*Eimeria*, aucun poulet vacciné ne meurt du fait d'une infection due à l'épreuve virulente ;
- par les épreuves avec *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. necatrix*, *E. maxima* ou *E. brunetti*, au moins 80 pour cent des poulets vaccinés ne présentent qu'au plus des signes légers de maladie, moins prononcés que ceux des témoins ;
- pour les épreuves avec *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. necatrix*, *E. maxima* ou *E. brunetti*, au moins 80 pour cent des poulets vaccinés ne présentent aucune lésion ou ne présentent que des lésions minimales dans l'intestin (par exemple, moyenne des notes de lésion au maximum de 1) et à aucun poulet n'est attribuée une note de lésion égale à 4 ;
- pour les épreuves avec *E. tenella, E. acervulina, E. necatrix, E. maxima, E. brunetti, E. mitis,* ou *E. praecox*, le taux de croissance chez les poulets vaccinés est supérieur, de façon significative, à celui des témoins.

2-4. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-4-1. **Essai du taux de sporulation et dénombrement des oocystes en cours de production**. Un échantillon de chaque vrac d'oocystes est examiné au microscope après l'étape de sporulation et avant le mélange pour déterminer le pourcentage d'oocystes sporulés et dénombrer les oocystes. Les valeurs obtenues se situent dans les limites dont on a démontré qu'elles permettent la préparation d'un vaccin satisfaisant.

2-4-2. **Essai d'activité effectué sur chaque lot pour chaque espèce d'*Eimeria* dans le vaccin**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'activité (section 3-7) sur chaque lot de vaccin si l'essai a été effectué en utilisant un ou plusieurs lots de vaccin présentant une activité minimale et contenant une teneur minimale en oocystes sporulés. Si l'essai n'est pas effectué, une méthode alternative validée est utilisée, les critères d'acceptation relatifs à chaque composant étant fixés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité.

2-4-3. **Absence d'agents étrangers**. La méthode de désinfection utilisée durant la préparation du produit final à partir de la récolte des oocystes peut être validée pour démontrer l'efficacité de l'inactivation de certains agents étrangers potentiels. Lorsque des données de validation pertinentes sont disponibles et dans les cas justifiés et autorisés, certains ou l'ensemble des essais indiqués sous Agents étrangers (section 3-4) peuvent être omis comme essais de routine sur chaque lot.

## 3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**

3-1-1. La présence d'oocystes coccidiens dans le lot de vaccin est confirmée par un examen microscopique.

3-1-2. L'essai d'activité (ou l'essai d'activité effectué sur chaque lot) sert à confirmer la présence d'oocystes de chacune des espèces d'*Eimeria* indiquées sur l'étiquette.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)* et satisfont à l'essai effectué avec un milieu sélectif de *Campylobacter* spp.

3-3. **Mycoplasmes**. Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes (*2.6.7*).

3-4. **Agents étrangers**. Effectuez les essais 1-6 du chapitre *2.6.25. Vaccins viraux vivants aviaires : recherche des agents étrangers dans les lots de produit final*. Les dispositions générales *a-d*, *g* et *h* sont également applicables. Le vaccin satisfait aux exigences de chacun de ces essais.

3-5. **Innocuité**. Utilisez au moins 10 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) et de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Les poulets doivent être éclos et élevés comme décrit dans la section 2-1 et n'avoir pas été traités par des coccidiostatiques. Administrez à chaque poulet, par une voie et une méthode recommandées, de préférence 10 doses de vaccin. Si le volume de 10 doses est trop important, administrer le volume le plus grand possible. Après la vaccination, placez les poulets dans des conditions appropriées en utilisant des enclos ou des cages avec des planchers pleins pour favoriser une réinfection par les oocystes. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 20 pour cent des poulets présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin. Le

Vaccins

vaccin satisfait à l'essai si aucun poulet ne présente de signe clinique notable de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Dénombrement des oocystes sporulés**. La teneur en oocystes sporulés par dose est déterminée au microscope en comptant les oocystes sporulés dans une cellule de comptage appropriée. Les teneurs ne sont pas inférieures à la teneur minimale et ne sont pas supérieures à la teneur maximale en oocystes sporulés indiquées sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-4) en utilisant 1 dose de vaccin administrée par une voie recommandée.

4. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique le nombre minimal et le nombre maximal d'oocystes sporulés par dose.

**01/2008:1951**

# VACCIN VIVANT DE L'ADÉNOVIROSE CANINE

## Vaccinum adenovirosidis caninae vivum

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de l'adénovirose canine est une préparation d'une ou plusieurs souches appropriée(s) de l'adénovirus canin 2. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des chiens contre l'hépatite canine contagieuse (maladie de Rubarth) ou contre la maladie respiratoire due à l'adénovirus canin.

2. PRODUCTION

2-1. *PREPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des chiens auxquels le vaccin est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1), Augmentation de la virulence (section 2-3-2) et Pouvoir immunogène (section 2-3-3) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et le pouvoir immunogène.

2-3-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies d'administration recommandées pour la vaccination. Utilisez le virus au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin.

2-3-1-1. *Innocuité générale*. Pour chaque essai, utilisez au minimum 5 chiens de l'âge minimal recommandé pour la vaccination, exempts d'anticorps dirigés contre l'adénovirus canin. Administrez à chaque chien une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun chien ne présente de réaction anormale, locale ou générale, de signes de maladie ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal.

2-3-1-2. *Innocuité chez la chienne gestante*. Si le vaccin est destiné aux chiennes gestantes ou peut leur être administré, utilisez au minimum 5 chiennes au stade de gestation recommandé ou à plusieurs stades selon le schéma recommandé. Administrez à chaque chienne une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin. Observez les chiennes au moins une fois par jour jusqu'à un jour après la mise bas.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucune chienne ne présente de réaction anormale, locale ou générale, de signes de maladie ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal et si aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-3-2. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin, à 2 chiens âgés de 5-7 semaines et exempts d'anticorps dirigés contre l'adénovirus canin, puis à effectuer des passages successifs, 5 si possible, sur d'autres groupes similaires et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Si les propriétés du virus vaccinal permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon, effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents.

Administrez à chaque chien par une voie recommandée une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après. Choisissez, parmi les voies d'administration recommandées, celle réputée la plus favorable au retour à la virulence. Après 4-6 jours, préparez une suspension des muqueuses nasale et pharyngienne, des amygdales, des poumons et si l'on peut s'attendre à ce qu'ils contiennent du virus, du foie et des reins de chaque chien. Mélangez ces suspensions et administrez par une voie appropriée – par exemple, la voie intranasale - 1 mL du mélange à 2 autres chiens du même âge. Procédez ainsi à 5 passages au minimum, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages.

Effectuez l'essai d'innocuité (section 2-3-1) au moyen du virus vaccinal avant passage et du virus au niveau de passage maximal où le réisolement a été possible.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal ou si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde séries.

2-3-3. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des chiens de l'âge minimal recommandé. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque chien n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

2-3-3-1. *Vaccins indiqués pour la protection contre l'hépatite*. Utilisez au moins 7 chiens exempts d'anticorps dirigés contre l'adénovirus canin. Administrez le virus vaccinal à au moins 5 chiens selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 2 autres comme témoins. Après 21 jours, soumettez tous les chiens à une épreuve virulente en leur administrant par voie intraveineuse une quantité suffisante de suspension d'une forme virulente de l'adénovirus canin 1 (virus de l'hépatite canine contagieuse). Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 21 jours à compter de l'épreuve. Les chiens qui présentent des signes typiques d'une infection sérieuse par l'adénovirus canin sont euthanasiés afin d'éviter toute souffrance inutile.

Vaccins

L'essai n'est pas valable si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, moins de 100 pour cent des chiens témoins meurent ou présentent des signes notables de l'adénovirose canine. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, tous les chiens vaccinés survivent sans présenter de signes de maladie sauf, éventuellement, une élévation passagère de la température rectale.

2-3-3-2. *Vaccins indiqués pour la protection contre les signes respiratoires*. Utilisez au moins 20 chiens exempts d'anticorps dirigés contre l'adénovirus canin. Administrez le virus vaccinal à au moins 10 chiens selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 10 autres comme témoins. Après 21 jours, soumettez tous les chiens à une épreuve virulente en leur administrant par voie intranasale une quantité de suspension d'une forme virulente de l'adénovirus canin 2, suffisante pour provoquer des signes typiques de maladie respiratoire chez un chien exempt d'anticorps dirigés contre l'adénovirus canin. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 10 jours à compter de l'épreuve. Notez l'incidence de signes respiratoires et de maladie générale (par exemple, éternuements, toux, écoulement nasal ou oculaire). Pratiquez des écouvillonnages ou des lavages de la cavité nasale aux jours 2 à 10 suivant l'épreuve et examinez ces échantillons pour déterminer la présence et le titre du virus excrété.

Le vaccin satisfait à l'essai s'il y a une diminution notable dans l'incidence et la sévérité des signes et dans l'excrétion virale chez les chiens vaccinés par rapport aux témoins.

3. ESSAIS EFFECTUES SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le vaccin mélangé avec un immunosérum monospécifique dirigé contre l'adénovirus canin 2 n'est plus en mesure d'infecter des cultures cellulaires sensibles.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes** (*2.6.7*). Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes.

3-4. **Agents étrangers**. Neutralisez le virus vaccinal à l'aide d'un immunosérum monospécifique approprié dirigé contre l'adénovirus canin 2 et inoculez le mélange à des cultures cellulaires sensibles aux virus pathogènes pour le chien. Effectuez un passage après 6-8 jours et maintenez les cultures pendant un total de 14 jours. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne se produit pas d'effet cytopathogène et s'il n'est observé aucun signe de la présence d'agents hémadsorbants.

3-5. **Innocuité**. Utilisez 2 chiens ayant au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination, exempts d'anticorps dirigés contre les adénovirus canins. Administrez à chaque chien par une voie recommandée 10 doses de vaccin. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun chien ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des cultures cellulaires appropriées. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans une dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'un ou des 2 essais prescrits sous Pouvoir immunogène (section 2-3-3) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.



01/2008:1068

# VACCIN VIVANT DE LA LARYNGOTRACHÉITE INFECTIEUSE AVIAIRE

## Vaccinum laryngotracheitidis infectivae aviariae vivum

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de la laryngotrachéite infectieuse aviaire est une préparation d'une souche appropriée du virus de la laryngotrachéite infectieuse aviaire (herpèsvirus de gallidés 1). Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des poulets.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poules embryonnés ou en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Oeufs de poules embryonnés**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poules embryonnés, ils proviennent d'élevages exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*).

2-2-2. **Cultures cellulaires**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des cultures cellulaires, elles sont conformes aux spécifications pour les cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *LOTS DE SEMENCE*

2-3-1. **Agents étrangers**. Le lot de semence primaire satisfait à l'essai des agents étrangers dans les lots de semence (*2.6.24*). Lors de ces essais sur lot de semence primaire, utilisez des organismes n'ayant pas subi, en début d'essai, plus de 5 passages depuis le lot de semence primaire.

2-4. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des poulets auxquels le vaccin est destiné.
Les essais décrits ci-après sous Indice de virulence respiratoire (section 2-4-1), Innocuité (section 2-4-2), Augmentation de la virulence (section 2-4-3) et Pouvoir immunogène (section 2-4-4) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et le pouvoir immunogène.

2-4-1. **Indice de virulence respiratoire**. Utilisez au minimum 60 poulets âgés de 10 jours, provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Répartissez-les au hasard en 3 groupes, et maintenez les groupes séparés. Préparez une série de 2 dilutions au 1/10 à partir d'une suspension du virus vaccinal ayant un titre de $10^5$ $DIO_{50}$ ou $10^5$ $DICC_{50}$ par 0,2 mL ou, si cela n'est pas possible, ayant le titre maximal réalisable. Utilisez le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué qui sera présent dans un lot de vaccin. Attribuez respectivement à chacun des 3 groupes la suspension non diluée et les 2 dilutions. Administrez à chaque poulet, par voie intratrachéale, 0,2 mL de la suspension attribuée à son groupe, puis placez les poulets en observation pendant 10 jours. Notez le nombre de morts. L'indice de virulence respiratoire est défini comme le nombre total de morts dans les 3 groupes divisé par le nombre total de poulets. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si son indice de virulence respiratoire n'est pas supérieur à 0,33.

2-4-2. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies d'administration et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Utilisez le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin. Pour chaque essai, utilisez au

minimum 20 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez à chaque poulet une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans 1 dose de vaccin. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 10 pour cent des oiseaux meurent de causes non attribuables au virus vaccinal. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun des poulets ne présente de signes cliniques notables de la laryngotrachéite infectieuse aviaire ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal.

2-4-3. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin, à un groupe de 5 poulets âgés d'au plus 2 semaines et issus d'un élevage EOPS (*5.2.2*), puis à effectuer des passages successifs, 5 si possible, sur d'autres groupes similaires et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Si les propriétés du virus vaccinal permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon, effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents. Administrez par instillation oculaire une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après. Après la période qui s'est avérée correspondre à une réplication maximale du virus, préparez pour chaque poulet une suspension de prélèvements de la muqueuse des parties appropriées de l'appareil respiratoire. Mélangez ces suspensions et administrez par instillation oculaire 0,05 mL du mélange à 5 autres poulets âgés d'au plus 2 semaines et issus d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Procédez ainsi à 5 passages au minimum, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages. Déterminez l'indice de virulence respiratoire (section 2-4-1) au moyen du virus avant passage et du virus au niveau de passage maximal où le réisolement a été possible ; si le titre du virus réisolé au niveau maximal de passage est inférieur à $10^5$ $DIO_{50}$ ou $10^5$ $DICC_{50}$, préparez les dilutions au 1/10 en série à partir du titre maximal disponible. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal, ou si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde série.

2-4-4. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies d'administration et des méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque poulet n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette, et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin. Utilisez au moins 30 poulets de même origine et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez le virus vaccinal par l'une des voies recommandées au moins à 20 de ces poulets et gardez-en au minimum 10 autres comme témoins. Après 21 jours, soumettez tous les poulets à une épreuve virulente en leur administrant par voie intratrachéale une quantité suffisante d'une forme virulente du virus de la laryngotrachéite infectieuse aviaire. Observez-les au moins 1 fois par jour pendant 7 jours à compter de l'épreuve. Notez les morts et le nombre de poulets survivants qui présentent des signes cliniques de la laryngotrachéite infectieuse aviaire. A la fin de la période d'observation, euthanasiez tous les poulets survivants et procédez à une recherche des lésions macroscopiques caractéristiques : inflammation mucoïde, hémorragique et pseudomembranaire de la trachée et des sinus orbitaux. L'essai n'est pas valable si :

– au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, moins de 90 pour cent des poulets témoins meurent ou présentent des signes cliniques sévères de la laryngotrachéite infectieuse aviaire ou des lésions macroscopiques de la trachée et des sinus orbitaux,
– ou dans l'intervalle de temps séparant la vaccination de l'épreuve, plus de 10 pour cent des poulets témoins ou vaccinés présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, au moins 90 pour cent des poulets vaccinés survivent sans présenter de signes cliniques notables et/ou de lésions macroscopiques caractéristiques de la trachée et des sinus orbitaux.

## 3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Mélangez le vaccin, dilué si nécessaire, à un immunosérum monospécifique du virus de la laryngotrachéite infectieuse aviaire : le vaccin n'exerce plus de pouvoir infectieux lorsqu'il est inoculé à des oeufs de poules embryonnés provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) ou à des cultures cellulaires sensibles (*5.2.4*).

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**

Les vaccins pour administration par injection satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

Les vaccins qui ne sont pas pour administration par injection satisfont soit à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)* soit à l'essai suivant : effectuez le contrôle de la contamination bactérienne et fongique par une technique quantitative ; effectuez des essais pour identifier les microorganismes retrouvés dans le vaccin ; le vaccin ne contient pas de microorganisme pathogène et contient au maximum 1 microorganisme non pathogène par dose.

Tout liquide fourni avec le vaccin satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes**. Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes (*2.6.7*).

3-4. **Agents étrangers**. Le vaccin satisfait aux essais des agents étrangers dans les lots de produit fini (*2.6.25*).

3-5. **Innocuité**. Utilisez au minimum 10 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*), de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Administrez à chaque poulet, par instillation oculaire, 10 doses de vaccin. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 20 pour cent des poulets présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des poulets ne présente de signes cliniques notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des oeufs de poules embryonnés provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) ou à des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*). Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans 1 dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-4-4) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées, et selon le schéma recommandé. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.

**01/2008:0745**
**corrigé 6.0**

# VACCIN VIVANT DE LA MALADIE D'AUJESZKY POUR LE PORC POUR ADMINISTRATION PARENTÉRALE

## Vaccinum morbi Aujeszkyi ad suem vivum ad usum parenteralem

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de la maladie d'Aujeszky pour le porc pour administration parentérale est une préparation d'une souche appropriée du virus de la maladie d'Aujeszky. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des porcs et à la protection passive de leur progéniture contre la maladie d'Aujeszky. Le vaccin peut être administré après avoir été mélangé à un adjuvant.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poule embryonnés ou en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Oeufs de poule embryonnés**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poule embryonnés, ils proviennent d'élevages exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*).

2-2-2. **Cultures cellulaires**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des cultures cellulaires, elles satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des porcs auxquels le vaccin est destiné. Le virus peut avoir un marqueur génétique.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1.), Excrétion virale (section 2-3-2.), Transmissibilité, y compris la transmission à travers le placenta et par le sperme (section 2-3-3.), Augmentation de la virulence (section 2-3-4.) et Pouvoir immunogène (section 2-3-5.) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**

2-3-1-1. *Innocuité générale*. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination, en utilisant dans chaque cas des porcelets âgés de 3-4 semaines. Utilisez le virus au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin.

Pour chaque essai, utilisez au minimum 20 porcelets exempts d'anticorps dirigés contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky. Administrez à au moins 10 porcelets une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin et gardez-en au minimum 10 autres comme témoins. Observez les porcelets au moins une fois par jour pendant 21 jours.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si la courbe pondérale des porcelets vaccinés ne diffère pas de manière significative de celle des témoins et si aucun porcelet ne présente de signes de maladie ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal.

2-3-1-2. *Innocuité chez les porcs utilisés dans les essais 2-3-5 du pouvoir immunogène*. Les porcs utilisés dans les essais du pouvoir immunogène sont également utilisés pour évaluer l'innocuité. Relevez la température rectale de chaque porc vacciné au moment de la vaccination puis 6 h, 24 h et 48 h plus tard. Recherchez la présence de réactions locales au site d'injection lors de l'abattage.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun porc ne présente :

- une élévation de température supérieure à 1,5 °C et le nombre de porcs qui présentent une température supérieure à 41 °C ne dépasse pas 10 pour cent du groupe ;
- aucune autre réaction générale (par exemple, anorexie) ;
- aucune réaction locale anormale attribuable au virus vaccinal.

2-3-1-3. *Innocuité lors des essais sur le terrain*.

Les porcs utilisés pour les essais sur le terrain servent également à évaluer l'innocuité. Effectuez un essai pour chaque catégorie de porcs auxquels le vaccin est destiné (truies, porcs charcutiers). Utilisez au minimum 3 groupes d'au moins 20 porcs avec des groupes correspondants d'au moins 10 témoins. Relevez la température rectale de chaque porc vacciné au moment de la vaccination puis 6 h, 24 h et 48 h plus tard. Recherchez la présence de réactions locales au site d'injection lors de l'abattage.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun porc ne présente :

- une élévation de température supérieure à 1,5 °C et le nombre de porcs qui présentent une température supérieure à 41 °C ne dépasse pas 25 pour cent du groupe ;
- aucune réaction locale anormale attribuable au virus vaccinal.

2-3-1-4. *Innocuité neurologique*. Utilisez au moins 10 porcelets âgés de 3-5 jours, exempts d'anticorps dirigés contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky. Administrez à chaque porcelet par voie intranasale une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin. Observez les porcelets au moins une fois par jour pendant 21 jours.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun des porcelets ne meurt ni ne présente de signes nerveux attribuables au virus vaccinal.

2-3-1-5. *Innocuité neurologique des souches autres que gE-négatives*. Cet essai n'est pas nécessaire dans le cas des souches gE-négatives. Administrez à au moins 5 porcelets âgés de 3-5 jours, par voie intracérébrale, $10^{4,5}$ $CCID_{50}$ de virus vaccinal.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun des porcelets ne meurt ni ne présente de signes nerveux.

2-3-1-6. *Absence d'infections latentes*. Utilisez au moins 10 porcelets âgés de 3-4 semaines et exempts d'anticorps dirigés contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky. Administrez à chaque porcelet une injection journalière de 2 mg de prednisolone par kilogramme de masse corporelle pendant 5 jours consécutifs. Au 3$^{e}$ jour, administrez une quantité de virus vaccinal au moins équivalente au titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin à chaque porcelet par une voie recommandée. Des agents antimicrobiens peuvent être administrés pour éviter des signes non spécifiques. Observez les porcelets au moins une fois par jour pendant 21 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun porcelet ne présente de signes de maladie ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal.

2-3-1-7. *Innocuité chez la truie gravide et absence de transmission à travers le placenta*. Utilisez au moins 15 truies gravides exemptes d'anticorps dirigés contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky. Administrez à au moins 5 truies par une voie recommandée une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin pendant la 4$^{e}$ ou la 5$^{e}$ semaine de la gestation. Administrez à au moins 5 autres truies la même quantité de virus par la même voie pendant la 10$^{e}$ ou la 11$^{e}$ semaine de la gestation et gardez-en au minimum 5 autres comme témoins. Chez les porcelets nés des



Vaccins

truies vaccinées : effectuez des essais d'anticorps contre le virus de la maladie d'Aujeszky ; effectuez des essais d'antigène du virus de la maladie d'Aujeszky dans le foie et les poumons de ceux qui présentent des anomalies et sur un quart des porcelets sains.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si :

– par rapport aux témoins, la durée de gestation des truies vaccinées, le nombre de porcelets nés des truies vaccinées et l'incidence d'anomalies chez les porcelets ne diffèrent pas de manière significative ;
– aucun antigène du virus de la maladie d'Aujeszky n'est retrouvé chez les porcelets nés des truies vaccinées ;
– aucun anticorps contre le virus de la maladie d'Aujeszky n'est détecté dans leur sérum prélevé avant la tétée du colostrum.

2-3-2. **Excrétion virale**. Utilisez au moins 18 porcs, âgés de 3-4 semaines et exempts d'anticorps dirigés contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky. Administrez à au moins 14 porcs une quantité de virus vaccinal au moins équivalente au titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin par une voie et un site recommandés et gardez-en au moins 4 autres comme témoins de contact. Effectuez des recherches de sensibilité appropriée sur les sécrétions nasales et orales de chaque porc pour détecter le virus ; effectuez des écouvillonnages oraux et de la cavité nasale journellement jusqu'à 10 jours après la vaccination.

Le vaccin satisfait à l'essai si le virus n'est pas isolé à partir des sécrétions.

2-3-3. **Transmissibilité**. Effectuez l'essai 4 fois. Chaque fois, administrez à au moins 4 porcelets âgés de 3-4 semaines et exempts d'anticorps dirigés contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky, par une voie recommandée, une quantité de virus vaccinal au moins équivalente au titre maximal susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin. Après un jour, mettez au minimum 2 autres porcelets du même âge et exempts d'anticorps dirigés contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky en contact proche avec les porcelets vaccinés. Après 5 semaines, effectuez une recherche d'anticorps dirigés contre le virus de la maladie d'Aujeszky sur tous les porcelets.

L'essai n'est pas valable si un porcelet vacciné ne présente pas de réponse en anticorps. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si des anticorps dirigés contre le virus de la maladie d'Aujeszky ne sont pas détectés chez un groupe de témoins de contact et si tous les porcelets vaccinés présentent des anticorps.

2-3-4. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin, à 2 porcelets âgés de 3-5 jours, exempts d'anticorps dirigés contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky, puis à effectuer des passages successifs, 5 si possible, sur d'autres groupes similaires et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents.

Administrez à chaque porcelet par voie intranasale une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après. Après 3-5 jours, préparez une suspension de cerveau, de poumon, d'amygdales et de glandes lymphatiques de chaque porcelet. Mélangez ces suspensions et administrez 1 mL du mélange par voie intranasale à 2 autres porcelets de même âge. Procédez ainsi à 5 passages au minimum, le dernier passage étant effectué sur au moins 5 porcelets, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun porcelet ne meurt ni ne présente de troubles neurologiques attribuables au virus vaccinal et si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal. Le virus vaccinal satisfait aussi à l'essai si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde séries.

2-3-5. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque porc n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

2-3-5-1. *Vaccins destinés à l'immunisation active*. Utilisez au moins 15 porcs charcutiers de l'âge recommandé et exempts d'anticorps dirigés contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky. La masse corporelle d'aucun porc ne s'écarte de la moyenne du groupe de plus de 20 pour cent. Administrez le virus vaccinal à au moins 10 porcs, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 5 autres comme témoins. A la fin de la période d'engraissement (80-90 kg), pesez et soumettez tous les porcs à une épreuve virulente en leur administrant par voie intranasale une quantité suffisante d'une forme virulente du virus de la maladie d'Aujeszky (une épreuve au moyen d'au moins $10^6$ $DICC_{50}$, dans au moins 4 mL de diluant, d'une souche virulente ayant subi 3 passages au maximum s'est avérée appropriée). Déterminez le titre en virus dans des écouvillonnages de la cavité nasale de chaque porc journellement à partir du jour avant l'épreuve et jusqu'à ce que le virus ne soit plus décelé. 7 jours après l'épreuve virulente ou au moment de la mort si celle-ci survient plus tôt, pesez chaque porc et calculez le gain moyen quotidien pour cent. Calculez la moyenne des gains moyens quotidiens pour le groupe des porcs vaccinés et pour celui des porcs témoins.

L'essai n'est valable que si tous les porcs témoins présentent des signes de la maladie d'Aujeszky et la moyenne de leurs gains moyens quotidiens est inférieure à – 0,5 kg. Le vaccin satisfait à l'essai si :

– tous les porcs vaccinés survivent et la différence entre les moyennes des gains moyens quotidiens des 2 groupes est d'au moins 1,5 kg,
– la moyenne géométrique des titres et la durée d'excrétion du virus d'épreuve sont réduites de façon significative chez les porcs vaccinés par rapport aux porcs témoins.

2-3-5-2. *Vaccins destinés à la protection passive*. Si le vaccin est recommandé pour la protection passive des porcelets par vaccination de la truie, la conformité de la souche à cette fin peut être démontrée par l'essai suivant.

Utilisez au moins 12 truies exemptes d'anticorps dirigés contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky. Administrez le virus vaccinal à au moins 8 truies, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 4 autres comme témoins. A l'âge de 6-10 jours, soumettez les porcelets issus des truies à une épreuve virulente en leur administrant une quantité suffisante d'une forme virulente du virus de la maladie d'Aujeszky. Observez les porcelets au moins une fois par jour pendant 21 jours.

L'essai n'est valable que si le nombre moyen de porcelets par portée est d'au moins 6.

Le vaccin satisfait à l'essai s'il produit un taux de protection contre la mortalité d'au minimum 80 pour cent chez les porcelets issus des truies vaccinées par comparaison avec les porcelets témoins.

2-4. *ESSAIS DU FABRICANT*

2-4-1. **Activité du lot**. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'Activité (section 3-7) pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette. L'essai décrit sous Activité est effectué, pour un vaccin donné, une ou plusieurs fois, selon les modalités décidées

par ou avec l'accord de l'Autorité compétente. Lorsque cet essai n'est pas effectué, une méthode alternative validée est utilisée, les critères d'acceptation étant déterminés par rapport à un lot de vaccin qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Administré à des animaux exempts d'anticorps dirigés contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky, le vaccin suscite la formation d'anticorps spécifiques neutralisants.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes** (*2.6.7*). Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes.

3-4. **Agents étrangers**. Neutralisez le virus vaccinal à l'aide d'un immunosérum monospécifique approprié ou d'anticorps monoclonaux dirigés contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky et inoculez le mélange à des cultures cellulaires sensibles aux virus pathogènes pour le porc et aux pestivirus. Effectuez au moins un passage et maintenez les cultures pendant 14 jours. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne se produit pas d'effet cytopathogène et s'il n'est observé aucun signe de la présence d'agents hémadsorbants. Effectuez un essai spécifique des pestivirus.

3-5. **Innocuité**. Utilisez 2 porcs de l'âge minimal recommandé pour la vaccination, exempts d'anticorps dirigés contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky. Administrez à chaque porc par une voie recommandée 10 doses de vaccin. Observez les porcs au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des porcs ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal sur le même substrat que celui utilisé pour la production (cultures cellulaires ou inoculation dans la cavité allantoïdienne d'oeufs de poule embryonnés). Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans une dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai décrit ci-après lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées.

Utilisez au moins 10 porcs pesant de 15-35 kg, exempts d'anticorps dirigés contre le virus ou contre une fraction du virus de la maladie d'Aujeszky. La masse corporelle d'aucun porc ne s'écarte de la moyenne du groupe de plus de 25 pour cent. Administrez une dose de vaccin à au moins 5 porcs et gardez-en au minimum 5 autres comme témoins. Après 3 semaines, pesez tous les porcs, puis soumettez-les à une épreuve virulente en leur administrant par voie intranasale une quantité suffisante d'une forme virulente du virus de la maladie d'Aujeszky. 7 jours après l'épreuve virulente ou au moment de la mort si celle-ci survient plus tôt, pesez chaque porc et calculez le gain moyen quotidien pour cent. Calculez la moyenne des gains moyens quotidiens pour le groupe des porcs vaccinés et celui des porcs témoins.

L'essai n'est valable que si tous les porcs témoins présentent des signes de la maladie d'Aujeszky et si la moyenne de leurs gains moyens quotidiens est inférieure à – 0,5 kg. Le vaccin satisfait à l'essai si tous les porcs vaccinés survivent et la différence entre les moyennes des gains moyens quotidiens des 2 groupes est d'au moins 1,6 kg.

4. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique le substrat utilisé pour la production du vaccin (cultures cellulaires ou oeufs).

**01/2008:0448**
**corrigé 6.0**

# VACCIN VIVANT DE LA MALADIE DE CARRÉ POUR LE CHIEN

## Vaccinum morbi Carrei vivum ad canem

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de la maladie de Carré pour le chien est une préparation d'une souche appropriée du virus de la maladie de Carré. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des chiens contre la maladie de Carré.

2. PRODUCTION

2-1. *PREPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poule embryonnés ou en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Oeufs de poule embryonnés**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poule embryonnés, ils proviennent d'élevages exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*).

2-2-2. **Cultures cellulaires**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des cultures cellulaires, elles satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des chiens auxquels le vaccin est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1), Augmentation de la virulence (section 2-3-2) et Pouvoir immunogène (section 2-3-3) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination. Utilisez le virus au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin.

2-3-1-1. *Innocuité générale*. Pour chaque essai, utilisez au minimum 5 chiens de l'âge minimal recommandé pour la vaccination, exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Carré. Administrez à chaque chien une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 42 jours.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun chien ne présente de réaction anormale, locale ou générale, de signes de maladie ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal.

2-3-1-2. *Innocuité chez la chienne gestante*. Si le vaccin est destiné aux chiennes gestantes, utilisez au minimum 5 chiennes au stade de gestation recommandé ou à plusieurs stades selon le schéma recommandé. Administrez à chaque chienne une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin. Observez les chiennes au moins une fois par jour jusqu'à un jour après la mise bas.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucune chienne ne présente de réaction anormale, locale ou gnérale, de signes de maladie ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal et si aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-3-2. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin, à 2 chiens âgés de 5-7 semaines et exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Carré, puis à effectuer des passages successifs, 5 si possible, sur d'autres groupes similaires et à rechercher le virus récupéré

après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Si les propriétés du virus vaccinal permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon, effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents.

Administrez à chaque chien par une voie recommandée une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après. Choisissez, parmi les voies d'administration recommandées, celle réputée la plus favorable au retour à la virulence. Après 5-10 jours, préparez une suspension de la muqueuse nasale, des amygdales, du thymus, de la rate et des poumons et de leurs ganglions lymphatiques voisins, de chaque chien. Mélangez ces suspensions et administrez par voie oronasale 1 mL du mélange à 2 autres chiens du même âge. Procédez ainsi à 5 passages au minimum, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages.

Effectuez l'essai d'innocuité (section 2-3-1) au moyen du virus vaccinal avant passage et du virus au niveau de passage maximal où le réisolement a été possible.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal ou si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde séries.

2-3-3. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des chiens âgés de 8-16 semaines. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque chien n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

Utilisez au moins 7 chiens exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Carré. Administrez le virus vaccinal à au moins 5 chiens, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 2 autres comme témoins. Après 21 jours, soumettez tous les chiens à une épreuve virulente en leur administrant par voie intraveineuse une quantité suffisante de suspension d'une forme virulente du virus de la maladie de Carré. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 21 jours à compter de l'épreuve. Les chiens qui présentent des signes typiques de la maladie de Carré sont euthanasiés afin d'éviter toute souffrance inutile.

L'essai n'est pas valable si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, moins de 100 pour cent des chiens témoins meurent ou présentent des signes notables de la maladie de Carré. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, tous les chiens vaccinés survivent sans présenter de signes de maladie.

3. ESSAIS A EFFECTUER SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le vaccin mélangé à un immunosérum monospécifique de la maladie de Carré ne provoque plus d'effets cytopathogènes sur des cultures cellulaires sensibles.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes** (*2.6.7*). Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes.

3-4. **Agents étrangers**. Neutralisez le virus vaccinal à l'aide d'un immunosérum monospécifique approprié dirigé contre le virus de la maladie de Carré et inoculez le mélange à des cultures cellulaires sensibles aux virus pathogènes pour le chien. Effectuez un passage après 6-8 jours et maintenez les cultures pendant 14 jours. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne se produit pas d'effet cytopathogène et s'il n'est observé aucun signe de la présence d'agents hémadsorbants.

3-5. **Innocuité**. Utilisez 2 chiens de l'âge minimal recommandé pour la vaccination, exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Carré. Administrez à chaque chien par une voie recommandée 10 doses de vaccin. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun chien ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des cultures cellulaires appropriées. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans une dose n'est pas inférieur à la valeur indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-3) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.

**01/2008:0449**
**corrigé 6.0**

# VACCIN VIVANT DE LA MALADIE DE CARRÉ POUR MUSTÉLIDÉS

## Vaccinum morbi Carrei vivum ad mustelidas

1. DEFINITION

Le vaccin vivant de la maladie de Carré pour mustélidés est une préparation d'une souche atténuée appropriée pour le furet du virus de la maladie de Carré. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des furets contre l'infection par le virus de la maladie de Carré.

2. PRODUCTION

2-1. *PREPARATION DU VACCIN*
Le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poule embryonnés ou en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Oeufs de poule embryonnés**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poule embryonnés, ils proviennent d'un élevage sain.

2-2-2. **Cultures cellulaires**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des cultures cellulaires, elles satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*
Il doit être démontré que le virus vaccinal est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des furets auxquels le vaccin est destiné.
Les essais décrits ci-après sous Atténuation (section 2-3-1) et Pouvoir immunogène (section 2-3-2) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Atténuation**. Un volume d'une suspension virale, correspondant à 5 doses de vaccin, injecté par voie intramusculaire à chacun de 2 furets exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Carré ne produit pas d'altération pathologique dans un délai de 21 jours.

2-3-2. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des furets de l'âge minimal recommandé. La quantité de virus vaccinal administrée

Vaccins

à chaque furet n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

Utilisez au moins 7 furets exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Carré. Administrez le virus vaccinal à au moins 5 furets, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 2 autres comme témoins. Après 21 jours, soumettez tous les furets à une épreuve virulente en leur administrant par voie intramusculaire une quantité d'une forme virulente de la maladie de Carré suffisante pour provoquer la mort de chaque furet. Observez les furets au moins une fois par jour pendant 21 jours à compter de l'épreuve. Les furets qui présentent des signes typiques de la maladie de Carré sont euthanasiés afin d'éviter toute souffrance inutile.

L'essai n'est pas valable si 1 ou les 2 furets témoins ne meurent pas de la maladie de Carré. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si les furets vaccinés restent en bonne santé.

3. ESSAIS EFFECTUES SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le vaccin mélangé à un immunosérum spécifique de la maladie de Carré ne provoque plus d'effets cytopathogènes sur des cultures cellulaires sensibles, ni de lésions sur les membranes chorio-allantoïdiennes d'oeufs de poules embryonnés âgés de 9-11 jours.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062).*

3-3. **Mycoplasmes** (*2.6.7*). Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes.

3-4. **Agents étrangers**. Neutralisez le virus vaccinal à l'aide d'un immunosérum monospécifique approprié dirigé contre le virus de la maladie de Carré et inoculez le mélange à des cultures cellulaires sensibles. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne se produit pas d'effet cytopathogène et s'il n'est observé aucun signe de la présence d'agents hémagglutinants et hémadsorbants.

3-5. **Innocuité**. Utilisez 2 furets exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Carré. Administrez à chaque furet par une voie recommandée 2 doses de vaccin. Observez les furets au moins une fois par jour pendant 21 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des furets ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des cultures cellulaires appropriées ou dans des oeufs de poules embryonnés âgés de 9 à 11 jours. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans une dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-2) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.

**01/2008:0589**

# VACCIN VIVANT DE LA MALADIE DE MAREK

## Vaccinum morbi Marek vivum

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de la maladie de Marek est une préparation d'une ou de plusieurs souches appropriées du virus de la maladie de Marek (herpèsvirus des gallidés 2 ou 3) et/ou de l'herpèsvirus du dindon (herpèsvirus 1 des méléagridés). Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des poulets et/ou des embryons de poulet.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires. Si le vaccin contient plusieurs types viraux, ceux-ci sont multipliés séparément. Le vaccin peut être cryodesséché ou conservé dans de l'azote liquide.

*2-2 SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation de vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *LOTS DE SEMENCE*

2-3-1. **Agents étrangers**. Le lot de semence primaire satisfait à l'essai des agents étrangers dans les lots de semence (*2.6.24*). Lors de ces essais sur lot de semence primaire, utilisez des organismes n'ayant pas subi, en début d'essai, plus de 5 passages depuis le lot de semence primaire.

2-4. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des poulets et/ou des embryons de poulet auxquels le vaccin est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Pathogénicité résiduelle de la souche (section 2-4-1), Augmentation de la virulence (section 2-4-2) et Pouvoir immunogène (section 2-4-3) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et le pouvoir immunogène. Des essais supplémentaires peuvent être nécessaires pour établir l'innocuité sur des races de poulets connues pour leur sensibilité particulière au virus de la Maladie de Marek, à l'exception des races pour lesquelles le vaccin est contre-indiqué.

2-4-1. **Pathogénicité résiduelle de la souche**. Effectuez l'essai en utilisant, parmi les voies d'administration recommandées, celle réputée la plus défavorable du point de vue de l'innocuité et, parmi les catégories de poulets auxquelles le vaccin est destiné, celle réputée la plus sensible à la maladie de Marek. Effectuez l'essai sur des poulets lorsque le vaccin est destiné aux poulets ; effectuez l'essai sur des oeufs embryonnés lorsque le vaccin est destiné à des embryons de poulets ; effectuez l'essai sur des poulets et des oeufs embryonnés lorsque le vaccin est destiné aux deux. Utilisez le virus au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin.

*Vaccins destinés à des poulets.* Utilisez au minimum 80 poulets, âgés de 1 jour, provenant d'un élevage exempt de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*). Répartissez-les au hasard en 2 groupes d'au moins 40 poulets, et maintenez les groupes séparés. Administrez à chaque poulet d'un groupe (I), par une voie appropriée, une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans 1 dose de vaccin. Administrez à chaque poulet de l'autre groupe (II), par une voie appropriée, une quantité d'une forme virulente du virus de la maladie de Marek suffisante pour entraîner la mort et/ou des lésions macroscopiques sévères chez au moins 70 pour cent du nombre effectif des poulets dans les 70 jours (nombre initial moins nombre de poulets morts dans les 7 premiers jours de l'essai).

*Vaccins destinés à des embryons de poulet.* Utilisez au minimum 150 oeufs embryonnés provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Répartissez-les au hasard en 3 groupes d'au moins 50 oeufs embryonnés, et maintenez les groupes séparés, mais dans des conditions d'incubation identiques. Administrez à chaque oeuf embryonné d'un groupe (I), par la méthode recommandée et au plus tard le jour recommandé pour la vaccination, une quantité de virus vaccinal équivalente à au moins 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans 1 dose de vaccin. Administrez à chaque oeuf embryonné d'un autre groupe (II), par une voie appropriée, une quantité d'une forme virulente du virus de la maladie de Marek suffisante

Vaccins

pour entraîner la mort et/ou des lésions macroscopiques sévères chez au moins 70 pour cent du nombre effectif des poussins éclos dans les 70 jours (nombre initial moins nombre de poulets morts dans les 7 jours suivant l'éclosion). Conservez le dernier groupe (III) non inoculé. L'essai n'est pas valable si une différence significative d'éclosabilité est observée entre les groupes I et III et si l'éclosabilité de l'un des 3 groupes est inférieure à 80 pour cent.

Un groupe témoin commun pour l'administration *in ovo* et l'administration parentérale peut être utilisé sous réserve que les poulets et les embryons de poulet proviennent du même élevage.

Que le vaccin ait été administré à des poulets ou à des embryons de poulet, observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 70 jours pour le groupe II et au moins 1 fois par jour pendant 120 jours pour le groupe I. L'essai n'est pas valable si une ou plusieurs des situations suivantes se présentent :

– plus de 10 pour cent des poulets de l'un des 3 groupes meurent dans les 7 premiers jours,
– moins de 70 pour cent du nombre effectif de poulets dans le groupe II présentent des lésions macroscopiques caractéristiques de la maladie de Marek.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si :

– aucun des poulets du groupe I ne présente de signes cliniques notables ou de lésions macroscopiques caractéristiques de la maladie de Marek ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal,
– à la fin de la période d'observation de 120 jours, le nombre de poulets survivants dans le groupe I n'est pas inférieur à 80 pour cent de l'effectif du groupe.

2-4-2. **Augmentation de la virulence**. L'essai d'augmentation de la virulence est nécessaire dans le cas du virus de la maladie de Marek, mais pas dans le cas de l'herpèsvirus du dindon qui est naturellement apathogène. Utilisez le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin.

*Vaccins destinés à des poulets.* A 5 poulets âgés de 1 jour, provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*), administrez par voie intramusculaire une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après.

*Vaccins destinés exclusivement à des embryons de poulet ou destinés à des poulets et des embryons de poulet.* A 5 oeufs embryonnés, administrez *in ovo*, selon la méthode recommandée, au plus tard le jour recommandé pour la vaccination, une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après.

5-7 jours après administration du vaccin à des poulets ou 5-7 jours après éclosion lorsque le vaccin a été administré *in ovo*, préparez une suspension de leucocytes de chaque poulet. Mélangez ces suspensions, et administrez le mélange par voie intrapéritonéale à 5 autres poulets âgés de 1 jour et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Procédez ainsi à au moins 5 passages, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages. Effectuez l'essai de pathogénicité résiduelle (section 2-4-1) au moyen du virus avant passage et du virus au niveau de passage maximal où le réisolement a été possible. Choisissez, parmi les voies d'administration recommandées, celle réputée la plus défavorable pour ces poulets ou embryons de poulet du point de vue de l'innocuité. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal, ou si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et la seconde série.

2-4-3. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies d'administration et des méthodes d'administration recommandées en utilisant dans chaque cas des poulets de l'âge minimal recommandé pour la vaccination ou des embryons de poulet. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque poulet ou embryon de poulet n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette, et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

*Vaccins destinés à des poulets.* Utilisez au moins 60 poulets de même origine et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez le virus vaccinal par l'une des voies recommandées au moins à 30 de ces poulets et gardez-en au minimum 30 autres comme témoins.

*Vaccins destinés à des embryons de poulet.* Utilisez des oeufs embryonnés de même origine et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Vaccinez *in ovo* 50 pour cent des oeufs embryonnés selon la méthode recommandée. Gardez 50 pour cent des oeufs embryonnés comme témoins. L'essai n'est valable que si chaque groupe est constitué d'au moins 30 poussins éclos.

Que le vaccin ait été administré à des poulets ou à des embryons de poulet, au plus tard 9 jours après la vaccination soumettez tous les poulets à une épreuve virulente en leur administrant par une voie appropriée une quantité suffisante d'une forme virulente du virus de la maladie de Marek. Observez tous les poulets au moins 1 fois par jour pendant 70 jours à compter de l'épreuve. Notez les morts et le nombre de poulets survivants qui présentent des signes cliniques de la maladie de Marek. A la fin de la période d'observation, euthanasiez tous les poulets survivants et procédez à un examen anatomopathologique pour rechercher des lésions macroscopiques caractéristiques de la maladie de Marek. L'essai n'est pas valable si :

– au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, moins de 70 pour cent des poulets témoins meurent ou présentent des signes cliniques sévères ou des lésions macroscopiques caractéristiques de la maladie de Marek,
– et/ou dans l'intervalle de temps séparant la vaccination de l'épreuve, plus de 10 pour cent des poulets témoins ou vaccinés présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si le taux de protection relatif calculé à l'aide de l'expression suivante est d'au moins 80 pour cent :

$$\frac{V - C}{100 - C} \times 100$$

$V$ = pourcentage des poulets vaccinés, soumis à l'épreuve virulente, qui survivent jusqu'à la fin de la période d'observation sans présenter ni signes cliniques notables, ni lésions macroscopiques de la maladie de Marek,

$C$ = pourcentage des poulets témoins, soumis à l'épreuve virulente, qui survivent jusqu'à la fin de la période d'observation sans présenter ni signes cliniques notables, ni lésions macroscopiques de la maladie de Marek.

## 3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Effectuez un essai par immunomarquage en cultures cellulaires à l'aide d'anticorps monoclonaux afin de démontrer la présence de chaque type de virus indiqué sur l'étiquette.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes**. Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes (*2.6.7*).

3-4. **Agents étrangers**. Le vaccin satisfait aux essais des agents étrangers dans les lots de produit fini (*2.6.25*).

3-5. **Innocuité**. Administrez à chaque poulet ou embryon de poulet, par une voie et une méthode recommandées, 10 doses de vaccin.

*Vaccins destinés à des poulets*. Utilisez au minimum 10 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*), qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination.

*Vaccins destinés exclusivement à des embryons de poulet, ou destinés à des poulets et des embryons de poulet*. Utilisez, au plus tard le jour recommandé pour la vaccination des embryons, des oeufs embryonnés provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). L'essai n'est pas valable si le groupe est constitué de moins de 10 poussins éclos et si l'éclosabilité est inférieure à 80 pour cent.

Que le vaccin ait été administré à des poulets ou à des embryons de poulet, observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 21 jours après la vaccination ou l'éclosion selon le cas. L'essai n'est pas valable si plus de 20 pour cent des poulets présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des poulets ne présente de signes cliniques notables ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**

3-6-1. *Vaccins contenant un seul type viral*. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*). Si le titre en virus est déterminé en unités formant plage (UFP), seules sont prises en considération les plages primaires. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans une dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-6-2. *Vaccins contenant plusieurs types viraux*. Si le vaccin contient plusieurs types viraux, titrez séparément chacun d'eux par inoculation à des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*). Effectuez la lecture par immunomarquage à l'aide d'anticorps. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en chaque virus vaccinal dans une dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait à l'essai du pouvoir immunogène (section 2-4-3) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées, et selon le schéma recommandé. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre minimal en virus indiqué sur l'étiquette.



**01/2008:1943**

# VACCIN VIVANT DE LA MYXOMATOSE POUR LE LAPIN

## Vaccinum myxomatosidis vivum ad cuniculum

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de la myxomatose pour le lapin est une préparation d'une souche appropriée du virus du myxome, atténué pour le lapin, ou bien une préparation d'une souche appropriée du virus du fibrome de Shope. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des lapins contre la myxomatose.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires. La suspension virale est récoltée, titrée et peut être mélangée à une solution stabilisante appropriée.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des bovins auxquels le vaccin est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1.), Augmentation de la virulence (section 2-3-2.) et Pouvoir immunogène (section 2-3-3.) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des lapins de l'âge minimal recommandé. Utilisez le virus au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin.

2-3-1-1. *Innocuité générale*. Pour chaque essai, utilisez au minimum 10 lapins exempts d'anticorps dirigés contre le virus du myxome. Administrez à chaque lapin une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin. Observez les lapins au moins une fois par jour pendant 28 jours. La température corporelle de chaque lapin est relevée le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination, 4 h plus tard, puis quotidiennement pendant 4 jours ; notez pour chaque lapin l'augmentation maximale de température.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun des lapins ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal ; l'élévation moyenne de la température n'excède pas 1 °C et aucun lapin ne présente une élévation de température supérieure à 2 °C. Une réaction locale qui dure moins de 28 jours peut se produire.

2-3-1-2. *Innocuité chez la lapine gestante*. Si le vaccin est recommandé pour les femelles gestantes, utilisez au minimum 10 lapines gestantes. Administrez à chaque lapine une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin selon le schéma recommandé indiqué. Observer les lapines au moins une fois par jour jusqu'à 1 jour après la mise bas.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si :

- les lapines restent en bonne santé ;
- aucune des lapines ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal ;
- aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-3-2. **Augmentation de la virulence**. (*Cet essai n'est effectué que pour les vaccins basés sur des souches atténuées du virus du myxome*). L'essai d'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin, à 2 lapins âgés de 5-7 semaines et exempts d'anticorps dirigés contre le virus du myxome, puis à effectuer des passages successifs, 5 si possible, sur d'autres groupes similaires et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Si les propriétés du virus vaccinal permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon, effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents.

Administrez à chaque lapin par une voie recommandée une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après. Choisissez parmi les voies d'administration recommandées celle réputée la plus favorable au retour à la virulence. Euthanasiez les lapins 5-10 jours après l'inoculation et prélevez sur chaque lapin les organes ou tissus ayant un taux de virus suffisant pour permettre un passage. Homogénéisez les organes et tissus dans une solution tampon appropriée, centrifugez la suspension et utilisez le surnageant pour les passages supplémentaires. Inoculez le surnageant sur

des cultures cellulaires appropriées pour déceler la présence du virus. Administrez un volume approprié de surnageant par une voie appropriée, à un débit approprié, à 2 autres lapins du même âge. Procédez ainsi à 5 passages au minimum, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages.

Effectuez l'essai d'innocuité (section 2-3-1.) au moyen du virus vaccinal avant passage et du virus au niveau de passage maximal où le réisolement a été possible.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal. Si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde séries, le virus vaccinal satisfait également à l'essai.

2-3-3. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des lapins de l'âge minimal recommandé. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque lapin n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

Utilisez au moins 15 lapins exempts d'anticorps dirigés contre le virus du myxome et qui ont été élevés dans des conditions appropriées d'isolement qui assurent l'absence de contact avec le virus du myxome. Administrez le virus vaccinal à au moins 10 des lapins selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 5 autres comme témoins. Au moins 21 jours après la dernière vaccination, soumettez tous les lapins à une épreuve virulente en leur administrant par voie appropriée une quantité suffisante d'une forme virulente du virus du myxome pour provoquer l'apparition de signes typiques de la myxomatose chez un lapin exempt d'anticorps dirigés contre le virus du myxome. Observez les lapins au moins une fois par jour pendant 21 jours supplémentaires à compter de l'épreuve et exercez une surveillance de chaque lapin.

L'essai n'est pas valable si moins de 90 pour cent des lapins témoins présentent des signes typiques de la myxomatose. Un vaccin contenant le virus du myxome satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, au moins 90 pour cent des lapins vaccinés ne présentent aucun signe de la myxomatose. Un vaccin contenant le virus du fibrome de Shope satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, au moins 75 pour cent des lapins vaccinés ne présentent aucun signe de la myxomatose.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Effectuez un essai d'immunofluorescence, avec un immunosérum monospécifique, sur des cultures cellulaires appropriées.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes** (*2.6.7*). Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes.

3-4. **Innocuité**. Utilisez au moins 2 lapins qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination et de préférence exempts d'anticorps dirigés contre le virus du myxome et contre le virus de la maladie hémorragique du lapin, et qui ont été élevés dans des conditions d'isolement qui assurent l'absence de contact avec le virus du myxome. Administrez à chaque lapin par une voie recommandée 10 doses de vaccin. Observez les lapins au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des lapins ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-5. **Agents étrangers**. A la fin de la période d'observation de 14 jours de l'essai d'innocuité, administrez par une voie recommandée 10 doses supplémentaires de vaccin à chaque lapin. Après 14 jours, prélevez un échantillon de sang de chaque lapin et effectuez des essais de recherche d'anticorps dirigés contre le virus de la maladie hémorragique du lapin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun anticorps n'est trouvé.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des cultures cellulaires appropriées. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans une dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-3) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.

**07/2009:2038**

# VACCIN VIVANT DE L'ANÉMIE INFECTIEUSE DU POULET

## Vaccinum anaemiae infectivae pulli vivum

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de l'anémie infectieuse du poulet est une préparation d'une souche appropriée du virus de l'anémie du poulet. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des reproducteurs, à la prévention de l'excrétion du virus, à la prévention ou la réduction de la transmission du virus par les oeufs et à la protection passive de leur progéniture à venir.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poule embryonnés ou en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DES VIRUS*

2-2-1. **Oeufs de poule embryonnés**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poule embryonnés, ils proviennent d'élevages exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*).

2-2-2. **Cultures cellulaires**. Si le virus vaccinal est multiplié sur des cultures cellulaires, elles satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *LOTS DE SEMENCE*

2-3-1. **Agents étrangers**. Le lot de semence primaire satisfait à l'essai des agents étrangers dans les lots de semence (*2.6.24*). Lors de ces essais sur lot de semence primaire, utilisez des organismes n'ayant pas subi, en début d'essai, plus de 5 passages depuis le lot de semence primaire.

2-4. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des poulets auxquels le vaccin est destiné.

Les essais décrits ci-après sous innocuité (section 2-4-1), augmentation de la virulence (section 2-4-2) et pouvoir immunogène (section-2-4-3) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-4-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées pour la vaccination, en utilisant des poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination et issus d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Utilisez le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot du vaccin.

2-4-1-1. *Innocuité générale*. Pour chaque essai, utilisez au minimum 20 poulets ayant au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination et issus d'un élevage EOPS (*5.2.2*).

Vaccins

Administrez à chaque poulet une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans 1 dose de vaccin. 14 jours après la vaccination, prélevez des échantillons de sang sur la moitié des poulets et mesurez la valeur de l'hématocrite. Euthanasiez ces poulets et procédez à un examen post-mortem. Notez les modifications lésionnelles éventuelles imputables au virus de l'anémie du poulet, comme une atrophie thymique ou des lésions caractéristiques de la moelle osseuse. Observez les poulets restants au moins 1 fois par jour pendant 21 jours.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, lors de la période d'observation, aucun poulet ne présente de signes notables de l'anémie du poulet, ni ne meurt de causes imputables au virus vaccinal.

2-4-1-2. *Innocuité chez les jeunes poulets.* Utilisez au minimum 20 poulets âgés de 1 jour et issus d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez à chaque poulet par voie oculonasale une quantité de virus vaccinal correspondant au moins au titre maximal en virus susceptible d'être atteint dans 1 dose de vaccin. Observez les poulets au moins 1 fois par jour. Notez la survenue éventuelle de signes imputables au virus vaccinal, comme une prostration, ainsi que tous les morts. 14 jours après la vaccination, prélevez des échantillons de sang sur la moitié des poulets et mesurez la valeur de l'hématocrite. Euthanasiez ces poulets et procédez à un examen post-mortem. Notez les modifications lésionnelles éventuelles imputables au virus de l'anémie du poulet, comme une atrophie thymique ou des lésions caractéristiques de la moelle osseuse. Observez les poulets restants au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. Evaluez la pathogénicité de la souche vaccinale chez des poulets réceptifs âgés de 1 jour à partir des résultats des observations cliniques, du taux de mortalité et de la proportion d'oiseaux examinés à 14 jours présentant une anémie (valeur de l'hématocrite inférieure à 27 pour cent) ou des signes de l'anémie infectieuse du poulet à l'examen post-mortem. Les résultats de l'essai servent à formuler l'indication sur l'étiquette quant à l'innocuité chez les jeunes poulets.

2-4-2. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin à un groupe de 5 poulets âgés de 1 jour et issus d'un élevage EOPS (*5.2.2*), puis à effectuer des passages successifs, 5 si possible, sur d'autres groupes similaires de poulets âgés de 1 jour et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Si les propriétés du virus vaccinal permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon, effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents.

Administrez à chaque animal par voie intramusculaire une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après. 7-9 jours après l'administration, préparez une suspension à partir du foie de chaque poulet et mélangez les échantillons. En fonction du tropisme du virus, d'autres tissus tels que la rate ou la moelle osseuse peuvent être utilisés. Utilisez 5 autres poulets de même âge et de même origine. Administrez 0,1 mL du mélange d'échantillons par voie intramusculaire à chacun d'eux. Procédez ainsi à 5 passages au minimum, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages.

Effectuez les essais d'innocuité (section 2-4-1) au moyen du virus vaccinal avant passage et du virus au niveau de passage maximal où le réisolement a été possible.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal ou si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde séries.

2-4-3. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées en utilisant dans chaque cas des poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination et issus d'un élevage EOPS (*5.2.2*). L'essai de prévention de l'excrétion virale vise à démontrer la réduction de transmission du virus par les oeufs au travers de la virémie et de l'excrétion du virus dans les fèces. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque poulet n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

2-4-3-1. *Immunisation passive des poulets.* Vaccinez au minimum 10 poules qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination et issues d'un élevage EOPS (*5.2.2*) selon le schéma vaccinal recommandé. Gardez au minimum 10 poules de même origine et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) comme témoins non vaccinés. A un moment approprié, lorsque l'excrétion du virus vaccinal a cessé, prélevez des oeufs fécondés de chacune des poules vaccinées et de chacune des poules témoins et incubez-les. Soumettez au moins 3 poulets âgés de 1 jour et choisis de façon aléatoire dans chaque groupe de poules vaccinées et chaque groupe de poules témoins à une épreuve par administration intramusculaire d'une quantité suffisante de virus virulent de l'anémie du poulet. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 14 jours après l'épreuve. Notez les morts et les poulets survivants qui présentent des signes de maladie. A la fin de la période d'observation, mesurez la valeur de l'hématocrite de chacun des poulets survivants. Euthanasiez ces poulets et procédez à un examen post-mortem. Notez les signes pathologiques éventuels imputables au virus de l'anémie du poulet, comme une atrophie thymique ou des lésions caractéristiques de la moelle osseuse. L'essai n'est pas valable si :

– lors de la période d'observation suivant l'épreuve, moins de 90 pour cent des poulets des poules témoins meurent ou présentent des signes sévères de l'anémie infectieuse du poulet, dont une valeur d'hématocrite inférieure à 27 pour cent, et/ou des lésions macroscopiques notables de la moelle osseuse et du thymus,
– et/ou entre la vaccination et le prélèvement des oeufs, plus de 10 pour cent des poules vaccinées ou des poules témoins présentent des signes notables de maladie ou meurent de causes non imputables au vaccin.

Le vaccin satisfait à l'essai si lors de la période d'observation suivant l'épreuve, au minimum 90 pour cent des poulets provenant de poules vaccinées survivent et ne présentent aucun signe notable de maladie ni de lésions macroscopiques de la moelle osseuse et du thymus.

2-4-3-2. *Prévention de l'excrétion du virus.* Vaccinez au minimum 10 poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination et issus d'un élevage EOPS (*5.2.2*) selon le schéma vaccinal recommandé. Maintenez séparément au minimum 10 poulets de même âge et de même origine comme témoins. Au moment approprié, lorsque l'excrétion du virus vaccinal a cessé, soumettez tous les poulets à une épreuve par administration intramusculaire d'une quantité suffisante de virus virulent de l'anémie du poulet. Prélevez des échantillons de sang sur les poulets aux jours 3, 5 et 7 suivant l'épreuve et des échantillons de fèces sur les poulets aux jours 7, 14 et 21 suivant l'épreuve et effectuez un essai de recherche du virus pour déterminer si les poulets sont virémiques et excrètent le virus. L'essai n'est pas valable si :

– moins de 70 pour cent des poulets témoins sont virémiques et excrètent le virus dans un ou plusieurs échantillons,
– et/ou entre la vaccination et l'épreuve, plus de 10 pour cent des poulets témoins ou vaccinés présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non imputables au vaccin.

Le vaccin satisfait à l'essai si au minimum 90 pour cent des poulets vaccinés ne sont pas virémiques ou n'excrètent pas le virus.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le vaccin, dilué si nécessaire et mélangé à un immunosérum monospécifique antivirus de l'anémie du poulet, n'infecte plus les cultures sensibles de cellules ou des oeufs issus d'un élevage EOPS (*5.2.2*) auxquels il est inoculé.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Les vaccins pour administration par injection satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062).*

Les vaccins qui ne sont pas pour administration par injection satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)* ou bien à l'essai suivant : effectuez un essai quantitatif de la contamination bactérienne et fongique ; effectuez des essais pour identifier les microorganismes retrouvés dans le vaccin ; le vaccin ne contient pas de microorganisme pathogène et contient au maximum 1 microorganisme non pathogène par dose.

Tout liquide fourni avec le vaccin satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062).*

3-3. **Mycoplasmes**. Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes (*2.6.7*).

3-4. **Agents étrangers**. Le vaccin satisfait à l'essai des agents étrangers dans les lots de produit fini (*2.6.25*).

3-5. **Innocuité**. Utilisez au minimum 10 poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination et issus d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez par une voie recommandée 10 doses de vaccin à chaque poulet. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 20 pour cent des poulets présentent des signes anormaux ou meurent de causes non imputables au vaccin.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun poulet ne présente de signes notables de maladie ou ne meure de causes imputables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation sur des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*) ou des oeufs provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans 1 dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences des essais prescrits sous Pouvoir immunogène (sections 2-4-3-1 et 2-4-3-2), lorsqu'il est administré par une voie et une méthode appropriées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.

4. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique la pathogénicité attendue du virus vaccinal s'il est transmis à de jeunes poulets réceptifs.

**01/2008:0251**

# VACCIN VIVANT DE LA PANLEUCOPÉNIE INFECTIEUSE DU CHAT

## Vaccinum panleucopeniae felinae infectivae vivum

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de la panleucopénie infectieuse du chat est une préparation d'une souche appropriée du virus de la panleucopénie du chat. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des chats contre la panleucopénie infectieuse du chat.

2. PRODUCTION

2-1. *PREPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des chats auxquels le vaccin est destiné (y compris l'innocuité pour la chatte gestante si le vaccin n'est pas contre-indiqué chez ces chattes ou si le virus est excrété dans les fèces).

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1), Augmentation de la virulence (section 2-3-2) et Pouvoir immunogène (section 2-3-3) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination. Utilisez le virus au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin.

Pour chaque essai, utilisez au minimum 5 chats de l'âge minimal recommandé pour la vaccination, exempts d'anticorps inhibant l'hémagglutination du virus de la panleucopénie du chat et du parvovirus canin. Les leucocytes du sang circulant sont comptés aux jours 8 et 4 avant l'injection du virus vaccinal ; la moyenne de ces 2 numérations constitue la valeur initiale. Administrez à chaque chat une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin. Observez les chats au moins une fois par jour pendant 21 jours. Des numérations de leucocytes sont effectuées aux 4$^{e}$, 6$^{e}$, 8$^{e}$ et 10$^{e}$ jours suivant l'inoculation.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun chat ne présente de réaction anormale locale ou générale, de signes de maladie ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal et si pour chaque chat et pour chaque numération, le nombre de leucocytes n'est pas inférieur à 50 pour cent de la valeur initiale.

2-3-2. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin, à 2 chats de l'âge minimal recommandé pour la vaccination, exempts d'anticorps inhibant l'hémagglutination du virus de la panleucopénie du chat et du parvovirus canin, puis à effectuer des passages successifs, 5 si possible, sur d'autres groupes similaires et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Si les propriétés du virus vaccinal permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon, effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents.

Administrez à chaque chat par une voie recommandée une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après. Récoltez les fèces de chaque chat, du 2e au 10e jour après l'administration du virus, effectuez une recherche du virus et mélangez les prélèvements contenant le virus. Administrez 1 mL de la suspension des prélèvements mélangés, par voie oronasale à 2 autres chats de même âge. Procédez ainsi à 5 passages au minimum, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun chat ne meurt ni ne présente de signes attribuables au virus vaccinal et si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal ; on tiendra compte, notamment, du dénombrement des leucocytes, des résultats d'examens histologiques du thymus et du titre en virus présent dans les excrétions. Le virus vaccinal satisfait aussi à l'essai si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde séries.

2-3-3. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies d'administration et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des chats âgés de 8-12 semaines. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque chat n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

Utilisez au moins 10 chats exempts d'anticorps inhibant l'hémagglutination du virus de la panleucopénie du chat et du parvovirus canin. Administrez le virus vaccinal à au moins 5 chats, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 5 autres comme témoins. Effectuez des dénombrements de leucocytes 8 et 4 jours avant l'épreuve virulente ; la moyenne de ces 2 numérations constitue la valeur initiale. Après 20-22 jours, soumettez tous les chats à une épreuve virulente en leur administrant par voie intrapéritonéale une quantité suffisante de suspension d'une forme virulente du virus de la panleucopénie du chat. Observez les chats au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de l'épreuve. Effectuez un dénombrement des leucocytes aux 4$^{e}$, 6$^{e}$, 8$^{e}$ et 10$^{e}$ jours après l'épreuve virulente.

L'essai n'est pas valable si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, moins de 100 pour cent des chats témoins présentent chacun en au moins une occasion une diminution de 75 pour cent ou plus du nombre de leucocytes par rapport à la valeur initiale ou meurent de panleucopénie du chat. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, tous les chats vaccinés survivent sans présenter de signes de maladie ni de leucopénie, c'est-à-dire si la diminution du nombre de leucocytes lors de chacun des 4 dénombrements ne dépasse pas 50 pour cent de la valeur initiale.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Effectuez une multiplication du virus vaccinal sur des cultures cellulaires sensibles dans un support approprié à un essai d'anticorps fluorescent ou à un essai d'immunoperoxydase. Préparez des témoins appropriés. A l'aide d'anticorps monoclonaux, effectuez une recherche du virus de la panleucopénie du chat sur une partie des cultures cellulaires, et sur une autre partie, une recherche du parvovirus canin. L'antigène du virus de la panleucopénie du chat est décelé mais le parvovirus canin n'est pas décelé dans les cellules dans lesquelles le virus vaccinal a été inoculé.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes** (*2.6.7*). Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes.

3-4. **Agents étrangers**. Neutralisez le virus vaccinal à l'aide d'un immunosérum monospécifique approprié dirigé contre le virus de la panleucopénie du chat et inoculez le mélange à des cultures cellulaires sensibles aux virus pathogènes pour le chat. Effectuez au moins 1 passage et maintenez les cultures pendant 14 jours. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne se produit pas d'effet cytopathogène et s'il n'est observé aucun signe de la présence d'agents hémadsorbants.

3-5. **Innocuité**. Utilisez 2 chats de l'âge minimal recommandé, exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la panleucopénie du chat ou contre le parvovirus canin. Administrez à chaque chat par une voie recommandée 10 doses de vaccin. Observez les chats au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des chats ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des cultures cellulaires appropriées. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans une dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-3) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.

**01/2008:0964**
**corrigé 7.0**

# VACCIN VIVANT DE LA PARVOVIROSE CANINE

## Vaccinum parvovirosis caninae vivum

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de la parvovirose canine est une préparation d'une souche appropriée du parvovirus canin. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des chiens contre la parvovirose canine.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des chiens auxquels le vaccin est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1), Augmentation de la virulence (section 2-3-2) et Pouvoir immunogène (section 2-3-3) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination, en utilisant dans chaque cas des chiens de l'âge minimal recommandé. Utilisez le virus au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin.

2-3-1-1. *Innocuité générale*. Pour chaque essai, utilisez au minimum 5 chiens exempts d'anticorps inhibant l'hémagglutination du parvovirus canin. Les leucocytes du sang circulant sont comptés aux jours 4, 2 et 0 avant l'injection vaccinale. Administrez à chaque chien une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 21 jours. Les leucocytes du sang circulant sont comptés aux jours 3, 5, 7 et 10 après l'injection.

L'essai n'est pas valable si une diminution du nombre des leucocytes circulants supérieure à 50 pour cent du nombre initial des leucocytes, déterminé par la moyenne des 3 valeurs observées avant l'injection vaccinale, est notée. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun chiens ne présente de réaction anormale, locale ou générale, de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal.

2-3-1-2. *Effets sur le thymus*. Pour chaque essai, utilisez au minimum 10 chiens exempts d'anticorps inhibant l'hémagglutination du parvovirus canin. Administrez à chacun d'au moins 5 des chiens une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être

Vaccins

contenu dans une dose de vaccin et gardez-en au minimum 5 autres comme témoins. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 21 jours. Après 14 jours, euthanasiez 2 chiens de chaque groupe et après 21 jours, les chiens restant dans chaque groupe. Procédez à un examen histologique sur le thymus de chaque chien.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si une hypoplasie légère du thymus est tout au plus présente après 14 jours et si aucune lésion n'est trouvée après 21 jours.

2-3-2. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin, à 2 chiens de l'âge minimal recommandé pour la vaccination et exempts d'anticorps inhibant l'hémagglutination du parvovirus canin, puis à effectuer des passages successifs, 5 si possible, sur d'autres groupes similaires et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Si les propriétés du virus vaccinal permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon, effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents.

Administrez à chaque chien par une voie recommandée une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après. Récoltez les fèces de chaque chien, du 2$^{e}$ au 10$^{e}$ jour, effectuez une recherche du parvovirus et mélangez les prélèvements contenant le virus. Administrez 1 mL de la suspension des prélèvements mélangés, par voie oronasale à 2 autres chiens du même âge. Procédez ainsi à 5 passages au minimum, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal ; on tiendra compte, notamment, du dénombrement des leucocytes, des résultats d'examens histologiques du thymus et du titre en virus présent dans les excrétions, ou si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde séries.

2-3-3. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des chiens de l'âge minimal recommandé. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque chien n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

Utilisez au moins 7 chiens exempts d'anticorps inhibant l'hémagglutination du parvovirus canin. Administrez le virus vaccinal à au moins 5 chiens et gardez-en au minimum 2 autres comme témoins. Après 20-22 jours, soumettez tous les chiens à une épreuve virulente en leur administrant par voie oronasale une quantité suffisante de suspension d'une forme virulente du parvovirus canin. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de l'épreuve. A la fin de la période d'observation, recherchez et titrez le virus dans les fèces par des essais d'hémagglutination.

L'essai n'est pas valable si moins de 100 pour cent des chiens témoins présentent des signes notables de la maladie et/ou de leucopénie et une excrétion du virus. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si tous les chiens vaccinés survivent sans présenter de signes notables de maladie ni de leucopénie et si le titre maximal de virus dans les fèces est inférieur à 1/100 de la moyenne géométrique des titres maximaux trouvés chez les témoins.

3. ESSAIS À EFFECTUER SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le virus vaccinal est multiplié en utilisant des lignées cellulaires sensibles dans un support approprié à un essai d'anticorps fluorescent ou à un essai d'immunoperoxidase. Des témoins appropriés sont utilisés. Une recherche du parvovirus canin est effectuée sur une partie des cultures cellulaires, à l'aide d'un anticorps monoclonal et sur une autre partie, une recherche du parvovirus félin est effectuée, à l'aide d'un anticorps monoclonal. L'antigène du parvovirus canin est décelé mais le parvovirus félin n'est pas décelé dans les cellules dans lesquelles le virus vaccinal a été inoculé.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes** (*2.6.7*). Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes.

3-4. **Agents étrangers**. Neutralisez le virus vaccinal à l'aide d'un immunosérum antiparvovirus canin monospécifique approprié et inoculez le mélange à des cultures cellulaires sensibles aux virus pathogènes pour le chien. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne se produit pas d'effet cytopathogène et s'il n'est observé aucun signe de la présence d'agents hémagglutinants ou hémadsorbants ni aucun autre signe de la présence de virus étrangers.

3-5. **Innocuité**. Utilisez 2 chiens de l'âge minimum recommandé pour la vaccination, exempts d'anticorps inhibant l'hémagglutination du parvovirus canin. Administrez à chacun d'eux, par une voie recommandée, 10 doses de vaccin. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun chien ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des cultures cellulaires appropriées. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans une dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-3) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.



**01/2008:1938**

# VACCIN VIVANT DE LA PESTE DU CANARD

## Vaccinum pestis anatis vivum

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de la peste du canard est une préparation d'une souche appropriée du virus de la peste du canard (herpèsvirus 1 des anatidés). La présente monographie s'applique aux vaccins destinés à être administrés à des canards en vue d'une immunisation active.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poules embryonnés ou en cultures cellulaires. Le vaccin peut être cryodesséché.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Oeufs de poules embryonnés**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poules embryonnés, ils proviennent d'élevages exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*).

2-2-2. **Cultures cellulaires**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des cultures cellulaires, elles sont conformes aux spécifications pour les cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *LOT DE SEMENCE*

2-3-1. **Agents étrangers**. Le lot de semence primaire satisfait à l'essai des agents étrangers dans les lots de semence (*2.6.24*). Lors de ces essais sur lot de semence primaire, utilisez des organismes n'ayant pas subi, en début d'essai, plus de 5 passages depuis le lot de semence primaire.

2-4. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être établi que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des canards auxquels le vaccin est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-4-1), Augmentation de la virulence (section 2-4-2) et Pouvoir immunogène (section 2-4-3) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et le pouvoir immunogène.

2-4-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées pour la vaccination, en utilisant à chaque fois des canards d'une espèce considérée comme étant la plus sensible parmi les espèces recommandées pour la vaccination, et dont l'âge n'excède pas l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Utilisez le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué qui sera présent dans un lot de vaccin. Pour chaque essai, utilisez au minimum 20 canards réceptifs exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la peste du canard. Administrez à chaque animal une quantité de virus vaccinal correspondant à au moins 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être atteint dans 1 dose de vaccin. Observez les canards au moins 1 fois par jour pendant les 21 jours suivant l'administration du virus. L'essai n'est pas valable si plus de 10 pour cent des animaux meurent de causes non attribuables au virus vaccinal. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun des animaux ne présente de signes cliniques notables de la peste du canard ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal.

2-4-2. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin, à un groupe de 5 canards domestiques d'un âge approprié pour la multiplication du virus et exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la peste du canard, puis à effectuer des passages successifs, 5 si possible, sur d'autres groupes semblables de canetons d'un âge approprié pour la multiplication du virus, et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Si les propriétés du virus vaccinal permettent un passage progressif sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon un passage tel qu'il est décrit ci-après est effectué et une recherche d'augmentation de la virulence est pratiquée sur le virus récupéré au niveau de passage le plus élevé. Des précautions doivent être prises pour éviter toute contamination par le virus de passages précédents. Administrez par une voie recommandée une quantité de virus vaccinal qui permettra de récupérer le virus pour les passages décrits ci-après. 2 à 4 jours plus tard, prélevez des échantillons hépatiques et spléniques sur chaque animal et mélangez tous les échantillons. Administrez 0,1 mL de cette suspension par voie oronasale ou parentérale à chaque sujet d'un autre groupe de 5 canards domestiques du même âge et exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la peste du canard. Effectuez cette opération au moins 5 fois ; vérifiez la présence du virus à chaque passage. Si le virus n'est pas décelé lors de l'un des niveaux de passage, effectuez une seconde série de passages. Effectuez l'essai d'innocuité (section 2-4-1) en utilisant le virus vaccinal n'ayant pas subi de passage et le virus vaccinal récupéré au niveau de passage maximal. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal ou si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde série.

2-4-3. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et méthodes d'administration recommandées pour la vaccination, en utilisant à chaque fois des canards domestiques dont l'âge ne dépasse pas l'âge minimal recommandé pour la vaccination. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque animal n'est pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette ; utilisez le virus vaccinal présent dans un lot de vaccin préparé à partir du passage le plus atténué utilisé en production. Pour chaque essai, utilisez au minimum 30 canards de même origine et exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la peste du canard. Administrez le virus vaccinal par une voie recommandée pour la vaccination à au moins 20 canards. Conservez au minimum 10 canards comme témoins. Après 5 jours, soumettez chaque animal à une épreuve virulente, par une voie appropriée, avec une quantité suffisante de virus virulent de la peste du canard. Observez les animaux au moins 1 fois par jour pendant les 14 jours suivant l'épreuve. Notez le nombre d'animaux morts et le nombre d'animaux survivants présentant des signes cliniques anormaux. L'essai n'est valable que si au minimum 80 pour cent des canards témoins meurent ou présentent des signes typiques de la peste du canard lors de la période d'observation suivant l'épreuve et au maximum 10 pour cent des animaux témoins ou vaccinés présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, lors de la période d'observation suivant l'épreuve, au minimum 80 pour cent des animaux vaccinés survivent et ne présentent aucun signe clinique notable de la peste du canard.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Le vaccin, dilué si nécessaire et mélangé à un antisérum monospécifique du virus de la peste du canard, n'infecte plus les oeufs de poules embryonnés issus d'un élevage EOPS (*5.2.2*) ou les cultures cellulaires réceptives (*5.2.4*) auxquels il est inoculé.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et, dans les cas appropriés, le liquide avec lequel il est fourni, satisfont aux exigences relatives à la stérilité prescrites dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes**. Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes (*2.6.7*).

3-4. **Agents étrangers**. Le vaccin satisfait aux essais des agents étrangers dans les lots de produit fini (*2.6.25*).

3-5. **Innocuité**. Utilisez au moins 10 canards domestiques qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination et n'ayant pas d'anticorps dirigés contre le virus de la peste du canard. Administrez à chaque animal, par une voie et une méthode recommandées, 10 doses du vaccin sous un volume approprié. Observez les animaux au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si, pendant la période d'observation, plus de 20 pour cent des animaux présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux ne présente de signes cliniques notables anormaux, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal en l'inoculant dans des oeufs de poule embryonnés issus d'élevage EOPS (*5.2.2*), ou à des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*). Le vaccin satisfait à l'essai si 1 dose de vaccin contient au moins la quantité de virus qui correspond au titre minimal indiqué sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin, administré par une voie et une méthode recommandées, satisfait à l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-4-3). Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a préalablement été effectué sur un lot représentatif en utilisant une dose vaccinale contenant au maximum le titre minimal indiqué sur l'étiquette.

Vaccins

**07/2008:0065**

# VACCIN VIVANT DE LA PESTE PORCINE CLASSIQUE PRÉPARÉ SUR CULTURES CELLULAIRES

## Vaccinum pestis classicae suillae vivum ex cellulis

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de la peste porcine classique préparé sur cultures cellulaires est une préparation obtenue à partir d'une souche de virus de la peste porcine classique qui a perdu son pouvoir pathogène pour le porc par passage *in vivo* et/ou *in vitro* et a été adapté aux cultures cellulaires.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

**Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des porcins auxquels le vaccin est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Essai d'innocuité chez les porcelets (section 2-3-1), Essai d'innocuité chez les truies gestantes et essai de recherche de la transmission transplacentaire (section 2-3-2), Non-diffusibilité (2-3-3), Augmentation de la virulence (section 2-3-4) et Pouvoir immunogène (section 2-3-5) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et le pouvoir immunogène.

2-3-1. **Essai d'innocuité chez les porcelets**. Effectuez l'essai pour chaque voie d'administration recommandée, en utilisant dans chaque cas des porcelets qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Utilisez le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué présent dans un lot de vaccin.

Utilisez au moins 10 porcelets en bonne santé et exempts d'anticorps dirigés contre les pestivirus. Administrez à au moins 10 porcelets une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans 1 dose de vaccin. Observez les porcelets au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. La température corporelle de chaque porcelet vacciné est mesurée sur les 3 jours au minimum précédant l'administration du vaccin, au moment de l'administration, 4 h après, puis quotidiennement pendant au moins 14 jours. Le vaccin satisfait à l'essai si l'augmentation moyenne de la température corporelle pour tous les porcelets n'est pas supérieure à 1,5 °C, si aucun porcelet ne présente une augmentation supérieure à 1,5 °C pendant plus de 3 jours et si aucun porcelet ne présente de signe notable de maladie, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

2-3-2. **Essai d'innocuité chez les truies gestantes et essai de recherche de la transmission transplacentaire**. Effectuez l'essai par une voie d'administration recommandée, en utilisant au minimum 10 truies ou cochettes, entre les 55^e^ et 80^e^ jours de gestation, en bonne santé, du même âge, de la même origine et exemptes d'anticorps dirigés contre les pestivirus. Utilisez le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué présent dans un lot de vaccin.

Administrez à au moins 10 truies ou cochettes une quantité de virus vaccinal au moins équivalente au titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans 1 dose de vaccin. Notez la température corporelle sur les 3 jours au minimum précédant l'administration du vaccin, au moment de l'administration, 4 h après, puis quotidiennement pendant au moins 15 jours. Observez jusqu'à la mise bas.

Effectuez des essais d'anticorps contre le virus de la peste porcine classique. Aucun anticorps contre le virus de la peste porcine classique n'est détecté dans les sérums prélevés chez les porcelets nouveaux-nés avant la tétée de colostrum. L'essai n'est pas valable si les truies vaccinées ne présentent pas de séroconversion. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucune anomalie n'est notée au cours de la gestation ni chez les porcelets, aucune truie ou cochette ne présente une élévation de température supérieure à 1,5 °C pendant plus de 5 jours, et aucune truie ou cochette ne présente de signe notable de maladie, ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

2-3-3. **Non-diffusibilité**. Gardez ensemble pour l'essai au moins 12 porcelets en bonne santé, âgés de 6-10 semaines, de la même origine et exempts d'anticorps dirigés contre les pestivirus. Utilisez le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin. Administrez par une voie recommandée à au moins 6 porcelets une quantité de virus vaccinal au moins équivalente au titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans 1 dose de vaccin, et gardez au moins 6 porcelets comme témoins de contact. Le mélange des porcelets vaccinés avec les témoins de contact est réalisé 24 h après la vaccination.

Après 45 jours, euthanasiez tous les porcelets. Effectuez des essais appropriés sur les porcelets pour détecter les anticorps de la peste porcine classique. Effectuez des essais appropriés sur les porcelets témoins pour détecter le virus de la peste porcine classique dans les amygdales. Le vaccin satisfait à l'essai si tous les porcelets vaccinés ont des anticorps et si aucun anticorps et aucun virus n'est trouvé chez les témoins.

2-3-4. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin à des porcelets exempts d'anticorps dirigés contre les pestivirus.

Administrez à 2 porcelets en bonne santé, âgés de 6-10 semaines par une voie recommandée une quantité de virus vaccinal correspondant au moins au titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans 1 dose de vaccin. Prélevez 1 fois par jour entre le 2^e^ et le 7^e^ jour après l'administration du virus vaccinal une quantité appropriée de sang sur chaque porcelet et mélangez les prélèvements effectués le même jour. Administrez 2 mL du mélange présentant le titre en virus le plus élevé, par une voie recommandée, à 2 autres porcelets de même âge et de même origine. Si aucun virus n'est détecté, répétez l'essai avec 2 porcelets. Si du virus est détecté, effectuez une 2^de^ série de passages en administrant 2 mL de sang positif par une voie recommandée à 2 autres porcelets de même âge et de même origine. Procédez ainsi à 5 passages au minimum, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal ou si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la 1^re^ et de la 2^de^ séries.

2-3-5. **Pouvoir immunogène**

2-3-5-1. *Dose protectrice*. L'efficacité du vaccin est exprimée par le nombre de doses protectrices 50 pour cent ($DP_{50}$) chez le porc contenues dans la dose vaccinale, comme indiqué sur l'étiquette. Le vaccin contient au moins 100 $DP_{50}$ par dose.

Utilisez au moins 1 groupe de porcelets âgés de 6-10 semaines et exempts d'anticorps dirigés contre les pestivirus, et utilisez un groupe de porcelets supplémentaire de même âge et de même origine comme témoins. Chaque groupe de porcelets est vacciné avec 1 dilution de dose de vaccin. 14 jours après l'injection unique de vaccin, soumettez les animaux à une épreuve virulente en injectant par une voie recommandée une souche de virus virulent et une dose appropriées, suffisantes

Vaccins

pour tuer au minimum 50 pour cent des porcelets non vaccinés en moins de 21 jours. Observez les porcelets pendant 21 jours et enregistrez la température corporelle 3 jours avant l'épreuve et chaque jour suivant l'épreuve pendant 21 jours. La $DP_{50}$ est calculée par les méthodes statistiques habituelles (*5.3*, par exemple) en tenant compte des porcelets survivants sans signes cliniques de peste porcine, incluant les lésions cutanées ou une augmentation de la température corporelle.

L'essai n'est pas valable si moins de 50 pour cent des porcelets témoins présentent des signes typiques notables de la peste porcine, incluant des lésions cutanées, ou meurent, et si moins de 100 pour cent des porcelets témoins présentent des signes cliniques de la maladie dans les 21 jours suivant l'épreuve.
Le vaccin satisfait à l'essai si la dose minimale indiquée sur l'étiquette correspond à au minimum 100 $DP_{50}$.

2-3-5-2. *Protection contre l'infection transplacentaire*. Utilisez 8 truies exemptes d'anticorps dirigés contre les pestivirus, réparties de manière aléatoire en un groupe vacciné ($n$ = 6) et un groupe témoin ($n$ = 2).

Entre le 40e et le 50e jour de gestation, toutes les truies placées dans le groupe vacciné sont vaccinées en une injection avec 1 dose de vaccin dont le titre en virus n'est pas supérieur au titre minimal indiqué sur l'étiquette. Au 60e jour de gestation, toutes les truies sont soumises à une épreuve virulente par une voie recommandée avec une souche appropriée de virus virulent. Juste avant la mise bas et environ 5-6 semaines après l'épreuve, les truies sont euthanasiées et une recherche du virus de la peste porcine classique est effectuée sur leurs foetus. Des échantillons de sérum des truies et des foetus sont contrôlés pour rechercher la présence d'anticorps neutralisants dirigés contre le virus de la peste porcine classique. L'isolement du virus de la peste porcine classique est effectué à partir de sang (prélevé sur les truies 7 et 9 jours après l'épreuve et quand elles sont euthanasiées), et à partir d'une préparation homogénéisée d'organes (rate, reins, noeuds lymphatiques) des foetus.

L'essai n'est pas valable si une ou plusieurs truies vaccinées ne présentent pas de seroconversion après la vaccination et les truies témoins ne présentent pas de séroconversion après l'épreuve, ou si aucun virus n'est trouvé chez plus de 50 pour cent des foetus des truies témoins (en excluant les foetus momifiés).

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun virus n'est trouvé dans le sang des truies vaccinées et chez les foetus des truies vaccinées, et si aucun anticorps dirigé contre le virus de la peste porcine classique n'est trouvé dans le sérum des foetus des truies vaccinées.



3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**

Des anticorps monoclonaux spécifiques de la peste porcine classique sont utilisés pour identifier la souche vaccinale.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062).*

3-3. **Mycoplasmes** (*2.6.7*). Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes.

3-4. **Agents étrangers**. Neutralisez le virus vaccinal à l'aide d'anticorps monoclonaux du virus vaccinal. Le vaccin satisfait à l'essai si, inoculé dans des cultures cellulaires connues pour être sensibles aux virus pathogènes pour le porc et aux pestivirus, il ne provoque pas d'effet cytopathogène. Maintenez ces cultures au moins 14 jours et effectuez au moins 3 passages au cours de cette période. Les cellules ne présentent aucun signe de la présence éventuelle d'agents hémadsorbants.

Utilisez des anticorps monoclonaux permettant d'identifier toute contamination éventuelle par des pestivirus. Aucun virus n'est détecté par une méthode appropriée.

3-5. **Innocuité**. Utilisez 2 porcelets en bonne santé, âgés de 6-10 semaines et exempts d'anticorps dirigés contre les pestivirus. Administrez 10 doses de vaccin à chaque porcelet par une voie recommandée. Observez les porcelets au moins 1 fois par jour pendant 14 jours. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun porcelet ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal dans des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*). Le vaccin satisfait à l'essai si 1 dose contient au moins le titre minimal en virus indiqué sur l'étiquette.

3- 7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-5) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.

**01/2008:0450**

# VACCIN VIVANT DE LA PSEUDOPESTE AVIAIRE (MALADIE DE NEWCASTLE)

## Vaccinum pseudopestis aviariae vivum

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de la pseudopeste aviaire est une préparation d'une souche appropriée du virus de la maladie de Newcastle (paramyxovirus aviaire 1). La présente monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des poulets et/ou d'autres espèces aviaires.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poules embryonnés ou en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Oeufs de poules embryonnés**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poules embryonnés, ils proviennent d'élevages exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*).

2-2-2. **Cultures cellulaires**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des cultures cellulaires, elles sont conformes aux spécifications pour les cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *LOTS DE SEMENCE*

2-3-1. **Agents étrangers**. Le lot de semence primaire satisfait à l'essai des agents étrangers dans les lots de semence (*2.6.24*). Lors de ces essais sur lot de semence primaire, utilisez des organismes n'ayant pas subi, en début d'essai, plus de 5 passages depuis le lot de semence primaire.

2-4. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des oiseaux auxquels le vaccin est destiné.
Les essais décrits ci-après sous Indice de pathogénicité intracérébrale (section 2-4-1), Séquence des acides aminés (section 2-4-2), Innocuité (section 2-4-3), Augmentation de la virulence (section 2-4-4) et Pouvoir immunogène (section 2-4-5) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et le pouvoir immunogène.

2-4-1. **Indice de pathogénicité intracérébrale**. Utilisez le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué qui sera présent dans un lot de vaccin. Injectez le virus vaccinal dans la cavité allantoïdienne d'oeufs de poules embryonnés, âgés de 9-11 jours, provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Placez les oeufs en incubation pendant une période appropriée, puis recueillez et mélangez les liquides allantoïdiens. Utilisez au minimum 10 poulets âgés de 1 jour (c'est-à-dire plus de 24 h mais moins de 40 h après l'éclosion), provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez à chacun d'eux, par voie intracérébrale,

0,05 mL du mélange de liquides allantoïdiens ; la quantité minimale de virus contenue dans l'inoculum est de $10^{8,0}$ $DIO_{50}$ ou, si cette valeur est impossible à atteindre, de $10^{7,0}$ $DIO_{50}$. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 8 jours, en procédant à une évaluation toutes les 24 h. Les poulets reçoivent la note 0 lorsqu'ils présentent un état clinique normal, la note 1 lorsqu'ils présentent des signes cliniques de la pseudopeste aviaire et la note 2 lorsqu'ils meurent. L'indice de pathogénicité intracérébrale est la moyenne des notes attribuées à chaque poulet lors de chaque évaluation au cours des 8 jours d'observation. Lorsque l'inoculum utilisé possède un titre en virus supérieur ou égal à $10^{8,0}$ $DIO_{50}$, le virus vaccinal satisfait à l'essai si son indice de pathogénicité intracérébrale n'est pas supérieur à 0,5. Lorsque l'inoculum utilisé possède un titre en virus supérieur ou égal à $10^{7,0}$ $DIO_{50}$ mais inférieur à $10^{8,0}$ $DIO_{50}$, le virus vaccinal satisfait à l'essai si son indice de pathogénicité intracérébrale n'est pas supérieur à 0,4.

2-4-2. **Séquence des acides aminés**. Déterminez, par une méthode appropriée, la séquence d'un fragment d'ARN de virus vaccinal contenant la région qui code pour le site de clivage F0. La séquence des acides aminés encodés qui est obtenue est soit l'une des séquences suivantes :

| | | F2 | | | | | | Site de clivage | F1 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Site | | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | ˅ | 117 | 118 | 119 |
| | | Gly | Gly | Lys | Gln | Gly | Arg | | Leu | Ile | Gly |
| | ou | Gly | Gly | Arg | Gln | Gly | Arg | | Leu | Ile | Gly |
| | ou | Gly | Glu | Arg | Gln | Glu | Arg | | Leu | Val | Gly |

soit une séquence équivalente comportant la leucine en position 117 et pas d'acides aminés basiques aux sites 111, 112, 114 et 115.

2-4-3. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies d'administration et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination et sur chacune des espèces aviaires auxquelles le vaccin est destiné, en utilisant dans chaque cas des oiseaux qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Utilisez le virus au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin. Pour les essais sur poulets, utilisez au minimum 20 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Pour les espèces aviaires autres que le poulet, utilisez au minimum 20 oiseaux exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la pseudopeste aviaire. Administrez à chaque oiseau une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans 1 dose de vaccin. Observez les oiseaux au moins 1 fois par jour pendant 21 jours à compter de l'administration. L'essai n'est pas valable si plus de 10 pour cent des oiseaux présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au virus vaccinal. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun des oiseaux ne présente de signes cliniques notables de la pseudopeste aviaire ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal.

2-4-4. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin à 5 oiseaux âgés de 2 semaines au plus, puis à effectuer des passages successifs, 5 si possible, sur d'autres groupes similaires et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Si les propriétés du virus vaccinal permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon, effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents. Effectuez l'essai sur l'une des espèces cibles, en choisissant le poulet s'il en fait partie. Pour les essais sur poulets, utilisez des poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Pour les autres espèces, utilisez des oiseaux exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la pseudopeste aviaire. Administrez par instillation oculaire une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement maximal du virus pour les passages décrits ci-après. Placez les oiseaux en observation pendant la durée qui s'est avérée correspondre à une réplication maximale du virus vaccinal, puis euthanasiez-les et préparez pour chacun d'eux une suspension de l'encéphale et d'un autre organe approprié selon le tropisme de la souche (par exemple la muqueuse trachéale entière, l'intestin ou le pancréas). Mélangez ces suspensions et administrez par instillation oculaire 0,05 mL du mélange à 5 autres oiseaux de même espèce, âge et origine. Procédez ainsi à 5 passages au minimum, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages.

A. Effectuez l'essai de l'indice de pathogénicité intracérébrale (section 2-4-1) au moyen du virus vaccinal avant passage et du virus au niveau de passage maximal où le réisolement a été possible.

B. Effectuez l'essai de la séquence des acides aminés (section 2-4-2) au moyen du virus vaccinal avant passage et du virus au niveau de passage maximal où le réisolement a été possible.

C. Effectuez l'essai de l'innocuité (section 2-4-3) au moyen du virus vaccinal avant passage et du virus au niveau de passage maximal où le réisolement a été possible. Choisissez, parmi les voies d'administration recommandées, celle réputée la plus défavorable du point de vue de l'innocuité et, parmi les espèces aviaires auxquelles le vaccin est destiné, celle réputée la plus sensible à la pseudopeste aviaire.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun signe d'accroissement de la virulence n'est constaté lors des essais 2-4-4A, 2-4-4B et 2-4-4C entre le virus avant passage et le virus ayant subi le plus grand nombre de passage. Si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde série, le virus vaccinal satisfait également à l'essai.

2-4-5. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des espèces aviaires auxquelles le vaccin est destiné, ainsi que pour chacune des voies d'administration et des méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des oiseaux qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque oiseau n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette, et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin.

2-4-5-1. *Vaccins destinés au poulet.* Utilisez au moins 30 poulets de même origine et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez le virus vaccinal par l'une des voies recommandées à au moins 20 de ces poulets. Gardez-en au minimum 10 autres comme témoins. Après 21 jours, soumettez tous les poulets à une épreuve virulente en leur administrant à chacun, par voie intramusculaire, au moins $10^{5,0}$ $DL_{50}$ embryon de la souche Herts (Weybridge 33/56) du virus de la pseudopeste aviaire. Observez tous les poulets au moins 1 fois par jour pendant 14 jours à compter de l'épreuve. Notez les morts et le nombre de poulets survivants qui présentent des signes cliniques de la pseudopeste aviaire. L'essai n'est pas valable si moins de 100 pour cent des témoins meurent dans les 6 jours suivant l'épreuve ou si, dans l'intervalle de temps séparant la vaccination de l'épreuve, plus de 10 pour cent des poulets vaccinés ou témoins présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, au moins 90 pour cent des poulets vaccinés ont survécu à l'épreuve sans présenter de signes cliniques notables de la pseudopeste aviaire.

2-4-5-2. *Vaccins destinés à d'autres espèces aviaires que le poulet.* Utilisez au moins 30 oiseaux de l'espèce cible de la pseudopeste aviaire, de même origine et exempts d'anticorps dirigés contre le paramyxovirus aviaire 1. Administrez le virus vaccinal par l'une des voies recommandées à au moins 20 de ces

Vaccins

oiseaux et gardez-en au minimum 10 autres comme témoins. Après 21 jours, soumettez tous les oiseaux à une épreuve virulente en leur administrant par voie intramusculaire une quantité suffisante d'une souche virulente du paramyxovirus aviaire 1. Observez tous les oiseaux au moins 1 fois par jour pendant 21 jours à compter de l'épreuve. Notez les morts et le nombre d'oiseaux survivants qui présentent des signes cliniques de la pseudopeste aviaire. L'essai n'est pas valable si :

- au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, moins de 90 pour cent des oiseaux témoins meurent ou présentent des signes cliniques sévères de la pseudopeste aviaire,
- ou si dans l'intervalle de temps séparant la vaccination de l'épreuve, plus de 10 pour cent des oiseaux vaccinés ou témoins présentent des signes cliniques anormaux de maladie ou meurent de causes non attribuables au vaccin.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, au moins 90 pour cent des oiseaux vaccinés survivent sans présenter de signes cliniques notables de la pseudopeste aviaire. Dans le cas des espèces pour lesquelles des données publiées attestent qu'il n'est pas possible d'atteindre ce niveau de protection, le vaccin satisfait à l'essai si une réduction significative de la morbidité et de la mortalité est observée chez les oiseaux vaccinés, par rapport aux oiseaux témoins.

## 3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**

3-1-1. *Identification du virus vaccinal.* Mélangez le vaccin, dilué si nécessaire, à un immunosérum monospécifique du virus de la pseudopeste aviaire : le vaccin ne provoque plus l'hémagglutination d'érythrocytes de poulets ou n'exerce plus de pouvoir infectieux lorsqu'il est inoculé à des oeufs de poules embryonnés provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) ou à des cultures cellulaires sensibles (*5.2.4*).

3-1-2. *Identification de la souche de virus.* Identifiez la souche du virus vaccinal par une méthode appropriée par exemple en utilisant des anticorps monoclonaux.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**

Les vaccins pour administration par injection satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

Les vaccins qui ne sont pas pour administration par injection satisfont soit à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)* soit à l'essai suivant : effectuez le contrôle de la contamination bactérienne et fongique par une technique quantitative ; effectuez des essais pour identifier les microorganismes retrouvés dans le vaccin ; le vaccin ne contient pas de microorganisme pathogène et contient au maximum 1 microorganisme non pathogène par dose.

Tout liquide fourni avec le vaccin satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes**. Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes (*2.6.7*).

3-4. **Agents étrangers**. Le vaccin satisfait aux essais des agents étrangers dans les lots de produit fini (*2.6.25*).

3-5. **Innocuité**. Pour les vaccins destinés au poulet, utilisez au minimum 10 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) et de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Pour les vaccins destinés à d'autres espèces aviaires que le poulet, utilisez au minimum 10 oiseaux de l'espèce réputée la plus sensible à la pseudopeste aviaire, exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la pseudopeste aviaire et de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Administrez à chaque oiseau, par instillation oculaire ou par administration parentérale, si seule cette dernière est recommandée, 10 doses de vaccin sous un volume adapté à l'essai. Observez les animaux au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 20 pour cent des oiseaux présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des oiseaux ne présente de signes cliniques notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des oeufs de poules embryonnés provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) ou à des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*). Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans 1 dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Selon les indications, le vaccin satisfait aux exigences de l'un ou des 2 essais prescrits sous Pouvoir immunogène (section 2-4-5) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées, et selon le schéma recommandé. Si l'essai de la section 2-4-5-2 *Vaccins destinés à d'autres espèces aviaires que le poulet* est réalisé et si le vaccin est recommandé pour plusieurs espèces aviaires, les oiseaux utilisés pour l'essai appartiennent à l'espèce réputée la plus sensible au paramyxovirus avaire 1 parmi celles auxquelles le vaccin est destiné. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.

**01/2008:0696**
**corrigé 6.0**

# VACCIN VIVANT DE LA RHINOTRACHÉITE INFECTIEUSE BOVINE

## Vaccinum rhinotracheitidis infectivae bovinae vivum

## 1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de la rhinotrachéite infectieuse bovine est une préparation d'une ou de plusieurs souches appropriées du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (herpesvirus 1 bovin). Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des bovins contre la rhinotrachéite infectieuse bovine, causée par l'herpèsvirus 1 bovin.

## 2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des bovins auxquels le vaccin est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1), Pouvoir abortif et passage à travers le placenta (section 2-3-2), Augmentation de la virulence (section 2-3-3) et Pouvoir immunogène (section 2-3-4) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination. Utilisez le virus au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin.

Pour chaque essai, utilisez au minimum 5 veaux âgés de 3 mois ou de l'âge minimal recommandé pour la vaccination si celui-ci est inférieur à 3 mois, exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. Administrez à chaque veau une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin. Observez les veaux au moins une fois par jour pendant 21 jours.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun des veaux ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal.

2-3-2. **Pouvoir abortif et passage à travers le placenta**. Utilisez au moins 24 vaches gravides exemptes d'anticorps dirigés contre le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine : 8 sont dans le 4$^{e}$ mois de gestation, 8 dans le 5$^{e}$ et 8 dans le 6$^{e}$ ou le 7$^{e}$ mois. Administrez à chaque vache par une voie recommandée une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin. Observez les vaches au moins une fois par jour jusqu'à la fin de la gestation.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si :

- lorsqu'il se produit un avortement, les recherches du virus de la rhinotrachéite bovine n'indiquent la présence ni de virus ni d'antigènes viraux dans le foetus ou le placenta,
- sur les veaux nés à terme avant la prise de colostrum, une recherche d'anticorps dirigés contre le virus de la rhinotrachéite bovine indique que de tels anticorps ne sont pas détectés.

2-3-3. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin, aux 5 veaux ayant servi à l'essai de l'innocuité, puis à effectuer des passages successifs, 5 si possible, sur d'autres groupes similaires et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Ces veaux sont âgés de 3 mois ou de l'âge minimal recommandé pour la vaccination si celui-ci est inférieur à 3 mois, et exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. Si les propriétés du virus vaccinal permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon, effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents.

Effectuez des prélèvements appropriés chez les 5 veaux ayant servi à l'essai de l'innocuité, au moment où le virus vaccinal est aisément détectable, vérifiez la présence et le titre du virus dans ces prélèvements et mélangez-les. Administrez-les par voie intranasale à 2 autres veaux de même âge et exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la rhinotrachéite bovine. Procédez ainsi à 5 passages au minimum, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun veau ne présente de signes attribuables au virus vaccinal et si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal. Le virus vaccinal satisfait aussi à l'essai si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde séries.

2-3-4. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des veaux âgés de 2-3 mois. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque veau n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin. Utilisez au moins 7 veaux exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. Administrez le virus vaccinal à au moins 5 veaux, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 2 autres comme témoins. Après 21 jours, soumettez tous les veaux à une épreuve virulente en leur administrant par voie intranasale une quantité suffisante d'une forme virulente du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. Observez les veaux au moins une fois par jour pendant 21 jours à compter de l'épreuve.

L'essai n'est pas valable si les témoins ne présentent pas de signes typiques de la maladie tels que fièvre, jetage, larmoiement et ulcération de la muqueuse nasale.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve :

- les veaux vaccinés présentent tout au plus des signes bénins ;
- chez au moins 4 des 5 veaux vaccinés, le titre maximal en virus dans le mucus nasal est inférieur à la moyenne des titres maximaux trouvés chez les veaux témoins d'au moins 100 fois ;
- et la moyenne du nombre de jours où le virus est excrété est inférieure d'au moins 3 jours chez les veaux vaccinés par rapport aux témoins.

## 3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**

3-1-1. Le vaccin mélangé à une quantité appropriée d'un immunosérum monospécifique n'est plus en mesure d'infecter des cultures cellulaires sensibles dans lesquelles il a été inoculé.

3-1-2. Les marqueurs éventuels de la souche sont contrôlés.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes** (*2.6.7*). Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes.

3-4. **Agents étrangers**. Neutralisez le virus vaccinal à l'aide d'un immunosérum monospécifique approprié dirigé contre le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine et inoculez le mélange à des cultures cellulaires sensibles aux virus pathogènes pour les bovins. Effectuez un passage à 7 jours et maintenez les cultures pendant 14 jours. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne se produit pas d'effet cytopathogène et s'il n'est observé aucun signe de la présence d'agents hémadsorbants.

3-5. **Innocuité**. Utilisez 2 veaux âgés de 3 mois ou de l'âge minimal recommandé pour la vaccination si celui-ci est inférieur à 3 mois, exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. Administrez à chaque veau par une voie recommandée 10 doses de vaccin. Observez les veaux au moins une fois par jour pendant 21 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des veaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des cultures cellulaires appropriées à une température qui favorise la multiplication du virus. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans une dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-4) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.

**01/2008:1206**

# VACCIN VIVANT DE LA RHINOTRACHÉITE VIRALE DU CHAT

## Vaccinum rhinotracheitidis viralis felinae vivum

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de la rhinotrachéite virale du chat est une préparation d'une souche appropriée du virus de la rhinotrachéite du chat (virus herpès félin type 1). Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des chats contre la rhinotrachéite virale du chat.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des chats auxquels le vaccin est destiné (y compris l'innocuité pour la chatte gestante si le vaccin n'est pas contre-indiqué chez ces chattes).

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1), Augmentation de la virulence (section 2-3-2) et Pouvoir immunogène (section 2-3-3) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination, en utilisant dans chaque cas des chats de l'âge minimal recommandé. Utilisez le virus au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin.

Pour chaque essai, utilisez au minimum 10 chats exempts d'anticorps dirigés contre l'herpèsvirus félin type 1. Administrez à chaque chat une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin. Observez les chats au moins une fois par jour pendant 21 jours.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun chat ne présente de réaction anormale, locale ou générale, de signes de maladie ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal.

2-3-2. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin, à 2 chats exempts d'anticorps dirigés contre l'herpèsvirus félin type 1, puis à effectuer des passages successifs, 5 si possible, sur d'autres groupes similaires et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Si les propriétés du virus vaccinal permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon, effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents.

Administrez à chaque chat par une voie recommandée une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après. Choisissez, parmi les voies d'administration recommandées, celle réputée la plus favorable au retour à la virulence. Après 2-4 jours, prélevez le mucus nasal, les amygdales et les ganglions lymphatiques locaux et la trachée de chaque chat. Mélangez-les, broyez-les dans 10 mL de solution saline tamponnée puis décantez. Administrez 1 mL du surnageant par voie intranasale à 2 autres chats. Procédez ainsi à 5 passages au minimum, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages.

Effectuez l'essai d'innocuité (section 2-3-1) au moyen du virus vaccinal avant passage et du virus au niveau de passage maximal où le réisolement a été possible.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal ou si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde séries.

2-3-3. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des chats âgés de 8-12 semaines. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque chat n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

Utilisez au moins 20 chats exempts d'anticorps dirigés contre l'herpèsvirus félin type 1. Administrez le virus vaccinal à au moins 10 chats, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 10 autres comme témoins. Après 4 semaines, soumettez tous les chats à une épreuve virulente en leur administrant par voie intranasale une quantité de suspension d'une forme virulente de l'herpèsvirus félin type 1, suffisante pour provoquer des signes typiques de maladie tels que fièvre, écoulement nasal, toux. Observez les chats au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de l'épreuve.

Effectuez un lavage nasal quotidien du 2$^{e}$ au 14$^{e}$ jour suivant l'épreuve virulente afin de déterminer l'excrétion du virus. Relevez quotidiennement la température ainsi que les signes de maladie selon la grille de cotation ci-après.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, la notation des chats vaccinés est inférieure de façon significative à celle des témoins.

| **Signes observés** | **Cote** |
|---|---|
| Mort | 10 |
| Etat dépressif | 2 |
| Température : | |
| 39,5-40,0 °C | 1 |
| ≥ 40,0 °C | 2 |
| ≤ 37,0 °C | 3 |
| Glossite | 3 |
| Ecoulement nasal léger | 1 |
| Ecoulement nasal abondant | 2 |
| Toux | 2 |
| Eternuements | 1 |
| Eternuements paroxystiques | 2 |
| Ecoulement oculaire léger | 1 |
| Ecoulement oculaire abondant | 2 |
| Conjonctivite | 2 |
| Perte de poids ≥ 5,0 pour cent | 5 |
| Excrétion virale (nombre total de jours) : | |
| ≤ 4 jours | 1 |
| 5-7 jours | 2 |
| > 7 jours | 3 |

Vaccins

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Mélangé à un immunosérum monospécifique, le vaccin n'est plus en mesure d'infecter des cultures cellulaires sensibles dans lesquelles il a été inoculé.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes** (*2.6.7*). Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes.

3-4. **Agents étrangers**. Neutralisez le virus vaccinal à l'aide d'un immunosérum monospécifique approprié dirigé contre l'herpèsvirus félin type 1 et inoculez le mélange à des cultures cellulaires sensibles aux virus pathogènes pour le chat. Effectuez au moins un passage et maintenez les cultures pendant 14 jours. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne se produit pas d'effet cytopathogène et s'il n'est observé aucun signe de la présence d'agents hémadsorbants.

3-5. **Innocuité**. Utilisez 2 chats de l'âge minimal recommandé, exempts d'anticorps dirigés contre l'herpèsvirus félin type 1. Administrez à chaque chat par une voie recommandée 10 doses de vaccin. Observez les chats au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun chat ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des cultures cellulaires appropriées et à une température qui favorise la multiplication du virus. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans une dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-3) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.

**01/2008:1956**

# VACCIN VIVANT DE LA TÉNOSYNOVITE VIRALE AVIAIRE

## Vaccinum tenosynovitidis viralis aviariae vivum

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de la ténosynovite virale aviaire est une préparation d'une souche appropriée du virus de la ténosynovite virale aviaire (orthoréovirus aviaire). La présente monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des poulets.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation de vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *LOTS DE SEMENCE*

2-3-1. **Agents étrangers**. Le lot de semence primaire satisfait à l'essai des agents étrangers dans les lots de semence (*2.6.24*). Lors de ces essais sur lot de semence primaire, utilisez des organismes n'ayant pas subi, en début d'essai, plus de 5 passages depuis le lot de semence primaire.

2-4. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des poulets auxquels le vaccin est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-4-1), Augmentation de la virulence (section 2-4-2) et Pouvoir immunogène (section 2-4-3) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et le pouvoir immunogène.

2-4-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination, en utilisant dans chaque cas des poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Utilisez le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin. Pour chaque essai, utilisez au minimum 20 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez à chaque poulet une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans 1 dose de vaccin. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. Procédez à un examen histologique des articulations et des gaines tendineuses de la patte à la fin de la période d'observation (pour servir de base à la comparaison de l'essai d'accroissement de virulence). L'essai n'est pas valable si plus de 10 pour cent des poulets meurent de causes non attribuables au virus vaccinal. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun des poulets ne présente de signes cliniques notables de la ténosynovite virale aviaire ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal.

2-4-2. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin, à un groupe de 5 poussins âgés de 1 jour et issus d'un élevage EOPS (*5.2.2*), puis à effectuer des passages successifs, 5 si possible, sur d'autres groupes similaires de poussins âgés de 1 jour, et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Si les propriétés du virus vaccinal permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon, effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents. Administrez par une voie appropriée une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après. Euthanasiez les poulets au moment où la concentration en virus dans le matériel le plus approprié (par exemple tendons, gaines tendineuses et liquides exsudés des articulations tibio-métatarsiennes, rate) est suffisante. Préparez pour chaque poulet une suspension de ce matériel. Mélangez les suspensions et administrez 0,1 mL du mélange à 5 autres poulets de même âge et de même origine, par la voie la plus susceptible de conduire à un accroissement de virulence. Procédez ainsi à 5 passages au minimum, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages. Effectuez l'essai d'innocuité (section 2-4-1) en utilisant le virus vaccinal n'ayant subi aucun passage et le virus vaccinal au niveau de passage maximal où le réisolement a été possible. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun signe d'accroissement de la virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus ayant subi le plus grand nombre de passages. Si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde série, le virus vaccinal satisfait également à l'essai.

2-4-3. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque poulet n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette, et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera

Vaccins

présent dans un lot de vaccin. Utilisez au moins 30 poulets de même origine et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez le vaccin par l'une des voies recommandées à au moins 20 de ces poulets. Gardez-en au minimum 10 autres comme témoins. Après 21 jours, soumettez tous les poulets à une épreuve virulente en leur administrant à chacun, par une voie appropriée, une quantité suffisante d'une forme virulente du virus de la ténosynovite virale aviaire. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 21 jours à compter de l'épreuve. Notez les morts et le nombre d'animaux survivants qui présentent des signes cliniques de la ténosynovite virale aviaire. Si l'épreuve est administrée par voie intraplantaire, une enflure passagère du coussinet plantaire dans les 5 jours suivant l'épreuve peut être considérée comme non spécifique. A la fin de la période d'observation, euthanasiez tous les poulets survivants et procédez à un examen macroscopique et/ou microscopique pour rechercher des lésions (par exemple exsudats et enflure) des articulations et des gaines tendineuses de la patte. L'essai n'est pas valable si :

– au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, moins de 80 pour cent des témoins meurent ou présentent des signes cliniques sévères de la ténosynovite virale aviaire ou présentent des lésions macroscopiques et/ou microscopiques des articulations et des gaines tendineuses de la patte,
– ou dans l'intervalle de temps séparant la vaccination de l'épreuve, plus de 10 pour cent des poulets témoins ou vaccinés présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, au moins 90 pour cent des poulets vaccinés survivent sans présenter de signes cliniques notables de la ténosynovite virale aviaire ni de lésions macroscopiques et/ou microscopiques des articulations et des gaines tendineuses de la patte.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Effectuez un essai d'immunomarquage en cultures cellulaires pour identifier le virus vaccinal.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**

Les vaccins destinés à une administration par injection satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

Les vaccins qui ne sont pas destinés à une administration par injection satisfont soit à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)* soit à l'essai suivant : effectuez un essai quantitatif pour le contrôle de la contamination bactérienne et fongique ; effectuez des essais pour identifier les microorganismes retrouvés dans le vaccin ; le vaccin ne contient pas de microorganisme pathogène et contient au maximum 1 microorganisme non pathogène par dose.

Tout liquide fourni avec le vaccin satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes**. Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes (*2.6.7*).

3-4. **Agents étrangers**. Le vaccin satisfait aux essais des agents étrangers dans les lots de produit fini (*2.6.25*).

3-5. **Innocuité**. Utilisez au minimum 10 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*), de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Administrez à chaque poulet, par une voie et une méthode recommandées, 10 doses de vaccin. Observez les animaux au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 20 pour cent des poulets présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des poulets ne présente de signes cliniques notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*). Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans 1 dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait à l'essai décrit sous Pouvoir immunogène (section 2-4-3), lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer l'essai d'activité sur chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.

**01/2008:0649**

# VACCIN VIVANT DE LA VARIOLE DES GALLINACÉS

## Vaccinum variolae gallinaceae vivum

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de la variole des gallinacés est une préparation d'une souche appropriée de virus de la variole aviaire. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des poulets.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poules embryonnés ou en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Oeufs de poules embryonnés**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poules embryonnés, ils proviennent d'élevages exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*).

2-2-2. **Cultures cellulaires**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des cultures cellulaires, elles sont conformes aux spécifications pour les cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *LOTS DE SEMENCE*

2-3-1. **Agents étrangers**. Le lot de semence primaire satisfait à l'essai des agents étrangers dans les lots de semence (*2.6.24*). Lors de ces essais sur lot de semence primaire, utilisez des organismes n'ayant pas subi, en début d'essai, plus de 5 passages depuis le lot de semence primaire.

2-4. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des poulets auxquels le vaccin est destiné.
Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-4-1), Augmentation de la virulence (section 2-4-2) et Pouvoir immunogène (section 2-4-3) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et le pouvoir immunogène.

2-4-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies d'administration et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Utilisez le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin. Pour chaque essai, utilisez au minimum 20 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez à chaque poulet une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans 1 dose de vaccin. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 10 pour cent des poulets meurent de causes non attribuables au virus vaccinal. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun des poulets ne présente de signes cliniques notables de la variole des gallinacés ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal.

Vaccins

2-4-2. **Augmentation de la virulence**. A 5 poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*), administrez une quantité de virus vaccinal par une voie appropriée permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après. Utilisez le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin. Après 4-7 jours, préparez pour chaque poulet une suspension de prélèvements provenant des lésions cutanées provoquées. Mélangez ces suspensions et administrez par scarification cutanée de la crête ou d'une autre partie du corps dénuée de plumes, ou par une autre méthode appropriée, 0,2 mL du mélange à 5 autres poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Procédez ainsi à au moins 5 passages, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages. Effectuez l'essai Innocuité (section 2-4-1) au moyen du virus vaccinal avant passage et du virus au niveau de passage maximal où le réisolement a été possible. Choisissez, parmi les voies d'administration recommandées, celle réputée la plus défavorable du point de vue de l'innocuité. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal, ou si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde série.

2-4-3. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies d'administration et des méthodes d'administration recommandées en utilisant dans chaque cas des poulets qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque poulet n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette, et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin. Utilisez au moins 30 poulets de même origine et provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez le virus vaccinal par l'une des voies recommandées au moins à 20 de ces poulets et gardez-en au minimum 10 autres comme témoins. Après 21 jours, soumettez tous les poulets à une épreuve virulente en leur administrant par voie folliculaire une quantité suffisante d'une forme virulente du virus de la variole des gallinacés. Observez tous les poulets au moins 1 fois par jour pendant 21 jours à compter de l'épreuve. Notez les morts et le nombre de poulets survivants qui présentent des signes cliniques de la variole des gallinacés. Examinez chacun des poulets survivants pour rechercher des lésions macroscopiques : lésions cutanées de la crête, du fanon et d'autres surfaces cutanées dépourvues de plumes, et lésions diphtériques des membranes muqueuses de la région de l'oropharynx. L'essai n'est pas valable si :

– au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, moins de 90 pour cent des poulets témoins meurent ou présentent des signes cliniques sévères de la variole des gallinacés, notamment des lésions macroscopiques notables de la peau et des membranes muqueuses de la région de l'oropharynx,
– et/ou, dans l'intervalle de temps séparant la vaccination de l'épreuve, plus de 10 pour cent des poulets témoins ou vaccinés présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, au moins 90 pour cent des poulets vaccinés survivent sans présenter de signes cliniques notables de la variole des gallinacés, notamment des lésions macroscopiques de la peau et des membranes muqueuses de la région de l'oropharynx.

## 3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Effectuez un essai d'immunomarquage en cultures cellulaires pour démontrer la présence du virus vaccinal. Pour les souches adaptées aux oeufs, inoculez le vaccin dans des oeufs et notez les lésions caractéristiques.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**

Les vaccins pour administration par injection, scarification ou transfixion satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

Les vaccins qui ne sont pas pour administration par injection, scarification ou transfixion satisfont soit à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)* soit à l'essai suivant : effectuez le contrôle de la contamination bactérienne et fongique par une technique quantitative ; effectuez des essais pour identifier les microorganismes retrouvés dans le vaccin ; le vaccin ne contient pas de microorganisme pathogène et contient au maximum 1 microorganisme non pathogène par dose.

Tout liquide fourni avec le vaccin satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes**. Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes (*2.6.7*).

3-4. **Agents étrangers**. Le vaccin satisfait aux essais des agents étrangers dans les lots de produit fini (*2.6.25*).

3-5. **Innocuité**. Utilisez au minimum 10 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*), de l'âge minimal recommandé pour la vaccination ; si celui-ci est supérieur à 6 semaines, l'essai peut être effectué sur des poulets âgés de 6 semaines. Administrez par une voie recommandée 10 doses de vaccin à chaque poulet. Observez les animaux au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 20 pour cent des poulets présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des poulets ne présente de signes cliniques notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des oeufs de poules embryonnés provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) ou à des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*). Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans 1 dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-4-3) lorsqu'il est administré par une voie et par une méthode recommandées, et selon le schéma recommandé. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.



**01/2008:0588**

# VACCIN VIVANT DE L'ENCÉPHALOMYÉLITE INFECTIEUSE AVIAIRE

## Vaccinum encephalomyelitidis infectivae aviariae vivum

## 1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de l'encéphalomyélite infectieuse aviaire est une préparation d'une souche appropriée du virus de l'encéphalomyélite infectieuse aviaire. La présente monographie s'applique aux vaccins destinés à être administrés à des poulets reproducteurs, hors période de ponte pour la protection passive de leur progéniture à venir et/ou pour la prévention de la transmission du virus par les oeufs.

## 2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poules embryonnés ou en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Oeufs de poules embryonnés**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poules embryonnés, ils proviennent d'élevages exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*).

2-2-2. **Cultures cellulaires**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des cultures cellulaires, elles sont conformes aux spécifications pour les cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *LOTS DE SEMENCE*

2-3-1. **Agents étrangers**. Le lot de semence primaire satisfait à l'essai des agents étrangers dans les lots de semence (*2.6.24*). Lors de ces essais sur lot de semence primaire, utilisez des organismes n'ayant pas subi, en début d'essai, plus de 5 passages depuis le lot de semence primaire.

2-4. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des poulets auxquels le vaccin est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-4-1), Augmentation de la virulence (section 2-4-2) et Pouvoir immunogène (section 2-4-3) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et le pouvoir immunogène.

2-4-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies d'administration et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination, sur des poulets reproducteurs hors période de ponte qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Utilisez le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin. Pour chaque essai, utilisez au minimum 20 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Administrez à chacun d'eux une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans 1 dose de vaccin. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 10 pour cent des poulets présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au virus vaccinal. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun des poulets ne présente de signes cliniques notables de l'encéphalomyélite infectieuse aviaire ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal.

2-4-2. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin, à un groupe de 5 poulets âgés de 1 jour et issus d'un élevage EOPS (*5.2.2*), puis à effectuer des passages successifs sur d'autres groupes similaires, 5 si possible, de poulets âgés de 1 jour, et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Si les propriétés du virus vaccinal permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon, effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents. Administrez par une voie et une méthode recommandées, une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après. Après 5-7 jours, préparez une suspension de tissu cérébral de chaque poussin. Mélangez ces suspensions, et administrez par voie orale un volume approprié du mélange à 5 autres poussins de même âge et de même origine. Procédez ainsi à au moins 5 passages, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages. Effectuez l'essai Innocuité (section 2-4-1) au moyen du virus vaccinal avant passage et du virus vaccinal au niveau de passage maximal où le réisolement a été possible. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal, ou si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde série.

2-4-3. **Pouvoir immunogène**. Si le vaccin est recommandé pour la protection passive de la progéniture à venir, effectuez l'essai 2-4-3-1. Si le vaccin est recommandé pour la prévention de la transmission du virus par les oeufs, effectuez l'essai 2-4-3-2. Effectuez l'essai pour chacune des voies d'administration et des méthodes d'administration recommandées, en utilisant dans chaque cas des poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*), qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque poulet n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette, et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

2-4-3-1. *Immunité passive chez le poussin*. Vaccinez au moins 20 poules provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*). Maintenez séparément au moins 10 poules, de même âge et de même origine, comme témoins. Au pic de ponte, faites éclore au moins 25 poulets des oeufs provenant de poules vaccinées et 10 poulets des oeufs provenant de poules non vaccinées. A l'âge de 2 semaines, soumettez à une épreuve virulente tous les poulets en leur administrant par voie intracérébrale une quantité suffisante d'une forme virulente du virus de l'encéphalomyélite aviaire. Observez les poulets au moins 1 fois par jour pendant 21 jours après l'épreuve. Notez les morts et le nombre de poulets survivants qui présentent des signes cliniques de l'encéphalomyélite infectieuse aviaire. L'essai n'est pas valable si :

- au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, moins de 80 pour cent des poulets témoins meurent ou présentent des signes cliniques sévères de l'encéphalomyélite infectieuse aviaire,
- et/ou, dans l'intervalle de temps séparant la vaccination de l'épreuve, plus de 15 pour cent des poulets témoins ou vaccinés présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, au moins 80 pour cent des poulets provenant de poules vaccinées survivent sans présenter de signes cliniques notables de l'encéphalomyélite infectieuse aviaire.

2-4-3-2. *Immunité passive chez l'embryon*. Vaccinez au moins 20 poules provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2.*). Maintenez séparément au moins 10 poules comme témoins. Au pic de ponte, incubez au moins 36 oeufs issus des 2 groupes, vaccinés et témoins, puis effectuez un essai de sensibilité de l'embryon. Inoculez à chaque oeuf par voie vitelline au 6[e] jour d'incubation 100 $DIO_{50}$ de la souche Van Roekel de virus de l'encéphalomyélite infectieuse aviaire. 12 jours après l'inoculation, procédez à une recherche des lésions spécifiques de l'encéphalomyélite infectieuse aviaire au niveau des embryons (atrophie musculaire). La mortalité des premières 24 h est considérée comme non spécifique. L'essai n'est pas valable si moins de 80 pour cent des embryons peuvent être évalués ou si moins de 80 pour cent des embryons témoins présentent des lésions de l'encéphalomyélite infectieuse aviaire. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si au moins 80 pour cent des embryons du groupe vacciné ne présentent aucune lésion de l'encéphalomyélite infectieuse aviaire.

## 3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Mélangez le vaccin, dilué si nécessaire, à un immunosérum monospécifique du virus de l'encéphalomyélite infectieuse aviaire : le vaccin n'exerce plus de pouvoir infectieux lorsqu'il est inoculé à des oeufs de poules embryonnés provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) ou à des cultures cellulaires sensibles (*5.2.4*).

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**

Les vaccins destinés à une administration par injection satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062).*

Les vaccins qui ne sont pas destinés à une administration par injection satisfont soit à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)* soit à l'essai suivant : effectuez un essai quantitatif pour le contrôle de la contamination bactérienne et fongique ; effectuez des essais pour identifier les microorganismes retrouvés dans le vaccin ; le vaccin ne contient pas de microorganisme pathogène et contient au maximum 1 microorganisme non pathogène par dose.

Tout liquide fourni avec le vaccin satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062).*

3-3. **Mycoplasmes**. Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes (*2.6.7*).

3-4. **Agents étrangers**. Le vaccin satisfait aux essais des agents étrangers dans les lots de produit fini (*2.6.25*).

3-5. **Innocuité**. Utilisez au minimum 10 poulets provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*), de l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Administrez à chaque poulet, par une voie et une méthode recommandées, 10 doses de vaccin. Observez les animaux au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 20 pour cent des poulets présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des poulets ne présente de signes cliniques notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des oeufs de poules embryonnés provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) ou à des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*). Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans 1 dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. En fonction des indications, le vaccin satisfait aux exigences de l'un ou des 2 essais prescrits sous Pouvoir immunogène (sections 2-4-3-1, 2-4-3-2) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.

**01/2008:1315**

# VACCIN VIVANT DE L'HÉPATITE VIRALE DU CANARD, TYPE I

## Vaccinum hepatitidis viralis anatis stirpe I vivum

### 1. DÉFINITION

Le vaccin vivant de l'hépatite virale du canard, type I, est une préparation d'une souche appropriée du virus de l'hépatite virale du canard, type I. La présente monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des canards reproducteurs en vue d'assurer une protection passive de leur descendance et/ou à l'immunisation active des canetons.

### 2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poules embryonnés ou en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Oeufs de poules embryonnés**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des oeufs de poules embryonnés, ils proviennent d'élevages exempts de microorganismes pathogènes spécifiés (EOPS) (*5.2.2*).

2-2-2. **Cultures cellulaires**. Si le virus vaccinal est multiplié dans des cultures cellulaires, elles sont conformes aux spécifications pour les cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *LOTS DE SEMENCE*

2-3-1. **Agents étrangers**. Le lot de semence primaire satisfait à l'essai des agents étrangers dans les lots de semence (*2.6.24*). Lors de ces essais sur lot de semence primaire, utilisez des organismes n'ayant pas subi, en début d'essai, plus de 5 passages depuis le lot de semence primaire.

2-4. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des canards auxquels le vaccin est destiné.
Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-4-1), Augmentation de la virulence (section 2-4-2) et Pouvoir immunogène (section 2-4-3) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et le pouvoir immunogène.

2-4-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies d'administration et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination, en utilisant dans chaque cas des canards qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. Utilisez le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin. Pour chaque essai, utilisez au minimum 20 canetons domestiques (*Anas platyrhynchos*) réceptifs qui ne possèdent pas d'anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite virale du canard, type I. Administrez à chaque caneton une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans 1 dose de vaccin. Observez les canetons au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 10 pour cent des canetons meurent de causes non attribuables au virus vaccinal. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun des canetons ne présente de signes cliniques notables de l'hépatite virale du canard, ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal.

2-4-2. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué qui sera présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin à un groupe de 5 canetons domestiques âgés de 1 jour et n'ayant pas d'anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite virale du canard, type I, puis à effectuer des passages successifs, 5 si possible, sur d'autres groupes similaires de canetons âgés de 1 jour et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Si les propriétés du virus vaccinal permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon, effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents. Administrez par voie oronasale une quantité de virus vaccinal permettant de réisoler le virus lors des passages décrits ci-après. 2-4 jours plus tard, effectuez sur chaque caneton un prélèvement de tissus hépatiques. Réunissez les échantillons prélevés. Administrez par voie oronasale 1 mL de cette suspension hépatique à 5 autres canetons domestiques séronégatifs, âgés de 1 jour. Effectuez l'opération à 5 reprises, en vérifiant la présence du virus à chaque passage. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages. Observez les animaux qui ont reçu le dernier passage au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. Pour évaluer le degré d'accroissement de virulence, comparez les résultats obtenus avec le virus n'ayant pas subi de passage dans les études d'innocuité, avec ceux obtenus avec le virus ayant subi le nombre maximal de passages. Si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde série, il est considéré qu'il ne présente pas d'augmentation de la virulence.

Vaccins

2-4-3. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies d'administration et des méthodes d'administration recommandées en utilisant dans chaque cas des canards domestiques qui ont au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque oiseau n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette, et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

2-4-3-1. *Vaccins destinés à l'immunisation passive des canetons*. Utilisez au moins 15 canes pondeuses ou canes destinées à la ponte, selon le cas, de même origine et ne possédant pas d'anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite du canard, type I. Vaccinez au moins 10 de ces canes selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 5 autres comme témoins. A partir de 4 semaines à compter du début de la ponte, collectez les oeufs embryonnés provenant des canes vaccinées et des canes témoins, et placez-les en incubation. A l'âge de 1 semaine, soumettez à une épreuve virulente au moins 20 canetons représentatifs du groupe des canes vaccinées et au moins 10 canetons issus des canes témoins en leur administrant par voie oronasale une quantité suffisante d'une forme virulente du virus de l'hépatite virale du canard, type I. Observez les canetons au moins 1 fois par jour pendant 14 jours à compter de l'épreuve. Notez les morts et le nombre de canetons survivants qui présentent des signes cliniques de l'hépatite virale du canard. L'essai n'est pas valable si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, moins de 70 pour cent des canetons issus de canes témoins meurent ou présentent des signes typiques de la maladie et/ou si, dans l'intervalle de temps séparant la vaccination de la collecte des oeufs, plus de 10 pour cent des canes témoins ou vaccinées présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, le taux de protection relatif calculé à l'aide de l'expression suivante est d'au moins 80 pour cent.

$$\frac{V - C}{100 - C} \times 100$$

$V$ = pourcentage de canetons éprouvés, issus de canes vaccinées, qui survivent jusqu'à la fin de la période d'observation sans présenter de signes cliniques de la maladie.

$C$ = pourcentage de canetons éprouvés, issus de canes témoins non vaccinées, qui survivent jusqu'à la fin de la période d'observation sans présenter de signes cliniques de la maladie.

2-4-3-2. *Vaccins destinés à l'immunisation active des canetons*. Utilisez au moins 30 canetons de même origine et ne possédant pas d'anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite du canard, type I. Administrez le virus vaccinal par l'une des voies recommandées à au moins 20 de ces canetons et gardez-en au minimum 10 autres comme témoins. Après au moins 5 jours, soumettez tous les canetons à une épreuve virulente en leur administrant par voie oronasale une quantité suffisante d'une forme virulente du virus de l'hépatite virale du canard, type I. Observez tous les canetons au moins 1 fois par jour pendant 14 jours à compter de l'épreuve. Notez les morts et le nombre d'animaux survivants qui présentent des signes cliniques de l'hépatite virale du canard. L'essai n'est pas valable si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, moins de 70 pour cent des canetons témoins meurent ou présentent des signes typiques de la maladie et/ou si, dans l'intervalle de temps séparant la vaccination de l'épreuve, plus de 10 pour cent des canetons témoins ou vaccinés présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, le taux de protection relatif calculé à l'aide de l'expression suivante est d'au moins 80 pour cent.

$$\frac{V - C}{100 - C} \times 100$$

$V$ = pourcentage de canetons vaccinés, puis soumis à l'épreuve virulente, qui survivent jusqu'à la fin de la période d'observation sans présenter de signes cliniques de la maladie.

$C$ = pourcentage de canetons témoins soumis à l'épreuve virulente qui survivent jusqu'à la fin de la période d'observation sans présenter de signes cliniques de la maladie.

## 3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Mélangez le vaccin, dilué si nécessaire, à un immunosérum monospécifique du virus de l'hépatite virale du canard, type I : le vaccin n'exerce plus de pouvoir infectieux lorsqu'il est inoculé à des oeufs de poules embryonnés provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) ou à des cultures cellulaires sensibles (*5.2.4*).

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Les vaccins pour administration par injection satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

Les vaccins qui ne sont pas pour administration par injection satisfont soit à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)* soit à l'essai suivant : effectuez le contrôle de la contamination bactérienne et fongique par une technique quantitative ; effectuez des essais pour identifier les microorganismes retrouvés dans le vaccin ; le vaccin ne contient pas de microorganisme pathogène et contient au maximum 1 microorganisme non pathogène par dose.

Tout liquide fourni avec le vaccin satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes**. Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes (*2.6.7*).

3-4. **Agents étrangers**. Le vaccin satisfait aux essais des agents étrangers dans les lots de produit fini (*2.6.25*).

3-5. **Innocuité**. Utilisez au minimum 10 canards domestiques ne possédant pas d'anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite virale du canard, type I, de l'âge minimal recommandé pour la vaccination ; si celui-ci est supérieur à 2 semaines, l'essai peut être effectué sur des canards âgés de 2 semaines. Administrez à chaque canard, par une voie et une méthode recommandées, 10 doses de vaccin. Observez les canards au moins 1 fois par jour pendant 21 jours. L'essai n'est pas valable si plus de 20 pour cent des canards présentent des signes cliniques anormaux ou meurent de causes non attribuables au vaccin. Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des canards ne présente de signes cliniques notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des oeufs de poules embryonnés provenant d'un élevage EOPS (*5.2.2*) ou à des cultures cellulaires appropriées (*5.2.4*). Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans 1 dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Selon les indications, le vaccin satisfait aux exigences de l'un ou des 2 essais prescrits sous Pouvoir immunogène (section 2-4-3) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.

## 4. ÉTIQUETAGE

S'il a été démontré que le virus vaccinal peut présenter un retour à la virulence, l'étiquette indique les précautions nécessaires afin d'éviter la transmission de virus virulent à des canetons non vaccinés.

**01/2008:1176**
**corrigé 6.0**

# VACCIN VIVANT DU VIRUS PARAINFLUENZA BOVIN

## Vaccinum viri parainfluenzae bovini vivum

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant du virus parainfluenza bovin est une préparation d'une souche appropriée du virus parainfluenza 3 bovin. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des bovins contre l'infection par le virus parainfluenza bovin.

2. PRODUCTION

2-1. *PREPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des bovins auxquels le vaccin est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1), Augmentation de la virulence (section 2-3-2) et Pouvoir immunogène (section 2-3-3) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination. Utilisez le virus au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin.

Pour chaque essai, utilisez au minimum 5 veaux de l'âge minimal recommandé pour la vaccination et de préférence exempts d'anticorps dirigés contre le virus parainfluenza 3 bovin ou, dans des cas justifiés, utilisez des veaux ayant un très faible taux de ces anticorps, qui n'ont pas été vaccinés contre le virus parainfluenza bovin et pour qui l'administration du vaccin n'entraîne pas de réponse anamnestique. Administrez à chaque veau une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin. Observez les veaux au moins une fois par jour pendant 21 jours. Enregistrez leur température corporelle pendant le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination et pendant les 4 jours suivants.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai s'il n'est constaté aucune variation anormale de la température corporelle et si aucun des veaux ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal.

2-3-2. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin, à 2 veaux exempts d'anticorps dirigés contre le virus parainfluenza 3 bovin, puis à effectuer des passages successifs, 5 si possible, sur d'autres groupes similaires et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Si les propriétés du virus vaccinal permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon, effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents.

Administrez à chaque veau par voie intranasale une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après. A partir du 3$^{e}$ jour après l'administration du virus et jusqu'au 7$^{e}$ jour, effectuez quotidiennement des écouvillonnages de la cavité nasale et mettez les prélèvements en suspension dans 5 mL au maximum d'un milieu approprié. Inoculez ces suspensions à des cultures cellulaires pour vérifier la présence du virus. Administrez environ 1 mL de celles de ces suspensions qui, d'après le titrage en cultures cellulaires, possèdent le titre en virus le plus élevé, à 2 autres veaux de même âge. Procédez ainsi à 5 passages au minimum, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun veau ne présente de signes attribuables au virus vaccinal et si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal ; on tiendra compte du titre en virus obtenu dans les prélèvements de la cavité nasale. Le virus vaccinal satisfait aussi à l'essai si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde séries.

2-3-3. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des veaux de l'âge minimal recommandé. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque veau n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

Utilisez au moins 10 veaux exempts d'anticorps dirigés contre le virus parainfluenza 3 bovin ; des veaux ayant un faible taux d'anticorps contre le virus parainfluenza 3 bovin peuvent être utilisés s'il a été démontré que l'essai est valable dans ces conditions. Effectuez des prélèvements de sérum sur les veaux avant la vaccination, 7 jours et 14 jours après la vaccination et juste avant l'épreuve virulente. Administrez le virus vaccinal à au moins 5 veaux, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 5 autres comme témoins. Après 21 jours, soumettez tous les veaux à une épreuve virulente en leur administrant par voie respiratoire une quantité suffisante de suspension d'une forme virulente du virus parainfluenza 3 bovin à un niveau de passage faible. Observez les veaux au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de l'épreuve et exercez une surveillance sur les signes, notamment respiratoires et l'excrétion du virus (par écouvillonnage de la cavité nasale ou par lavage trachéobronchial).

L'essai n'est pas valable si des recherches d'anticorps contre le virus parainfluenza 3 bovin effectuées sur les sérums indiquent la présence d'une infection intercurrente par le virus pendant l'essai ou si plus de 2 veaux témoins ne présentent pas d'excrétion du virus d'épreuve comme en témoignent les échantillons prélevés par écouvillonnage de la cavité nasale ou par lavage trachéobronchial. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, chez les veaux vaccinés par rapport au groupe témoin, il y a :

- une réduction significative du titre moyen et de la durée moyenne d'excrétion du virus,
- une réduction notable des signes locaux et généraux (si le virus d'épreuve employé provoque de tels signes).

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Effectuez un essai par immunomarquage, avec un immunosérum monospécifique, sur des cultures cellulaires appropriées.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes** (*2.6.7*). Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes.

3-4. **Agents étrangers**. Neutralisez le virus vaccinal à l'aide d'un immunosérum monospécifique approprié dirigé contre le virus parainfluenza 3 bovin et inoculez le mélange à des

Vaccins

cultures cellulaires sensibles aux virus pathogènes pour les bovins. Effectuez au moins un passage et maintenez les cultures pendant 14 jours. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne se produit pas d'effet cytopathogène et s'il n'est observé aucun signe de la présence d'agents hémadsorbants. Effectuez un essai spécifique des pestivirus.

3-5. **Innocuité**. Utilisez 2 veaux de l'âge minimal recommandé pour la vaccination et de préférence exempts d'anticorps dirigés contre le virus parainfluenza 3 bovin ou, dans des cas justifiés, utilisez des veaux ayant un très faible taux de ces anticorps, qui n'ont pas été vaccinés contre le virus parainfluenza bovin et pour qui l'administration du vaccin n'entraîne pas de réponse anamnestique. Administrez à chaque veau par une voie recommandée 10 doses de vaccin. Observez les veaux au moins une fois par jour pendant 21 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des veaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des cultures cellulaires appropriées. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans une dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-3) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.

**01/2008:1955**

# VACCIN VIVANT DU VIRUS PARAINFLUENZA CANIN

## Vaccinum parainfluenzae viri canini vivum

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant du virus parainfluenza canin est une préparation d'une souche appropriée de virus parainfluenza d'origine canine. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des chiens contre les signes respiratoires de l'infection par le virus parainfluenza d'origine canine.

2. PRODUCTION

2-1. *PREPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des chiens auxquels le vaccin est destiné.

Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1), Augmentation de la virulence (section 2-3-2) et Pouvoir immunogène (section 2-3-3) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination. Utilisez le virus au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin.

2-3-1-1. *Innocuité générale.* Pour chaque essai, utilisez au minimum 5 chiens de l'âge minimal recommandé pour la vaccination, exempts d'anticorps dirigés contre le virus parainfluenza d'origine canine. Administrez à chaque chien une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 21 jours.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun chien ne présente de réaction anormale, locale ou générale, de signes de maladie ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal.

2-3-1-2. *Innocuité chez la chienne gestante.* Si le vaccin est destiné aux chiennes gestantes, utilisez au minimum 5 chiennes au stade de gestation recommandé ou à plusieurs stades selon le schéma recommandé. Administrez à chaque chienne une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin. Observez les chiennes au moins une fois par jour jusqu'à un jour après la mise bas.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucune chienne ne présente de réaction anormale, locale ou générale, de signes de maladie ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal et si aucun effet indésirable n'est observé, ni sur la gestation, ni sur la progéniture.

2-3-2. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin, à 2 chiens âgés de 5-7 semaines et exempts d'anticorps dirigés contre le virus parainfluenza d'origine canine, puis à effectuer des passages successifs, 5 si possible, sur d'autres groupes similaires et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Si les propriétés du virus vaccinal permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon, effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents.

Administrez à chaque chien par voie intranasale et par une voie recommandée une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après. Choisissez, parmi les voies d'administration recommandées, celle réputée la plus favorable au retour à la virulence. Après 3-10 jours, préparez une suspension d'écouvillonnages de la cavité nasale de chaque chien. Administrez par voie intranasale 1 mL des suspensions des écouvillonnages contenant la quantité maximale de virus à 2 autres chiens du même âge. Procédez ainsi à 5 passages au minimum, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages.

Effectuez l'essai d'innocuité (section 2-3-1) au moyen du virus vaccinal avant passage et du virus au niveau de passage maximal où le réisolement a été possible.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal ou si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde séries.

2-3-3. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des chiens de l'âge minimal recommandé. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque chien n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

Utilisez au moins 15 chiens exempts d'anticorps dirigés contre le virus parainfluenza d'origine canine. Administrez le virus vaccinal à au moins 10 chiens, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 5 autres comme témoins. Après au moins 21 jours, soumettez tous les chiens à une épreuve virulente en leur administrant par voie intratrachéale ou intranasale une quantité suffisante de suspension d'une forme virulente du virus parainfluenza d'origine canine. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de l'épreuve. Effectuez des écouvillonnages ou des lavages de la

Vaccins

cavité nasale journellement du 2e au 10e jour suivant l'épreuve et effectuez une recherche de virus dans les échantillons. Utilisez une grille de cotation pour enregistrer l'incidence de toux pour chaque chien.

L'essai n'est pas valable si plus d'un chien témoin ne présente ni toux ni excrétion du virus d'épreuve. Le vaccin satisfait à l'essai si les notes de toux ou l'excrétion virale sont réduites de façon significative chez les chiens vaccinés par rapport aux chiens témoins.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Effectuez un essai d'immunofluorescence sur des cultures cellulaires appropriées, en utilisant un immunosérum monospécifique.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062).*

3-3. **Mycoplasmes** (*2.6.7*). Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes.

3-4. **Agents étrangers**. Neutralisez le virus vaccinal à l'aide d'un immunosérum monospécifique dirigé contre le virus parainfluenza d'origine canine et inoculez le mélange à des cultures cellulaires sensibles aux virus pathogènes pour le chien. Effectuez un passage après 6-8 jours et maintenez les cultures pendant un total de 14 jours. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne se produit pas d'effet cytopathogène et s'il n'est observé aucun signe de la présence d'agents hémadsorbants.

3-5. **Innocuité**. Utilisez 2 chiens ayant au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination, exempts d'anticorps dirigés contre le virus parainfluenza d'origine canine. Administrez à chaque chien par une voie recommandée 10 doses de vaccin. Observez les chiens au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun chien ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des cultures cellulaires appropriées. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans une dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-3) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.

**01/2008:1177**
**corrigé 6.0**

# VACCIN VIVANT DU VIRUS SYNCYTIAL RESPIRATOIRE BOVIN

## Vaccinum viri syncytialis meatus spiritus bovini vivum

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant du virus syncytial respiratoire bovin est une préparation d'une souche appropriée du virus syncytial respiratoire bovin. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des bovins contre l'infection par le virus syncytial respiratoire bovin.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*).

2-3. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal possède une innocuité (*5.2.6*) et une efficacité (*5.2.7*) satisfaisantes vis-à-vis des bovins auxquels le vaccin est destiné.
Les essais décrits ci-après sous Innocuité (section 2-3-1.), Augmentation de la virulence (section 2-3-2.) et Pouvoir immunogène (section 2-3-3.) peuvent être utilisés pour établir l'innocuité et l'efficacité.

2-3-1. **Innocuité**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination, en utilisant dans chaque cas des veaux de l'âge minimal recommandé. Utilisez le virus au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin.

2-3-1-1. *Essai de laboratoire*. Pour chaque essai, utilisez au minimum 5 veaux exempts d'anticorps dirigés contre le virus syncytial respiratoire bovin. Administrez à chaque veau une quantité de virus vaccinal au moins équivalente à 10 fois le titre maximal en virus susceptible d'être contenu dans une dose de vaccin. Observez les veaux au moins une fois par jour pendant 21 jours. Enregistrez leur température rectale pendant le jour précédant la vaccination, au moment de la vaccination et pendant les 7 jours suivants.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai s'il n'est constaté aucune variation anormale de la température corporelle et si aucun des veaux ne présente de réaction anormale, locale ou générale, ni ne meurt de causes attribuables au virus vaccinal.

2-3-1-2. *Essais sur le terrain*. Les veaux utilisés dans les essais sur le terrain servent également à évaluer l'incidence de réactions d'hypersensibilité chez les veaux vaccinés suite à une exposition ultérieure au vaccin ou au virus sauvage. Le vaccin satisfait à l'essai s'il n'est pas associé à une incidence anormale de réactions d'hypersensibilité immédiate.

2-3-2. **Augmentation de la virulence**. L'essai de l'augmentation de la virulence consiste à administrer le virus vaccinal au niveau de passage le moins atténué présent entre le lot de semence primaire et un lot de vaccin, à 2 veaux exempts d'anticorps dirigés contre le virus syncytial respiratoire bovin, puis à effectuer des passages successifs, 5 si possible, sur d'autres groupes similaires et à rechercher le virus récupéré après le dernier passage pour déterminer l'augmentation de la virulence. Si les propriétés du virus vaccinal permettent des passages successifs sur 5 groupes par propagation naturelle, cette méthode peut être utilisée, sinon, effectuez un passage comme décrit ci-après et déterminez l'augmentation de la virulence sur le virus récupéré ayant subi le plus grand nombre de passages. Prenez les précautions nécessaires pour éviter une contamination virale à partir des passages précédents.

Administrez à chaque veau par voie intranasale une quantité de virus vaccinal permettant un réisolement du virus pour les passages décrits ci-après. A partir du 3e jour après l'administration du virus et jusqu'au 7e jour, effectuez quotidiennement des écouvillonnages de la cavité nasale de chaque animal et mettez les prélèvements en suspension dans 5 mL, au maximum, d'un milieu approprié. Inoculez ces suspensions à des cultures cellulaires pour vérifier la présence du virus. Administrez environ 1 mL de celles de ces suspensions qui, d'après le titrage en cultures cellulaires, possèdent le titre en virus le plus élevé, à 2 autres veaux de même âge. Procédez ainsi à 5 passages au minimum, en vérifiant à chaque fois la présence du virus. Si le virus n'est plus détecté à l'un des passages, effectuez une seconde série de passages.

Le virus vaccinal satisfait à l'essai si aucun veau ne présente de signes attribuables au virus vaccinal et si aucun signe d'accroissement de virulence n'est constaté entre le virus avant passage et le virus au niveau de passage maximal ; on tiendra

Vaccins

compte du titre en virus obtenu dans les prélèvements de la cavité nasale. Le virus vaccinal satisfait aussi à l'essai si le virus n'est retrouvé à aucun niveau de passage de la première et de la seconde séries.

2-3-3. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour chacune des voies et des méthodes d'administration recommandées pour la vaccination en utilisant dans chaque cas des veaux de l'âge minimal recommandé. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque veau n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

Utilisez au moins 10 veaux exempts d'anticorps dirigés contre le virus syncytial respiratoire bovin. Effectuez des prélèvements de sérum sur les veaux avant la vaccination, 7 jours et 14 jours après la vaccination et juste avant l'épreuve virulente. Administrez le virus vaccinal à au moins 5 veaux, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 5 autres comme témoins. Après 21 jours, soumettez tous les veaux à une épreuve virulente en leur administrant par voie respiratoire une quantité suffisante de suspension d'une forme virulente du virus syncytial respiratoire bovin à un niveau de passage faible. Observez les veaux au moins une fois par jour pendant 14 jours à compter de l'épreuve et exercez une surveillance sur les signes, notamment respiratoires et l'excrétion du virus (par écouvillonnage de la cavité nasale ou par lavage trachéobronchial).

L'essai n'est pas valable si des anticorps dirigés contre le virus respiratoire syncytial bovin sont trouvés dans un échantillon prélevé sur les veaux témoins avant l'épreuve ou si plus de 2 veaux témoins ne présentent pas d'excrétion du virus d'épreuve comme indiqué par les échantillons prélevés par écouvillonnage de la cavité nasale ou par lavage trachéobronchial. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si, chez les veaux vaccinés, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve :

– l'excrétion moyenne du virus et le temps moyen d'excrétion sont réduits de façon significative par rapport au groupe témoin,
– il y a une réduction notable des signes locaux et généraux (si le virus d'épreuve employé provoque de tels signes).

Vaccins

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. Identifiez le vaccin par une méthode d'immunomarquage, avec un immunosérum monospécifique, sur des cultures cellulaires appropriées.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes** (*2.6.7*). Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes.

3-4. **Agents étrangers**. Neutralisez le virus vaccinal à l'aide d'un immunosérum monospécifique approprié dirigé contre le virus syncytial respiratoire bovin et inoculez le mélange à des cultures cellulaires sensibles aux virus pathogènes pour les bovins. Effectuez au moins un passage et maintenez les cultures pendant 14 jours. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne se produit pas d'effet cytopathogène et s'il n'est observé aucun signe de la présence d'agents hémadsorbants. Effectuez un essai spécifique des pestivirus.

3-5. **Innocuité**. Utilisez 2 veaux de l'âge minimal recommandé pour la vaccination, exempts d'anticorps dirigés contre le virus syncytial respiratoire bovin. Administrez à chaque veau par une voie recommandée 10 doses de vaccin. Observez les veaux au moins une fois par jour pendant 21 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des veaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin.

3-6. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des cultures cellulaires appropriées. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans une dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-7. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-3.) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.

**01/2008:0746**

# VACCIN VIVANT ORAL DE LA RAGE POUR RENARDS

## Vaccinum rabiei perorale vivum ad vulpem

1. DÉFINITION

Le vaccin vivant oral de la rage pour renards est une préparation d'une souche immunogène appropriée du virus atténué de la rage. Le vaccin est incorporé dans un appât d'une manière qui permet d'effectuer aseptiquement les essais prescrits ci-après. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des renards contre la rage.

2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

Le virus vaccinal est multiplié en cultures cellulaires. La suspension virale est récoltée en une ou plusieurs fois dans les 14 jours qui suivent l'inoculation. Plusieurs récoltes d'une même culture peuvent être réunies et considérées comme une récolte unique. Un stabilisant approprié peut lui être ajouté.

2-2. *SUBSTRAT DE MULTIPLICATION DU VIRUS*

2-2-1. **Cultures cellulaires**. Les cultures cellulaires satisfont aux exigences relatives aux cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins pour usage vétérinaire (*5.2.4*) ; si les cultures cellulaires sont obtenues à partir de mammifères, il est démontré qu'elles sont exemptes du virus de la rage.

2-3. *CHOIX DU VIRUS VACCINAL*

Il doit être démontré que le virus vaccinal est satisfaisant quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des renards auxquels le vaccin est destiné.
Les caractéristiques décrites ci-après (section 2-3-1) peuvent être utilisées pour établir l'innocuité et l'essai décrit ci-après sous Pouvoir immunogène (section 2-3-2) peut être utilisé pour établir l'efficacité.

2-3-1. **Caractéristiques de la souche virale**. Seule une souche de virus conforme aux caractéristiques suivantes peut être utilisée dans la préparation du vaccin :

– administrée oralement à la dose et par la méthode recommandées à 40 renards, elle ne provoque aucun signe de rage dans les 180 jours qui suivent l'administration,
– administrée oralement à raison de 10 fois la dose recommandée à 10 renards, elle ne provoque aucun signe de rage dans les 180 jours qui suivent l'administration,
– administrée oralement à raison de 10 fois la dose recommandée à 10 chiens, elle ne provoque aucun signe de rage dans les 180 jours qui suivent l'administration,
– administrée oralement à raison de 10 fois la dose recommandée à 10 chats, elle ne provoque aucun signe de rage dans les 180 jours qui suivent l'administration,
– la souche de virus ne se propage pas d'un animal à l'autre chez les rongeurs sauvages dans des conditions naturelles et expérimentales,
– la souche de virus porte un ou plusieurs marqueurs génétiques stable qui permettent de distinguer la souche vaccinale des autres souches de virus de la rage.

2-3-2. **Pouvoir immunogène**. Effectuez l'essai pour la voie orale d'administration et à l'aide de l'appât indiqué sur l'étiquette, en utilisant des renards. La quantité de virus vaccinal administrée à chaque renard n'est pas supérieure au titre minimal en virus qui sera indiqué sur l'étiquette et le virus est utilisé au niveau de passage le plus atténué qui sera présent dans un lot de vaccin.

Utilisez au moins 35 renards exempts d'anticorps dirigés contre le virus de la rage. Administrez le virus vaccinal à au moins 25 renards âgés d'au minimum 3 mois, selon le schéma recommandé et gardez-en au minimum 10 autres comme témoins. Observez les renards pendant 180 jours. Aucun renard ne présente de signes de la rage. L'essai n'est pas valable si, à la fin de cette période d'observation, moins de 25 renards vaccinés survivent. 180 jours après la vaccination, soumettez tous les renards à une épreuve virulente en leur administrant par voie intramusculaire une quantité suffisante de suspension d'une souche virulente du virus rabique approuvée par l'Autorité compétente. Observez les renards au moins une fois par jour pendant 90 jours à compter de l'épreuve. Les renards qui meurent pour des raisons non attribuables à la rage sont éliminés.

L'essai n'est pas valable si le nombre de ces morts réduit le nombre de renards vaccinés dans l'essai à moins de 25 et l'essai n'est valable que si 9 au moins des témoins (ou un nombre statistiquement équivalent si plus de 10 témoins reçoivent l'épreuve virulente) présentent des signes de la rage et si la présence de virus rabique dans leur cerveau est démontrée au moyen d'un essai par anticorps fluorescent ou toute autre méthode appropriée. Le virus vaccinal satisfait à l'essai si 2 au plus des 25 renards vaccinés (ou un nombre statistiquement équivalent si plus de 25 renards vaccinés reçoivent l'épreuve virulente) présentent des signes de la rage.

## 3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**

3-1-1. Le vaccin, mélangé à un immunosérum rabique monospécifique, n'infecte plus les cultures cellulaires sensibles dans lesquelles il a été inoculé.

3-1-2. Un essai est effectué afin de mettre en évidence le marqueur génétique.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Vaccins pour usage vétérinaire (0062)*.

3-3. **Mycoplasmes** (*2.6.7*). Le vaccin satisfait à l'essai des mycoplasmes.

3-4. **Agents étrangers**

3-4-1. Neutralisez le virus vaccinal à l'aide d'un immunosérum monospécifique approprié dirigé contre le virus rabique et inoculez le mélange à des cultures cellulaires sensibles. Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne provoque plus d'effets cytopathiques dans les cultures cellulaires sensibles et s'il n'est observé aucun signe de la présence d'agents hémagglutinants ou hémadsorbants.

3-4-2. Inoculez le vaccin dilué au 1/10 et au 1/1000 dans des cultures cellulaires sensibles. Faites incuber à 37 °C. Après 2, 4 et 6 jours, colorez les cellules à l'aide d'une gamme d'anticorps monoclonaux qui ne réagissent pas avec le virus vaccinal mais qui réagissent avec d'autres souches de virus de la rage (par exemple, le virus des rues, la souche Pasteur). Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne présente pas de signe de virus rabique étranger.

3-5. **Titre en virus**. Titrez le virus vaccinal par inoculation à des cultures cellulaires appropriées. Le vaccin satisfait à l'essai si le titre en virus dans une dose n'est pas inférieur à la valeur minimale indiquée sur l'étiquette.

3-6. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-3-2) lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinante n'étant pas supérieure au titre en virus minimal indiqué sur l'étiquette.

## 4. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique la nature du marqueur génétique de la souche de virus.

**01/2008:0441**
**corrigé 7.0**

# VACCIN VIVANT SPORULÉ DE LA FIÈVRE CHARBONNEUSE POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Vaccinum anthracis vivum ad usum veterinarium

## 1. DÉFINITION

Le vaccin vivant sporulé de la fièvre charbonneuse pour usage vétérinaire est une préparation d'une suspension de spores vivantes d'une souche atténuée appropriée non capsulée de *Bacillus anthracis*. Cette monographie s'applique aux vaccins destinés à l'immunisation active des animaux contre les maladies causées par *B. anthracis*.

## 2. PRODUCTION

2-1. *PRÉPARATION DU VACCIN*

*B. anthracis* est cultivé sur milieu approprié. En fin de culture, les spores sont mises en suspension dans une solution stabilisante, puis dénombrées. Des adjuvants peuvent être ajoutés au vaccin.

2-2. *CHOIX DE LA SOUCHE VACCINALE*

La souche utilisée peut être :

- non létale pour le cobaye et la souris,
- ou létale pour le cobaye mais non létale pour le lapin,
- ou létale pour certains lapins.

Il doit être démontré que la souche vaccinale est satisfaisante quant à son innocuité (*5.2.6*) et son efficacité (*5.2.7*) vis-à-vis des animaux auxquels le vaccin est destiné.

L'essai décrit ci-après sous Pouvoir immunogène (section 2-2-1.) peut être utilisé pour établir l'efficacité.

2-2-1. **Pouvoir immunogène**. Pour les souches de *B. anthracis* non létales pour le cobaye et pour la souris, l'essai peut être effectué sur le cobaye. Pour les souches qui sont létales pour le cobaye mais non pour le lapin, l'essai peut être effectué sur le lapin. Pour les souches qui sont létales pour certains lapins, l'essai est effectué sur le mouton.

Si le vaccin est contrôlé sur cobaye ou sur lapin, utilisez au moins 13 animaux sains (groupe a). Injectez le vaccin à au moins 10 d'entre eux par voie sous-cutanée ou par voie intradermique à raison de 1/10 de la dose minimale recommandée pour le mouton. Utilisez au moins 3 animaux de la même espèce et de la même origine comme témoins. Observez les animaux au moins une fois par jour pendant 21 jours. Si plus de 2 animaux meurent de causes non spécifiques, répétez l'essai.

Si le vaccin est contrôlé sur moutons, utilisez au moins 8 moutons sains (groupe b). Injectez le vaccin à au moins 5 d'entre eux par voie sous-cutanée ou par voie intradermique à raison de 1/10 de la dose minimale pour le mouton indiquée sur l'étiquette. Utilisez au moins 3 moutons de la même origine comme témoins. Observez les moutons au moins une fois par jour pendant 21 jours.

Soumettez chaque animal vacciné du groupe (a) ou du groupe (b) à une épreuve virulente en leur administrant par voie sous-cutanée au minimum 100 DLM et à chaque animal témoin 10 DLM d'une souche de *B. anthracis* pathogène pour l'espèce en cause. Observez les animaux au moins une fois par jour pendant 10 jours à compter de l'épreuve.

Le vaccin satisfait à l'essai si, au cours de la période d'observation suivant l'épreuve, tous les animaux vaccinés survivent et tous les animaux témoins meurent de la fièvre charbonneuse. Si un seul animal vacciné meurt après l'épreuve, répétez l'essai. Si un seul animal vacciné meurt dans le second essai, rejetez le vaccin.

3. ESSAIS EFFECTUÉS SUR CHAQUE LOT

3-1. **Identification**. *B. anthracis* présent dans le vaccin est identifié par des examens morphologiques, sérologiques, par culture et par examens biochimiques.

3-2. **Contamination bactérienne et fongique**. Effectuez ce contrôle par examen microscopique et par ensemencement en milieux appropriés. Le vaccin ne doit pas contenir de contaminants bactériens et fongiques.

3-3. **Innocuité**. Effectuez l'essai sur l'une des espèces animales auxquelles le vaccin est destiné. Pour un vaccin destiné à plusieurs espèces incluant la chèvre, effectuez l'essai sur chèvres. Utilisez 2 animaux de l'âge minimal recommandé pour la vaccination et qui ne possèdent pas d'anticorps dirigés contre *B. anthracis*. Administrez à chaque animal par voie sous-cutanée ou par voie intradermique le double de la dose indiquée sur l'étiquette pour l'espèce utilisée. Observez les animaux au moins une fois par jour pendant 14 jours.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des animaux ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin. Toutefois, une réaction locale est admise au site d'injection, l'intensité de celle-ci étant fonction de la souche de spores employée et de l'adjuvant utilisé dans la préparation du vaccin ; mais en aucun cas, elle ne doit provoquer de nécrose.

3-4. **Titre en bactéries vivantes**. Dénombrez sur plaque les spores vivantes. Le vaccin satisfait à l'essai si leur nombre n'est pas inférieur à 80 pour cent de celui qui est indiqué sur l'étiquette.

3-5. **Activité**. Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai prescrit sous Pouvoir immunogène (section 2-2-1.). Il n'est pas nécessaire d'effectuer cet essai d'activité pour chaque lot de vaccin s'il a été effectué sur un lot représentatif du vaccin, la dose vaccinale n'étant pas supérieure au nombre de spores vivantes indiqué sur l'étiquette.

# IMMUNOSÉRUMS POUR USAGE HUMAIN

Immunosérums

**01/2008:0145**

# IMMUNOSÉRUM ANTIVENIMEUX DE VIPÈRE EUROPÉENNE

## Immunoserum contra venena viperarum europaearum

DÉFINITION

L'immunosérum antivenimeux de vipère européenne est une préparation contenant les globulines antitoxiques douées du pouvoir de neutraliser le venin d'une ou de plusieurs espèces de vipères. Ces globulines sont obtenues par fractionnement du sérum d'animaux immunisés contre le ou les venins.

IDENTIFICATION

L'immunosérum à examiner neutralise le venin de *Vipera ammodytes*, ou de *Vipera aspis*, ou de *Vipera berus*, ou de *Vipera ursinii*, ou tout mélange de ces venins, indiqué sur l'étiquette, en les rendant ainsi inoffensifs pour des animaux réceptifs.

ACTIVITÉ

L'immunosérum antivenimeux de vipère européenne contient une quantité telle de globulines antitoxiques que 1 mL de la préparation neutralise au minimum 100 $DL_{50}$-souris du venin de *Vipera ammodytes* et du venin de *Vipera aspis*, et au minimum 50 $DL_{50}$-souris de venins d'autres espèces de vipère.

L'activité de l'immunosérum à examiner est évaluée par détermination de la dose permettant d'assurer la protection des souris contre l'effet létal d'une dose fixe de venin des espèces de vipères en cause.

*Choix des venins d'épreuve*. Les venins utilisés possèdent les caractéristiques normales physicochimiques, toxicologiques et immunologiques des venins des espèces de vipères citées. Ils sont de préférence cryodesséchés et conservés, à l'abri de la lumière, à 5 ± 3 °C.

Choisissez un venin destiné à servir d'épreuve en déterminant sur souris la $DL_{50}$, la période d'observation étant de 48 h.

*Détermination de la dose d'épreuve de venin*. Préparez une série de solutions de venin reconstitué, dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L ou autre solution isotonique de façon que la dilution médiane soit présumée contenir 1 $DL_{50}$ dans un volume de 0,25 mL. Diluez à parties égales avec le liquide utilisé plus haut. Utilisez pour chaque dilution un groupe de 4 souris au moins pesant chacune de 18 g à 20 g. Injectez par voie intraveineuse à chacune d'elles 0,5 mL de la dilution attribuée à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 48 h. Enregistrez le nombre de souris mortes et calculez la $DL_{50}$ à l'aide des méthodes statistiques habituelles.

*Détermination de l'activité de l'immunosérum à examiner*. Reconstituez le venin d'épreuve et diluez-le de façon que 0,25 mL contienne 5 $DL_{50}$ (solution de venin d'épreuve).

Préparez une série de solutions de l'immunosérum à examiner de raison 1,5 à 2,5 dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L ou autre solution isotonique. Préparez des séries de solutions de l'immunosérum en nombre suffisant pour obtenir des mélanges immunosérum-venin d'épreuve permettant d'établir la courbe de mortalité entre 20 pour cent et 80 pour cent de mortalité et d'estimer l'écart statistique.

Préparez des mélanges de 5 mL contenant chacun une quantité variable de l'immunosérum dans un volume de 2,5 mL et 2,5 mL de la solution du venin d'épreuve. Laissez reposer les mélanges au bain-marie à 37 °C pendant 30 min. Utilisez pour chaque mélange un groupe de 6 souris au moins pesant chacune de 18 g à 20 g. Injectez par voie intraveineuse à chacune d'elles 0,5 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 48 h. Enregistrez le nombre de souris mortes. Calculez la $DP_{50}$ par les méthodes statistiques habituelles. Vérifiez simultanément le nombre de $DL_{50}$ dans la dose d'épreuve du venin comme indiqué ci-dessus. Calculez l'activité de l'immunosérum à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{(T_v - 1)}{\mathrm{DP}_{50}}$$

$T_v$ = nombre de $DL_{50}$ dans la dose d'épreuve de venin.

Dans chaque dose pour souris du mélange venin-immunosérum, il reste au point final 1 $DL_{50}$ qui n'est pas neutralisée par l'immunosérum. Cette fraction non neutralisée du venin est responsable de la mort de 50 pour cent des souris auxquelles le mélange a été inoculé. La quantité de venin neutralisée par l'immunosérum correspond par conséquent à la quantité totale contenue dans chaque dose diminuée de 1 $DL_{50}$. Il s'ensuit que si l'activité de l'immunosérum est définie par le nombre de $DL_{50}$ de venin neutralisé au lieu du nombre de $DL_{50}$ dans chaque dose pour souris, l'expression à utiliser dans le calcul de l'activité est ($T_v$ – 1) et non ($T_v$).

L'activité de l'immunosérum peut être également exprimée en milligrammes par la quantité du venin d'épreuve neutralisée par un volume de 1 mL ou autre volume défini de l'immunosérum à examiner.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique le nom du venin ou des venins neutralisés par l'immunosérum.

*AVERTISSEMENT : en raison des propriétés allergisantes des venins de vipères, des dispositions doivent être prises pour éviter l'inhalation de particules provenant du venin*.

**01/2008:0085**

# IMMUNOSÉRUM BOTULINIQUE

## Immunoserum botulinicum

DÉFINITION

L'immunosérum botulinique est une préparation contenant des globulines antitoxiques douées du pouvoir de neutraliser spécifiquement les toxines formées par les types A, B ou E de *Clostridium botulinum* ou tout mélange de ces types.

PRODUCTION

L'immunosérum botulinique est obtenu par le fractionnement du sérum de cheval ou d'autres mammifères immunisés contre les toxines formées par les types A, B et E de *Cl. botulinum*.

IDENTIFICATION

L'immunosérum botulinique neutralise spécifiquement les toxines formées par les types de *Cl. botulinum* indiqués sur l'étiquette, en les rendant inoffensives pour les animaux réceptifs.

ACTIVITÉ

L'immunosérum botulinique contient au minimum 500 UI d'antitoxine par millilitre pour chacun des types A et B et au minimum 50 UI d'antitoxine par millilitre pour le type E.

L'activité de l'immunosérum botulinique est évaluée par détermination de la dose permettant d'assurer la protection des souris contre les effets létaux d'une dose donnée de toxine botulinique. Cette dose est comparée avec la quantité de la préparation étalon d'immunosérum botulinique nécessaire pour assurer la même protection. Le titrage biologique exige l'emploi de préparations de référence d'immunosérum botulinique de chaque type, étalonnées en unités internationales et de préparations appropriées de toxines botuliniques, destinées à servir de toxines d'épreuve. L'activité de chaque toxine d'épreuve est déterminée par rapport à la préparation de référence spécifique ; l'activité de l'immunosérum botulinique à examiner est déterminée par rapport à l'activité des toxines d'épreuve, par la même méthode.

Les Unités Internationales d'antitoxine correspondent à l'activité neutralisante spécifique à l'égard de la toxine des types A, B et E de *Cl. botulinum*, contenues dans des quantités données de préparations étalons constituées par une quantité de sérum desséché des types A, B et E provenant de cheval immunisé. La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée périodiquement par l'Organisation Mondiale de la Santé.

*Choix des animaux.* Utilisez des souris dont l'écart de masse entre l'animal le plus léger et l'animal le plus lourd ne dépasse pas 5 g.

*Préparation des toxines d'épreuve. AVERTISSEMENT : la toxine botulinique est extrêmement toxique. Par conséquent, toute opération comportant l'utilisation de cette toxine doit être effectuée avec le maximum de protection.* Préparez les toxines des types A, B et E à partir de filtrats stériles de cultures de 7 jours environ de *Cl. botulinum* types A, B et E en milieu liquide. A chaque filtrat, ajoutez 2 volumes de glycérol et concentrez, si nécessaire, par dialyse contre le glycérol. Conservez les toxines à une température égale ou légèrement inférieure à 0 °C.

*Choix des toxines d'épreuve.* Choisissez des toxines de chaque type destinées à servir de toxines d'épreuve en déterminant sur souris la dose L+/10 et la $DL_{50}$, la période d'observation étant de 96 h. Les toxines destinées à servir d'épreuve ne contiennent pas moins de 1000 $DL_{50}$ dans une dose L+/10.

*Détermination des doses d'épreuve des toxines* (dose L+/10). Préparez des solutions des préparations de référence dans un liquide approprié de façon que chacune d'elles contienne 0,25 UI d'antitoxine par millilitre. Utilisez chaque solution à tour de rôle pour déterminer la dose d'épreuve de la toxine correspondante.

Préparez une série de mélanges de la solution de la préparation de référence et de la toxine d'épreuve de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de solution de la préparation de référence et une quantité variable de toxine d'épreuve, puis complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 60 min. Utilisez un groupe de 4 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles par voie intrapéritonéale 1,0 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 96 h.

La dose d'épreuve de toxine correspond à la quantité présente dans 1,0 mL du mélange réalisé avec la plus petite quantité de toxine qui provoque, pendant la période d'observation, la mort des 4 souris auxquelles il a été administré, malgré la neutralisation partielle due à la préparation de référence.

*Détermination de l'activité de l'immunosérum.* Préparez des solutions de chaque préparation de référence dans un liquide approprié de façon qu'elles contiennent chacune 0,25 UI d'antitoxine par millilitre.

Préparez des solutions de chaque toxine d'épreuve dans un liquide approprié, de façon qu'elles contiennent chacune 2,5 doses d'épreuve par millilitre.

Utilisez à tour de rôle chaque solution de toxine d'épreuve et la solution de la préparation de référence correspondante pour déterminer l'activité de l'immunosérum à examiner. Préparez une série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de l'immunosérum à examiner de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de l'immunosérum à examiner. Complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Préparez une deuxième série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de la solution de la préparation de référence de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de solution de la préparation de référence. Dans cette deuxième série, la dilution médiane de la préparation de référence correspond au mélange contenant 0,5 UI d'antitoxine (2,0 mL de solution de la préparation de référence). Complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer les mélanges des 2 séries à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 60 min. Utilisez un groupe de 4 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles par voie intrapéritonéale 1,0 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 96 h.

Le mélange renfermant la quantité maximale d'antitoxine qui ne protège aucune souris de la mort, contient 0,5 UI. Cette quantité sert à calculer l'activité de l'immunosérum en Unités Internationales par millilitre.

L'essai n'est valable que si toutes les souris inoculées avec les mélanges contenant 2,0 mL ou moins de solution de la préparation de référence meurent et que si toutes les souris inoculées avec les mélanges contenant un plus grand volume de cette solution survivent.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique les types de toxine de *Cl. botulinum* neutralisés par la préparation.

**01/2008:0086**

# IMMUNOSÉRUM DIPHTÉRIQUE

## Immunoserum diphthericum

DÉFINITION

L'immunosérum diphtérique est une préparation contenant des globulines antitoxiques douées du pouvoir de neutraliser spécifiquement la toxine formée par *Corynebacterium diphtheriae*.

PRODUCTION

L'immunosérum diphtérique est obtenu par le fractionnement du sérum de cheval ou d'autres mammifères immunisés contre la toxine diphtérique.

IDENTIFICATION

L'immunosérum diphtérique neutralise spécifiquement la toxine formée par *C. diphtheriae*, en la rendant inoffensive pour les animaux réceptifs.

ACTIVITÉ

L'immunosérum diphtérique contient au minimum 1000 UI d'antitoxine par millilitre pour l'immunosérum obtenu à partir du sérum de cheval et au minimum 500 UI d'antitoxine par millilitre pour l'immunosérum obtenu à partir d'autres mammifères.

L'activité de l'immunosérum diphtérique est évaluée par détermination de la dose permettant d'assurer la protection des cobayes ou des lapins contre les effets érythémateux d'une dose donnée de toxine diphtérique. Cette dose est comparée avec la quantité de préparation étalon d'immunosérum diphtérique nécessaire pour assurer la même protection. Le titrage biologique exige l'emploi d'une préparation de référence d'immunosérum diphtérique étalonnée en Unités Internationales et d'une préparation appropriée de toxine diphtérique destinée à servir de toxine d'épreuve. L'activité de la toxine d'épreuve est déterminée par rapport à la préparation de référence ; l'activité de l'immunosérum diphtérique à examiner est déterminée par rapport à l'activité de la toxine d'épreuve par la même méthode.

L'Unité Internationale d'antitoxine correspond à l'activité neutralisante spécifique à l'égard de la toxine diphtérique contenue dans une quantité donnée de préparation étalon internationale constituée par du sérum desséché de cheval immunisé. La correspondance entre l'Unité Internationale et la préparation étalon internationale est indiquée périodiquement par l'Organisation Mondiale de la Santé.

*Préparation de la toxine d'épreuve.* Préparez la toxine diphtérique à partir de cultures de *C. diphtheriae* en milieu liquide. Filtrez pour obtenir un filtrat stérile qui doit être conservéà 4 °C.

*Choix de la toxine d'épreuve.* Choisissez une toxine destinée à servir de toxine d'épreuve en déterminant sur cobayes ou lapins la dose lr/100 et la dose minimale de réaction, la période d'observation étant de 48 h. La toxine destinée à servir d'épreuve ne contient pas moins de 200 doses minimales de réaction dans une dose lr/100.

*Dose minimale de réaction.* La dose minimale de réaction est la plus petite quantité de toxine qui, injectée par voie intradermique à des cobayes ou des lapins, provoque une faible réaction caractéristique au point d'injection dans les 48 h.

La toxine d'épreuve doit reposer pendant plusieurs mois avant d'être utilisée pour le titrage de l'immunosérum. Pendant ce temps, sa toxicité diminue et la dose lr/100 peut augmenter. Déterminez fréquemment la dose minimale de réaction et la dose lr/100. Lorsqu'il est démontré expérimentalement que la dose lr/100 est constante, la toxine d'épreuve est prête à l'emploi pour une longue période. Conservez la toxine d'épreuve à l'obscurité, à une température de 0 °C à 5 °C. Pour assurer la stérilité, ajoutez du toluène ou un autre agent antimicrobien qui ne provoque pas une diminution rapide de la toxicité spécifique.

*Détermination de la dose d'épreuve de toxine* (dose lr/100). Préparez une solution de la préparation de référence dans un liquide approprié de façon qu'elle contienne 0,1 UI d'antitoxine par millilitre.

Préparez une série de mélanges de la solution de la préparation de référence et de la toxine d'épreuve de façon qu'ils contiennent chacun 1,0 mL de la solution de la préparation de référence et une quantité variable de toxine, puis complétez chaque mélange au même volume final de 2,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 15 min à 60 min. Utilisez un groupe de 2 animaux pour chaque mélange. Injectez à chacun d'eux par voie intradermique dans le flanc rasé ou épilé de l'animal 0,2 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les animaux en observation pendant 48 h.

La dose d'épreuve de toxine correspond à la quantité présente dans 0,2 mL du mélange réalisé avec la plus petite quantité de toxine qui provoque une lésion érythémateuse, faible mais caractéristique au point d'injection, malgré la neutralisation partielle due à la préparation de référence.

*Détermination de l'activité de l'immunosérum.* Préparez une solution de la préparation de référence dans un liquide approprié de façon qu'elle contienne 0,125 UI d'antitoxine par millilitre. Préparez une solution de la toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon qu'elle contienne 12,5 doses d'épreuve par millilitre.

Préparez une série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de l'immunosérum à examiner de façon qu'ils contiennent chacun 0,8 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de l'immunosérum à examiner. Complétez chaque mélange au même volume final de 2,0 mL avec un liquide approprié. Préparez une deuxième série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de la solution de la préparation de référence de façon qu'ils contiennent chacun 0,8 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de la solution de la préparation de référence. Dans cette deuxième série, la dilution médiane de la préparation de référence correspond au mélange contenant 0,1 UI d'antitoxine (0,8 mL de la solution de la préparation de référence). Complétez chaque mélange au même volume final de 2,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer les mélanges des 2 séries à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 15 min à 60 min. Utilisez un groupe de 2 animaux pour chaque mélange. Injectez à chacun d'eux par voie intradermique dans le flanc rasé ou épilé de l'animal 0,2 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les animaux en observation pendant 48 h.

Le mélange renfermant la quantité maximale d'antitoxine qui ne protège pas les cobayes des effets érythémateux de la toxine, contient 0,1 UI. Cette quantité sert à calculer l'activité de l'immunosérum en unités internationales par millilitre.

L'essai n'est valable que si tous les mélanges contenant 0,8 mL ou moins de la solution de la préparation de référence provoquent des lésions érythémateuses au point d'injection et que si tous les mélanges contenant un plus grand volume de cette solution ne provoquent aucune lésion au point d'injection.

**01/2008:0087**

# IMMUNOSÉRUM GANGRENEUX (CLOSTRIDIUM NOVYI)

## Immunoserum gangraenicum (Clostridium novyi)

### DÉFINITION

L'immunosérum gangreneux (Clostridium novyi) est une préparation contenant des globulines antitoxiques douées du pouvoir de neutraliser spécifiquement la toxine alpha formée par *Clostridium novyi* (ancienne nomenclature *Clostridium oedematiens*). Il est obtenu par le fractionnement du sérum de cheval ou d'autres mammifères immunisés contre la toxine alpha de *Cl. novyi*.

### IDENTIFICATION

L'immunosérum gangreneux (Clostridium novyi) neutralise spécifiquement la toxine alpha formée par *Cl. novyi* en la rendant inoffensive pour les animaux réceptifs.

### ACTIVITÉ

L'immunosérum gangreneux (Clostridium novyi) contient au minimum 3750 UI d'antitoxine par millilitre.

L'activité de l'immunosérum gangreneux (Clostridium novyi) est évaluée par détermination de la dose permettant d'assurer la protection de souris ou d'autres animaux appropriés contre les effets létaux d'une dose donnée de toxine de *Cl. novyi*. Cette dose est comparée avec la quantité de la préparation étalon d'immunosérum gangreneux (Clostridium novyi) nécessaire pour assurer la même protection. Le titrage biologique exige l'emploi d'une préparation de référence d'immunosérum gangreneux (Clostridium novyi) étalonnée en Unités Internationales et d'une préparation appropriée de toxine de *Cl. novyi* destinée à servir de toxine d'épreuve. L'activité de la toxine d'épreuve est déterminée par rapport à la préparation de référence ; l'activité de l'immunosérum gangreneux (Clostridium novyi) à examiner est déterminée par rapport à l'activité de la toxine d'épreuve, par la même méthode.

L'Unité Internationale d'antitoxine correspond à l'activité neutralisante spécifique à l'égard de la toxine de *Cl. novyi*, contenue dans une quantité donnée de la préparation étalon internationale constituée par du sérum desséché de cheval immunisé. La correspondance entre l'Unité Internationale et la préparation étalon internationale est indiquée périodiquement par l'Organisation Mondiale de la Santé.

*Choix des animaux.* Utilisez des souris dont l'écart de masse entre l'animal le plus léger et l'animal le plus lourd n'excède pas 5 g.

*Préparation de la toxine d'épreuve.* Préparez la toxine d'épreuve à partir du filtrat stérile d'une culture de 5 jours environ de *Cl. novyi* en milieu liquide. Traitez le filtrat par du *sulfate d'ammonium R*. Le précipité recueilli, contenant la toxine, est desséché sous vide sur *pentoxyde de diphosphore R*, pulvérisé et conservé à l'état sec.

*Choix de la toxine d'épreuve.* Choisissez une toxine destinée à servir de toxine d'épreuve en déterminant sur souris la dose L+ et la $DL_{50}$, la période d'observation étant de 72 h. La toxine

Immunosérums

destinée à servir de toxine d'épreuve ne contient pas moins de 25 $DL_{50}$ dans une dose L+ qui est elle-même contenue dans 0,5 mg au maximum.

*Détermination de la dose d'épreuve de toxine* (dose L+). Préparez une solution de la préparation de référence dans un liquide approprié de façon qu'elle contienne 12,5 UI d'antitoxine par millilitre.

Préparez une solution de la toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon que 1 mL contienne une quantité exactement connue, par exemple 10 mg.

Préparez une série de mélanges de la solution de la préparation de référence et de la solution de toxine d'épreuve de façon qu'ils contiennent chacun 0,8 mL de la solution de la préparation de référence et une quantité variable de la solution de toxine d'épreuve, puis complétez chaque mélange au même volume final de 2,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 60 min. Utilisez un groupe de 6 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles, par voie intramusculaire, 0,2 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 72 h.

La dose d'épreuve de toxine correspond à la quantité présente dans 0,2 mL du mélange réalisé avec la plus petite quantité de toxine qui provoque, pendant la période d'observation, la mort des 6 souris auxquelles il a été administré, malgré la neutralisation partielle due à la préparation de référence.

*Détermination de l'activité de l'immunosérum*. Préparez une solution de la préparation de référence dans un liquide approprié de façon qu'elle contienne 12,5 UI d'antitoxine par millilitre.

Préparez une solution de la toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon qu'elle contienne 12,5 doses d'épreuve par millilitre.

Préparez une série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de l'immunosérum à examiner de façon qu'ils contiennent chacun 0,8 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de l'immunosérum à examiner. Complétez chaque mélange au même volume final de 2,0 mL avec un liquide approprié. Préparez une deuxième série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de la solution de la préparation de référence de façon qu'ils contiennent chacun 0,8 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de la solution de la préparation de référence. Dans cette deuxième série, la dilution médiane de la préparation de référence correspond au mélange contenant 10 UI d'antitoxine (0,8 mL de la solution de la préparation de référence). Complétez chaque mélange au même volume final de 2,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer les mélanges des 2 séries à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 60 min. Utilisez un groupe de 6 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles, par voie intramusculaire, 0,2 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 72 h.

Le mélange renfermant la quantité maximale d'antitoxine qui ne protège aucune souris de la mort, contient 10 UI. Cette quantité sert à calculer l'activité de l'immunosérum en Unités Internationales par millilitre.

L'essai n'est valable que si toutes les souris inoculées avec les mélanges contenant 0,8 mL ou moins de solution de la préparation de référence meurent et que si toutes les souris inoculées avec les mélanges contenant un plus grand volume de cette solution survivent.



**01/2008:0088**

# IMMUNOSÉRUM GANGRENEUX (CLOSTRIDIUM PERFRINGENS)

## Immunoserum gangraenicum (Clostridium perfringens)

DÉFINITION

L'immunosérum gangreneux (Clostridium perfringens) est une préparation contenant des globulines antitoxiques douées du pouvoir de neutraliser spécifiquement la toxine alpha formée par *Clostridium perfringens.* Il est obtenu par le fractionnement du sérum de cheval ou d'autres mammifères immunisés contre la toxine alpha de *Cl. perfringens.*

IDENTIFICATION

L'immunosérum gangreneux (Clostridium perfringens) neutralise spécifiquement la toxine alpha formée par *Cl. perfringens* en la rendant inoffensive pour les animaux réceptifs.

ACTIVITÉ

L'immunosérum gangreneux (Clostridium perfringens) contient au minimum 1500 UI d'antitoxine par millilitre.

L'activité de l'immunosérum gangreneux (Clostridium perfringens) est évaluée par détermination de la dose permettant d'assurer la protection de souris ou d'autres animaux appropriés contre les effets létaux d'une dose donnée de toxine de *Cl. perfringens.* Cette dose est comparée avec la quantité de la préparation étalon d'immunosérum gangreneux (Clostridium perfringens) nécessaire pour assurer la même protection. Le titrage biologique exige l'emploi d'une préparation de référence d'immunosérum gangreneux (Clostridium perfringens) étalonnée en Unités Internationales et d'une préparation appropriée de toxine de *Cl. perfringens* destinée à servir de toxine d'épreuve. L'activité de la toxine d'épreuve est déterminée par rapport à la préparation de référence ; l'activité de l'immunosérum gangreneux (Clostridium perfringens) à examiner est déterminée par rapport à l'activité de la toxine d'épreuve, par la même méthode.

L'Unité Internationale d'antitoxine correspond à l'activité neutralisante spécifique à l'égard de la toxine de *Cl. perfringens,* contenue dans une quantité donnée de la préparation étalon internationale constituée par du sérum desséché de cheval immunisé. La correspondance entre l'Unité Internationale et la préparation étalon internationale est indiquée périodiquement par l'Organisation Mondiale de la Santé.

*Choix des animaux.* Utilisez des souris dont l'écart de masse entre l'animal le plus léger et l'animal le plus lourd n'excède pas 5 g.

*Préparation de la toxine d'épreuve.* Préparez la toxine d'épreuve à partir du filtrat stérile d'une culture de 5 jours environ de *Cl. perfringens* en milieu liquide. Traitez le filtrat par du *sulfate d'ammonium R*. Le précipité recueilli, contenant la toxine, est desséché sous vide sur *pentoxyde de diphosphore R,* pulvérisé et conservé à l'état sec.

*Choix de la toxine d'épreuve.* Choisissez une toxine destinée à servir de toxine d'épreuve en déterminant sur souris la dose L+ et la $DL_{50}$, la période d'observation étant de 48 h. La toxine destinée à servir de toxine d'épreuve ne contient pas moins de 20 $DL_{50}$ dans une dose L+ qui est elle-même contenue dans 4 mg au maximum.

*Détermination de la dose d'épreuve de toxine* (dose L+). Préparez une solution de la préparation de référence dans un liquide approprié de façon qu'elle contienne 5 UI d'antitoxine par millilitre.

Préparez une solution de la toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon que 1 mL contienne une quantité exactement connue, par exemple 10 mg.

Préparez une série de mélanges de la solution de la préparation de référence et de la solution de toxine d'épreuve de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de la solution de la préparation de référence et une quantité variable de la solution de toxine d'épreuve, puis complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 60 min. Utilisez un groupe de 6 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles, par voie intraveineuse, 0,5 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 48 h.

La dose d'épreuve de toxine correspond à la quantité présente dans 0,5 mL du mélange réalisé avec la plus petite quantité de toxine qui provoque, pendant la période d'observation, la mort des 6 souris auxquelles il a été administré, malgré la neutralisation partielle due à la préparation de référence.

*Détermination de l'activité de l'immunosérum*. Préparez une solution de la préparation de référence dans un liquide approprié de façon qu'elle contienne 5 UI d'antitoxine par millilitre.

Préparez une solution de la toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon qu'elle contienne 5 doses d'épreuve par millilitre.

Préparez une série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de l'immunosérum à examiner de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de l'immunosérum à examiner. Complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Préparez une deuxième série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de la solution de la préparation de référence de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de la solution de la préparation de référence. Dans cette deuxième série, la dilution médiane de la préparation de référence correspond au mélange contenant 10 UI d'antitoxine (2,0 mL de la solution de la préparation de référence). Complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer les mélanges des 2 séries à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 60 min. Utilisez un groupe de 6 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles, par voie intraveineuse, 0,5 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 48 h.

Le mélange renfermant la quantité maximale d'antitoxine qui ne protège aucune souris de la mort, contient 10 UI. Cette quantité sert à calculer l'activité de l'immunosérum en Unités Internationales par millilitre.

L'essai n'est valable que si toutes les souris inoculées avec les mélanges contenant 2,0 mL ou moins de solution de la préparation de référence meurent et que si toutes les souris inoculées avec les mélanges contenant un plus grand volume de cette solution survivent.

**01/2008:0089**

# IMMUNOSÉRUM GANGRENEUX (CLOSTRIDIUM SEPTICUM)

## Immunoserum gangraenicum (Clostridium septicum)

### DÉFINITION

L'immunosérum gangreneux (Clostridium septicum) est une préparation contenant des globulines antitoxiques douées du pouvoir de neutraliser spécifiquement la toxine alpha formée par *Clostridium septicum*. Il est obtenu par le fractionnement du sérum de cheval ou d'autres mammifères immunisés contre la toxine alpha de *Cl. septicum*.

### IDENTIFICATION

L'immunosérum gangreneux (Clostridium septicum) neutralise spécifiquement la toxine alpha formée par *Cl. septicum* en la rendant inoffensive pour les animaux réceptifs.

### ACTIVITÉ

L'immunosérum gangreneux (Clostridium septicum) contient au minimum 1500 UI d'antitoxine par millilitre.

L'activité de l'immunosérum gangreneux (Clostridium septicum) est évaluée par détermination de la dose permettant d'assurer la protection de souris ou d'autres animaux appropriés contre les effets létaux d'une dose donnée de toxine de *Cl. septicum*. Cette dose est comparée avec la quantité de la préparation étalon d'immunosérum gangreneux (Clostridium septicum) nécessaire pour assurer la même protection. Le titrage biologique exige l'emploi d'une préparation de référence d'immunosérum gangreneux (Clostridium septicum) étalonnée en Unités Internationales et d'une préparation appropriée de toxine de *Cl. septicum* destinée à servir de toxine d'épreuve. L'activité de la toxine d'épreuve est déterminée par rapport à la préparation de référence ; l'activité de l'immunosérum gangreneux (Clostridium septicum) à examiner est déterminée par rapport à l'activité de la toxine d'épreuve, par la même méthode.

L'Unité Internationale d'antitoxine correspond à l'activité neutralisante spécifique à l'égard de la toxine de *Cl. septicum*, contenue dans une quantité donnée de la préparation étalon internationale constituée par du sérum desséché de cheval immunisé. La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée périodiquement par l'Organisation Mondiale de la Santé.

*Choix des animaux*. Utilisez des souris dont l'écart de masse entre l'animal le plus léger et l'animal le plus lourd n'excède pas 5 g.

*Préparation de la toxine d'épreuve*. Préparez la toxine d'épreuve à partir du filtrat stérile d'une culture de 5 jours environ de *Cl. septicum* en milieu liquide. Traitez le filtrat par du *sulfate d'ammonium R*. Le précipité recueilli, contenant la toxine, est desséché sous vide sur *pentoxyde de diphosphore R*, pulvérisé et conservé à l'état sec.

*Choix de la toxine d'épreuve*. Choisissez une toxine destinée à servir de toxine d'épreuve en déterminant sur souris la dose L+ et la $DL_{50}$, la période d'observation étant de 72 h. La toxine destinée à servir de toxine d'épreuve ne contient pas moins de 25 $DL_{50}$ dans une dose L+ qui est elle-même contenue dans 0,5 mg au maximum.

*Détermination de la dose d'épreuve de toxine* (dose L+). Préparez une solution de la préparation de référence dans un liquide approprié de façon qu'elle contienne 5 UI d'antitoxine par millilitre.

Préparez une solution de la toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon que 1 mL contienne une quantité exactement connue, par exemple 20 mg.

Préparez une série de mélanges de la solution de la préparation de référence et de la solution de toxine d'épreuve de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de la solution de la préparation de référence et une quantité variable de la solution de toxine d'épreuve, puis complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 60 min. Utilisez un groupe de 6 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles, par voie intraveineuse, 0,5 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 72 h.

La dose d'épreuve de toxine correspond à la quantité présente dans 0,5 mL du mélange réalisé avec la plus petite quantité de toxine qui provoque, pendant la période d'observation, la mort des 6 souris auxquelles il a été administré, malgré la neutralisation partielle due à la préparation de référence.

Immunosérums

*Détermination de l'activité de l'immunosérum.* Préparez une solution de la préparation de référence dans un liquide approprié de façon qu'elle contienne 5 UI d'antitoxine par millilitre.

Préparez une solution de toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon qu'elle contienne 5 doses d'épreuve par millilitre.

Préparez une série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de l'immunosérum à examiner de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de l'immunosérum à examiner. Complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Préparez une deuxième série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de la solution de la préparation de référence de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de la solution de la préparation de référence. Dans cette deuxième série, la dilution médiane de la préparation de référence correspond au mélange contenant 10 UI d'antitoxine (2,0 mL de la solution de la préparation de référence). Complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer les mélanges des 2 séries à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 60 min. Utilisez un groupe de 6 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles, par voie intraveineuse, 0,5 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 72 h.

Le mélange renfermant la quantité maximale d'antitoxine qui ne protège aucune souris de la mort, contient 10 UI. Cette quantité sert à calculer l'activité de l'immunosérum en Unités Internationales par millilitre.

L'essai n'est valable que si toutes les souris inoculées avec les mélanges contenant 2,0 mL ou moins de solution de la préparation de référence meurent et que si toutes les souris inoculées avec les mélanges contenant un plus grand volume de cette solution survivent.

**01/2008:0090**

# IMMUNOSÉRUM GANGRENEUX POLYVALENT

## Immunoserum gangraenicum mixtum

Immunosérums

### DÉFINITION

L'immunosérum gangreneux polyvalent est préparé par mélange en proportions convenables d'immunosérum gangreneux (Clostridium novyi), d'immunosérum gangreneux (Clostridium perfringens) et d'immunosérum gangreneux (Clostridium septicum).

### IDENTIFICATION

L'immunosérum gangreneux polyvalent neutralise spécifiquement les toxines alpha formées par *Clostridium novyi* (ancienne nomenclature *Clostridium oedematiens*), *Clostridium perfringens* et *Clostridium septicum* en les rendant inoffensives pour les animaux réceptifs.

### ACTIVITÉ

L'immunosérum gangreneux polyvalent contient au minimum, par millilitre, 1000 UI d'antitoxine d'immunosérum gangreneux (Clostridium novyi), 1000 UI d'antitoxine d'immunosérum gangreneux (Clostridium perfringens) et 500 UI d'antitoxine d'immunosérum gangreneux (Clostridium septicum).

Evaluez l'activité par titrage biologique pour chaque constituant d'après les indications respectives des monographies *Immunosérum gangreneux (Clostridium novyi) (0087)*, *Immunosérum gangreneux (Clostridium perfringens) (0088)* et *Immunosérum gangreneux (Clostridium septicum) (0089)*.

**01/2008:0091**

# IMMUNOSÉRUM TÉTANIQUE POUR USAGE HUMAIN

## Immunoserum tetanicum ad usum humanum

### DÉFINITION

L'immunosérum tétanique pour usage humain est une préparation contenant des globulines antitoxiques douées du pouvoir de neutraliser spécifiquement la toxine formée par *Clostridium tetani*.

### PRODUCTION

Il est obtenu par fractionnement du sérum de cheval ou d'autres mammifères immunisés contre la toxine tétanique.

### IDENTIFICATION

L'immunosérum tétanique neutralise spécifiquement la toxine formée par *Cl. tetani*, en la rendant inoffensive pour les animaux réceptifs.

### ACTIVITÉ

L'immunosérum tétanique contient au minimum 1000 UI d'antitoxine par millilitre s'il est destiné à l'usage prophylactique et au minimum 3000 UI d'antitoxine par millilitre s'il est destiné à l'usage thérapeutique.

L'activité de l'immunosérum tétanique est évaluée par détermination de la dose permettant d'assurer la protection des cobayes ou des souris contre les effets paralysants d'une dose donnée de toxine tétanique. Cette dose est comparée avec la quantité de préparation étalon d'immunosérum tétanique nécessaire pour assurer la même protection. Dans les pays où l'usage de la méthode paralysante n'est pas obligatoire, l'essai par la méthode létale peut être utilisé. Dans ce cas, le nombre d'animaux et la méthode sont identiques à ceux décrits pour l'essai par la méthode paralysante. La seule différence réside dans le fait que la fin de l'essai est marquée par la mort de l'animal et non par le moment où survient la paralysie et que la dose Lp/10 est remplacée par la dose L+/10. Le titrage biologique exige l'emploi d'une préparation de référence d'immunosérum tétanique étalonnée en Unités Internationales et d'une préparation appropriée de toxine tétanique destinée à servir de toxine d'épreuve. L'activité de la toxine d'épreuve est déterminée par rapport à la préparation de référence ; l'activité de l'immunosérum tétanique à examiner est déterminée par rapport à l'activité de la toxine d'épreuve, par la même méthode.

L'Unité Internationale d'antitoxine correspond à l'activité neutralisante spécifique à l'égard de la toxine tétanique contenue dans une quantité donnée de préparation étalon internationale constituée par du sérum desséché de cheval immunisé. La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée périodiquement par l'Organisation Mondiale de la Santé.

*Choix des animaux.* Si des souris sont utilisées, l'écart de masse entre l'animal le plus léger et l'animal le plus lourd n'excède pas 5 g.

*Préparation de la toxine d'épreuve.* Préparez la toxine d'épreuve à partir du filtrat stérile d'une culture de 9 jours environ de *Cl. tetani* en milieu liquide. Au filtrat, ajoutez 1 à 2 volumes de glycérol. Conservez la toxine à une température légèrement inférieure à 0 °C. La toxine d'épreuve peut également être préparée par précipitation par le *sulfate d'ammonium R* ajouté au filtrat. Le précipité recueilli, contenant la toxine, est desséché sous vide sur *pentoxyde de diphosphore R*, pulvérisé et conservé à l'état sec, en ampoules scellées ou sous vide sur *pentoxyde de diphosphore R*.

*Détermination de la dose d'épreuve de toxine* (dose Lp/10). Préparez une solution de la préparation de référence dans un liquide approprié de façon qu'elle contienne 0,5 UI d'antitoxine par millilitre.

Si la toxine est conservée à l'état sec, reconstituez-la avec un liquide approprié.

Préparez une série de mélanges de la solution de la préparation de référence et de la toxine d'épreuve de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de la solution de la préparation de référence et une quantité variable de toxine d'épreuve, puis complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 60 min. Utilisez un groupe de 6 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles par voie sous-cutanée 0,5 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 96 h. Celles qui sont atteintes de paralysie peuvent être euthanasiées.

La dose d'épreuve de toxine correspond à la quantité présente dans 0,5 mL du mélange réalisé avec la plus petite quantité de toxine qui provoque, pendant la période d'observation, la paralysie chez les 6 souris auxquelles il a été administré, malgré la neutralisation partielle due à la préparation de référence.

*Détermination de l'activité de l'immunosérum.* Préparez une solution de la préparation de référence dans un liquide approprié de façon qu'elle contienne 0,5 UI d'antitoxine par millilitre.

Préparez une solution de la toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon qu'elle contienne 5 doses d'épreuve par millilitre.

Préparez une série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de l'immunosérum à examiner de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de l'immunosérum à examiner. Complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Préparez une deuxième série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de la solution de la préparation de référence de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de la solution de la préparation de référence. Dans cette deuxième série, la dilution médiane de la préparation de référence correspond au mélange contenant 1 UI d'antitoxine (2,0 mL de la solution de la préparation de référence). Complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer les mélanges des 2 séries à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 60 min. Utilisez un groupe de 6 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles, par voie sous-cutanée, 0,5 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 96 h. Celles qui sont atteintes de paralysie peuvent être euthanasiées.

Le mélange renfermant la quantité maximale d'antitoxine qui ne protège aucune souris de la paralysie contient 1 UI. Cette quantité sert à calculer l'activité de l'immunosérum en Unités Internationales par millilitre.

L'essai n'est valable que si toutes les souris inoculées avec le mélange contenant 2,0 mL ou moins de solution de la préparation de référence sont atteintes de paralysie et que si toutes les souris inoculées avec les mélanges contenant un plus grand volume de cette solution sont indemnes.

# IMMUNOSÉRUMS POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

Immunosérums

**01/2008:0339**

# IMMUNOSÉRUM CLOSTRIDIUM NOVYI ALPHA POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Immunoserum Clostridii novyi alpha ad usum veterinarium

### DÉFINITION

L' immunosérum Clostridium novyi alpha pour usage vétérinaire est une préparation contenant des globulines douées du pouvoir de neutraliser spécifiquement la toxine alpha formée par *Clostridium novyi*. L' immunosérum est constitué par le sérum ou une préparation obtenue à partir du sérum d'animaux immunisés contre la toxine alpha de *C. novyi*.

### PRODUCTION

*CHOIX DE LA COMPOSITION*

Il convient de démontrer que l'immunosérum est satisfaisant en ce qui concerne l'innocuité (*5.2.6*) et l'efficacité (*5.2.7*). Dans ce dernier cas, il doit être démontré pour chaque espèce cible que le produit, lorsqu'il est administré à la dose minimale recommandée et selon le(s) schéma(s) recommandé(s), induit une ou plusieurs réponses immunitaires en conformité avec les indications données pour le produit.

**Essai d'activité effectué sur chaque lot**. L'essai décrit sous Activité n'est pas nécessairement employé pour l'essai de routine des lots d'immunosérum. Il est effectué une ou plusieurs fois selon les modalités établies par ou avec l'accord de l'Autorité compétente ; lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot d'immunosérum qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité et qui a été démontré satisfaisant en ce qui concerne le pouvoir immunogène chez la ou les espèces cibles. L'essai suivant peut être effectué après qu'il a été établi qu'il y a une corrélation satisfaisante avec l'essai décrit sous Activité.

Déterminez le taux d'anticorps dirigés contre la toxine alpha de *C. novyi* dans le lot d'immunosérum, par une méthode appropriée telle qu'une méthode immunochimique (*2.7.1*) ou par neutralisation en culture cellulaire. Utilisez un sérum de référence homologue étalonné en Unités Internationales d'immunosérum Clostridium novyi alpha.

L'Unité Internationale correspond à l'activité neutralisante spécifique à l'égard de la toxine alpha de *C. novyi*, contenue dans une quantité donnée de l'étalon international constitué par du sérum desséché de cheval immunisé. La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

L'activité du produit fini est exprimée en Unités Internationales par millilitre et ne doit pas être inférieure au nombre minimal indiqué sur l'étiquette.

### IDENTIFICATION

Il est démontré, par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), que l'immunosérum réagit de manière spécifique avec la toxine alpha produite par *C. novyi*.

### ACTIVITÉ

L'activité de l'immunosérum Clostridium novyi alpha est évaluée par détermination de la dose permettant d'assurer la protection de souris ou d'autres animaux appropriés contre les effets toxiques d'une dose donnée de toxine alpha de *C. novyi*. Cette dose est comparée à une quantité d'une préparation de référence d'immunosérum clostridium novyi alpha étalonnée en Unités Internationales, nécessaire pour assurer la même protection. Le titrage biologique exige l'emploi d'une préparation appropriée de toxine alpha de *C. novyi* destinée à servir de toxine d'épreuve. La dose de toxine d'épreuve est déterminée par rapport à la préparation de référence ; l'activité de l'immunosérum à examiner est déterminée par rapport à l'activité de la préparation de référence à l'aide de la toxine d'épreuve.

**Préparation de la toxine d'épreuve**. Préparez la toxine d'épreuve à partir du filtrat stérile d'une culture d'environ 5 jours de *C. novyi* type B en milieu liquide et desséchez-la par une méthode appropriée. Choisissez la toxine d'épreuve en déterminant sur souris la dose L+/10 et la $DL_{50}$, la période d'observation étant de 72 h. La toxine alpha appropriée contient au moins une dose L+/10 dans 0,05 mg et au moins 10 $DL_{50}$ dans une dose L+/10.

**Détermination de la dose d'épreuve de toxine**. Préparez une solution de la préparation de référence dans un liquide approprié de façon que son activité soit de 1 UI/mL. Préparez une solution de toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon que 1 mL en contienne une quantité exactement connue, par exemple 1 mg. Préparez des mélanges de la solution de préparation de référence et de la solution de toxine d'épreuve de façon qu'ils contiennent chacun 1,0 mL de la solution de préparation de référence (1 UI) et une quantité variable de solution de toxine d'épreuve, puis complétez chaque mélange au même volume final de 2,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer les mélanges à température ambiante pendant 60 min. Utilisez pour chaque mélange un groupe d'au moins 2 souris pesant chacune 17-22 g. Injectez à chacune d'elles, par voie intramusculaire ou sous-cutanée, 0,2 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 72 h. Si toutes les souris meurent, la quantité de toxine présente dans 0,2 mL du mélange dépasse la dose d'épreuve. Si aucune des souris ne meurt, la quantité de toxine présente dans 0,2 mL du mélange est inférieure à la dose d'épreuve. Préparez de nouveaux mélanges de façon qu'ils contiennent chacun dans 2,0 mL, 1,0 mL de la solution de préparation de référence (1 UI) et une quantité variable de la solution de toxine d'épreuve appartenant à une série dont chaque concentration diffère l'une de l'autre d'au plus 20 pour cent, et qui recouvre le point final présumé. Laissez reposer les mélanges à température ambiante pendant 60 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles, par voie intramusculaire ou sous-cutanée, 0,2 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 72 h. Répétez la détermination au moins 1 fois et additionnez les résultats des essais effectués avec les mélanges de même composition, de façon à obtenir une série de totaux dont chacun représente la mortalité due à un mélange d'une composition donnée. La dose d'épreuve de toxine correspond à la quantité présente dans 0,2 mL du mélange qui provoque la mort de la moitié des souris auxquelles il a été inoculé.

**Détermination de l'activité de l'immunosérum à examiner**

*Essai préliminaire*. Dissolvez une quantité de la toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon que la solution contienne 10 doses d'épreuve par millilitre (solution de toxine d'épreuve). Préparez une série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de l'immunosérum à examiner de façon qu'ils contiennent chacun 1,0 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de l'immunosérum à examiner. Complétez chaque mélange au même volume final de 2,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer les mélanges à température ambiante pendant 60 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles, par voie intramusculaire ou sous-cutanée, 0,2 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 72 h. Si aucune souris ne meurt, 0,2 mL du mélange contient plus de 0,1 UI. Si toutes les souris meurent, 0,2 mL du mélange contient moins de 0,1 UI.

*Essai définitif*. Préparez une série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de l'immunosérum à examiner de façon qu'ils contiennent chacun dans 2,0 mL, 1,0 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de l'immunosérum à examiner appartenant à une série dont chaque concentration diffère l'une de l'autre d'au plus 20 pour cent, et qui recouvre le

Immunosérums

point final présumé, comme déterminé dans l'essai préliminaire. Préparez d'autres mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de solution de préparation de référence de façon qu'ils contiennent chacun dans 2,0 mL, 1,0 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de solution de la préparation de référence afin de vérifier la dose d'épreuve de toxine. Laissez reposer les mélanges à température ambiante pendant 60 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 souris pour chaque mélange et procédez comme indiqué dans l'essai préliminaire. Le mélange à examiner qui contient 0,1 UI dans 0,2 mL est celui qui provoque la mort du même ou presque du même nombre de souris que le mélange de référence contenant 0,1 UI dans 0,2 mL. Répétez la détermination au moins 1 fois et calculez la moyenne de tous les résultats significatifs. L'essai n'est valable que si le résultat obtenu avec la préparation de référence ne diffère pas de plus de 20 pour cent de la valeur escomptée.

Les limites de confiance ($P$ = 0,95) sont évaluées comme suit :

– 85 pour cent et 114 pour cent lorsque 2 animaux sont utilisés par dose,
– 91,5 pour cent et 109 pour cent lorsque 4 animaux sont utilisés par dose,
– 93 pour cent et 108 pour cent lorsque 6 animaux sont utilisés par dose.

L'activité du produit fini est exprimée en Unités Internationales par millilitre et ne doit pas être inférieure au nombre minimal indiqué sur l'étiquette.

**01/2008:0340**

# IMMUNOSÉRUM CLOSTRIDIUM PERFRINGENS BÊTA POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Immunoserum Clostridii perfringentis beta ad usum veterinarium

DÉFINITION

L'immunosérum Clostridium perfringens bêta pour usage vétérinaire est une préparation contenant essentiellement des globulines douées du pouvoir de neutraliser spécifiquement la toxine bêta formée par les types B et C de *Clostridium perfringens*. L'immunosérum est constitué par le sérum ou une préparation obtenue à partir du sérum d'animaux immunisés contre la toxine bêta de *Clostridium perfringens*.

PRODUCTION

*CHOIX DE LA COMPOSITION*

Il convient de démontrer que l'immunosérum est satisfaisant en ce qui concerne l'innocuité (*5.2.6*) et l'efficacité (*5.2.7*). Dans ce dernier cas, il doit être démontré pour chaque espèce cible que le produit, lorsqu'il est administré à la dose minimale recommandée et selon le(s) schéma(s) recommandé(s), induit une ou plusieurs réponses immunitaires en conformité avec les indications données pour le produit.

**Essai d'activité effectué sur chaque lot**. L'essai décrit sous Activité n'est pas nécessairement employé pour l'essai de routine des lots d'immunosérum. Il est effectué une ou plusieurs fois selon les modalités établies par ou avec l'accord de l'Autorité compétente ; lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot d'immunosérum qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité et qui a été démontré satisfaisant en ce qui concerne le pouvoir immunogène chez la ou les espèces cibles. L'essai suivant peut être effectué après qu'il a été établi qu'il y a une corrélation satisfaisante avec l'essai décrit sous Activité.

Déterminez le taux d'anticorps dirigés contre la toxine bêta de *C. perfringens* dans le lot d'immunosérum, par une méthode appropriée telle qu'une méthode immunochimique (*2.7.1*) ou par neutralisation en culture cellulaire. Utilisez un sérum de référence homologue étalonné en Unités Internationales d'immunosérum Clostridium perfringens bêta.

L'Unité Internationale correspond à l'activité neutralisante spécifique à l'égard de la toxine bêta de *C. perfringens*, contenue dans une quantité donnée de l'étalon international constitué par du sérum desséché de cheval immunisé. La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

L'activité du produit fini est exprimée en Unités Internationales par millilitre et ne doit pas être inférieure au nombre minimal indiqué sur l'étiquette.

IDENTIFICATION

Il est démontré, par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), que l'immunosérum réagit de manière spécifique avec la toxine bêta produite par *C. perfringens*.

ACTIVITÉ

L'activité de l'immunosérum Clostridium perfringens bêta est évaluée par détermination de la dose permettant d'assurer la protection de souris ou d'autres animaux appropriés contre les effets toxiques d'une dose donnée de toxine bêta de *C. perfringens*. Cette dose est comparée à la quantité d'une préparation de référence d'immunosérum Clostridium perfringens bêta, étalonnée en Unités Internationales, nécessaire pour assurer la même protection. Le titrage biologique exige l'emploi d'une préparation appropriée de toxine bêta de *C. perfringens* destinée à servir de toxine d'épreuve. La dose de toxine d'épreuve est déterminée par rapport à la préparation de référence ; l'activité de l'immunosérum à examiner est déterminée par rapport à l'activité de la préparation de référence à l'aide de la toxine d'épreuve.

**Préparation de la toxine d'épreuve**. Préparez la toxine d'épreuve à partir du filtrat stérile d'une culture jeune de *C. perfringens* type B ou C en milieu liquide et desséchez-la par une méthode appropriée. Choisissez la toxine d'épreuve en déterminant sur souris la dose L+ et la $DL_{50}$, la période d'observation étant de 72 h. La toxine bêta appropriée contient au moins une dose L+ dans 0,2 mg et au moins 25 $DL_{50}$ dans une dose L+.

**Détermination de la dose d'épreuve de toxine**. Préparez une solution de la préparation de référence dans un liquide approprié de façon qu'elle contienne 5 UI/mL. Préparez une solution de toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon que 1 mL en contienne une quantité exactement connue, par exemple 10 mg. Préparez des mélanges de la solution de préparation de référence et de la solution de toxine d'épreuve de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de la solution de préparation de référence (10 UI) et une quantité variable de la solution de toxine d'épreuve, puis complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer les mélanges à température ambiante pendant 30 min. Utilisez pour chaque mélange un groupe d'au moins 2 souris pesant chacune 17-22 g. Injectez à chacune d'elles, par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, 0,5 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 72 h. Si toutes les souris meurent, la quantité de toxine présente dans 0,5 mL du mélange dépasse la dose d'épreuve. Si aucune des souris ne meurt, la quantité de toxine présente dans 0,5 mL du mélange est inférieure à la dose d'épreuve. Préparez de nouveaux mélanges de façon qu'ils contiennent chacun dans 5,0 mL, 2,0 mL de la solution de préparation de référence (10 UI) et une quantité variable de la solution de toxine d'épreuve appartenant à une série dont chaque concentration diffère l'une de l'autre d'au plus 20 pour cent, et qui recouvre le point final présumé. Laissez reposer les mélanges à température ambiante pendant 30 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles, par voie intraveineuse ou intrapéritonéale 0,5 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 72 h. Répétez la détermination au moins 1 fois et additionnez

Immunosérums

les résultats des essais effectués avec les mélanges de même composition, de façon à obtenir une série de totaux dont chacun représente la mortalité due à un mélange d'une composition donnée. La dose d'épreuve de toxine correspond à la quantité présente dans 0,5 mL du mélange qui provoque la mort de la moitié des souris auxquelles il a été inoculé.

**Détermination de l'activité de l'immunosérum à examiner**

*Essai préliminaire*. Dissolvez une quantité de la toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon que 2,0 mL contiennent 10 doses d'épreuve (solution de toxine d'épreuve). Préparez une série de mélanges de la solution de la toxine d'épreuve et de l'immunosérum à examiner de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de l'immunosérum à examiner. Complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer les mélanges à température ambiante pendant 30 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, 0,5 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 72 h. Si aucune souris ne meurt, 0,5 mL du mélange contient plus de 1 UI et si toutes les souris meurent, 0,5 mL du mélange contient moins de 1 UI.

*Essai définitif*. Préparez une série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de l'immunosérum à examiner de façon qu'ils contiennent chacun dans 5,0 mL, 2,0 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de l'immunosérum à examiner appartenant à une série dont chaque concentration diffère l'une de l'autre d'au plus 20 pour cent, et qui recouvre le point final présumé, comme déterminé dans l'essai préliminaire. Préparez d'autres mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de la solution de préparation de référence de façon qu'ils contiennent chacun dans 5,0 mL, 2,0 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de la solution de préparation de référence afin de vérifier la dose d'épreuve de toxine. Laissez reposer les mélanges à température ambiante pendant 30 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 souris pour chaque mélange et procédez comme indiqué dans l'essai préliminaire. Le mélange à examiner qui contient 1 UI dans 0,5 mL est celui qui provoque la mort du même ou presque du même nombre de souris que le mélange de référence contenant 1 UI dans 0,5 mL. Répétez la détermination au moins 1 fois et calculez la moyenne de tous les résultats significatifs. L'essai n'est valable que si le résultat obtenu avec la préparation de référence ne diffère pas de plus de 20 pour cent de la valeur escomptée.

Les limites de confiance ($P = 0{,}95$) sont évaluées comme suit :

- 85 pour cent et 114 pour cent lorsque 2 animaux sont utilisés par dose,
- 91,5 pour cent et 109 pour cent lorsque 4 animaux sont utilisés par dose,
- 93 pour cent et 108 pour cent lorsque 6 animaux sont utilisés par dose.

L'activité du produit fini est exprimée en Unités Internationales par millilitre et ne doit pas être inférieure au nombre minimal indiqué sur l'étiquette.

**01/2008:0341**

# IMMUNOSÉRUM CLOSTRIDIUM PERFRINGENS EPSILON POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Immunoserum Clostridii perfringentis epsilon ad usum veterinarium

### DÉFINITION

L'immunosérum Clostridium perfringens epsilon pour usage vétérinaire est une préparation contenant des globulines douées du pouvoir de neutraliser spécifiquement la toxine epsilon formée par le type D de *Clostridium perfringens*. L'immunosérum est constitué par le sérum ou une préparation obtenue à partir du sérum d'animaux immunisés contre la toxine epsilon de *C. perfringens*.

### PRODUCTION

*CHOIX DE LA COMPOSITION*

Il convient de démontrer que l'immunosérum est satisfaisant en ce qui concerne l'innocuité (*5.2.6*) et l'efficacité (*5.2.7*). Dans ce dernier cas, il doit être démontré pour chaque espèce cible que le produit, lorsqu'il est administré à la dose minimale recommandée et selon le(s) schéma(s) recommandé(s), induit une ou plusieurs réponses immunitaires en conformité avec les indications données pour le produit.

**Essai d'activité effectué sur chaque lot**. L'essai décrit sous Activité n'est pas nécessairement employé pour l'essai de routine des lots d'immunosérum. Il est effectué une ou plusieurs fois selon les modalités établies par ou avec l'accord de l'Autorité compétente ; lorsque cet essai n'est pas effectué, un autre essai validé approprié est effectué, les critères étant déterminés par rapport à un lot d'immunosérum qui a donné des résultats satisfaisants dans l'essai décrit sous Activité et qui a été démontré satisfaisant en ce qui concerne le pouvoir immunogène chez la ou les espèces cibles. L'essai suivant peut être effectué après qu'il a été établi qu'il y a une corrélation satisfaisante avec l'essai décrit sous Activité.

Déterminez le taux d'anticorps dirigés contre la toxine epsilon de *C. perfringens* dans le lot d'immunosérum, par une méthode appropriée telle qu'une méthode immunochimique (*2.7.1*) ou par neutralisation en culture cellulaire. Utilisez un sérum de référence homologue étalonné en Unités Internationales d'immunosérum Clostridium perfringens epsilon.

L'Unité Internationale correspond à l'activité neutralisante spécifique à l'égard de la toxine epsilon de *C. perfringens*, contenue dans une quantité donnée de l'étalon international constitué par du sérum desséché de cheval immunisé. La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

L'activité du produit fini est exprimée en Unités Internationales par millilitre et ne doit pas être inférieure au nombre minimal indiqué sur l'étiquette.

### IDENTIFICATION

Il est démontré, par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), que l'immunosérum réagit de manière spécifique avec la toxine epsilon produite par *C. perfringens*.

### ACTIVITÉ

L'activité de l'immunosérum Clostridium perfringens epsilon est évaluée par détermination de la dose permettant d'assurer la protection de souris ou d'autres animaux appropriés contre les effets toxiques d'une dose donnée de toxine epsilon de *C. perfringens*. Cette dose est comparée avec la quantité d'une préparation de référence d'immunosérum Clostridium perfringens epsilon étalonnée en Unités Internationales nécessaire pour assurer la même protection. Le titrage biologique exige l'emploi d'une préparation appropriée de toxine epsilon de *C. perfringens* destinée à servir de toxine d'épreuve. La dose de toxine d'épreuve est déterminée par rapport à la préparation de référence ; l'activité de l'immunosérum à examiner est déterminée par rapport à l'activité de la préparation de référence à l'aide de la toxine d'épreuve.

**Préparation de la toxine d'épreuve**. Préparez la toxine d'épreuve à partir du filtrat stérile d'une culture jeune de *C. perfringens* type D en milieu liquide et desséchez-la par une méthode appropriée. Choisissez la toxine d'épreuve en déterminant sur souris la dose L+/10 et la $DL_{50}$, la période

Immunosérums

d'observation étant de 72 h. La toxine epsilon appropriée contient au moins une dose L+/10 dans 0,005 mg et au moins 20 $DL_{50}$ dans une dose L+/10.

**Détermination de la dose d'épreuve de toxine**. Préparez une solution de la préparation de référence dans un liquide approprié de façon que son activité soit de 0,5 UI/mL. Préparez une solution de toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon que 1 mL en contienne une quantité exactement connue, par exemple 1 mg. Préparez des mélanges de la solution de préparation de référence et de la solution de toxine d'épreuve de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de la solution de préparation de référence (1 UI) et une quantité variable de la solution de toxine d'épreuve, puis complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer les mélanges à température ambiante pendant 30 min. Utilisez pour chaque mélange un groupe d'au moins 2 souris pesant chacune 17-22 g. Injectez à chacune d'elles, par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, 0,5 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 72 h. Si toutes les souris meurent, la quantité de toxine présente dans 0,5 mL du mélange dépasse la dose d'épreuve. Si aucune des souris ne meurt, la quantité de toxine présente dans 0,5 mL du mélange est inférieure à la dose d'épreuve. Préparez de nouveaux mélanges de façon qu'ils contiennent chacun dans 5,0 mL, 2,0 mL de la solution de préparation de référence (1 UI) et une quantité variable de la solution de toxine d'épreuve appartenant à une série dont chaque concentration diffère l'une de l'autre d'au plus 20 pour cent, et qui recouvre le point final présumé. Laissez reposer les mélanges à température ambiante, pendant 30 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, 0,5 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 72 h. Répétez la détermination au moins 1 fois et additionnez les résultats des essais effectués avec les mélanges de même composition, de façon à obtenir une série de totaux dont chacun représente la mortalité due à un mélange d'une composition donnée. La dose d'épreuve de toxine correspond à la quantité présente dans 0,5 mL du mélange qui provoque la mort de la moitié du nombre total de souris auxquelles il a été inoculé.

**Détermination de l'activité de l'immunosérum à examiner**

*Essai préliminaire*. Dissolvez une quantité de la toxine d'épreuve dans un liquide approprié de façon que 2,0 mL contiennent 10 doses d'épreuve (solution de toxine d'épreuve). Préparez une série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de l'immunosérum à examiner de façon qu'ils contiennent chacun 2,0 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de l'immunosérum à examiner. Complétez chaque mélange au même volume final de 5,0 mL avec un liquide approprié. Laissez reposer les mélanges à température ambiante pendant 30 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 souris pour chaque mélange. Injectez à chacune d'elles, par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, 0,5 mL du mélange attribué à son groupe. Mettez les souris en observation pendant 72 h. Si aucune souris ne meurt, 0,5 mL du mélange contient plus de 0,1 UI. Si toutes les souris meurent, 0,5 mL du mélange contient moins de 0,1 UI.

*Essai définitif*. Préparez une série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de l'immunosérum à examiner de façon qu'ils contiennent chacun dans 5,0 mL, 2,0 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de l'immunosérum à examiner appartenant à une série dont chaque concentration diffère l'une de l'autre d'au plus 20 pour cent, et qui recouvre le point final présumé, comme déterminé dans l'essai préliminaire. Préparez d'autres mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de la solution de préparation de référence de façon qu'ils contiennent chacun dans 5,0 mL, 2,0 mL de la solution de toxine d'épreuve et une quantité variable de la solution de préparation de référence afin de vérifier la dose d'épreuve de toxine. Laissez reposer les mélanges à température ambiante pendant 30 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 souris pour chaque mélange et procédez comme indiqué dans l'essai préliminaire. Le mélange à examiner qui contient 0,1 UI dans 0,5 mL est celui qui provoque la mort du même ou presque du même nombre de souris que le mélange de référence contenant 0,1 UI dans 0,5 mL. Répétez la détermination au moins 1 fois et calculez la moyenne de tous les résultats significatifs. L'essai n'est valable que si le résultat obtenu avec la préparation de référence ne diffère pas de plus de 20 pour cent de la valeur escomptée.

Les limites de confiance ($P$ = 0,95) sont évaluées comme suit :

– 85 pour cent et 114 pour cent lorsque 2 animaux sont utilisés par dose,
– 91,5 pour cent et 109 pour cent lorsque 4 animaux sont utilisés par dose,
– 93 pour cent et 108 pour cent lorsque 6 animaux sont utilisés par dose.

L'activité du produit fini est exprimée en Unités Internationales par millilitre et ne doit pas être inférieure au nombre minimal indiqué sur l'étiquette.

**01/2008:0343**

# IMMUNOSÉRUM TÉTANIQUE POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Immunoserum tetanicum ad usum veterinarium

DÉFINITION

L'immunosérum tétanique pour usage vétérinaire est une préparation contenant principalement des globulines douées du pouvoir de neutraliser spécifiquement la neurotoxine formée par *Clostridium tetani*. L'immunosérum est constitué par le sérum ou une préparation obtenue à partir du sérum d'animaux immunisés contre la toxine tétanique.

PRODUCTION

*CHOIX DE LA COMPOSITION*

Il convient de démontrer que l'immunosérum est satisfaisant en ce qui concerne l'innocuité (*5.2.6*) et l'efficacité (*5.2.7*). Dans ce dernier cas, il doit être démontré pour chaque espèce cible que le produit, lorsqu'il est administré à la dose minimale recommandée et selon le(s) schéma(s) recommandé(s), induit une ou plusieurs réponses immunitaires en conformité avec les indications données pour le produit. De plus, la capacité du produit à neutraliser la neurotoxine formée par *C. tetani* doit être démontrée en effectuant, par exemple, l'essai sur souris décrit ci-après.

**Démonstration de la neutralisation de la neurotoxine**. La capacité de l'immunosérum tétanique à neutraliser la neurotoxine de *C. tetani* est établie en déterminant la dose nécessaire à la protection des souris (ou des cobayes) contre les effets toxiques d'une dose donnée de toxine tétanique. L'essai doit être effectué parallèlement sur une préparation de référence d'immunosérum tétanique, étalonnée en Unités Internationales, en utilisant une quantité susceptible d'assurer la même protection. La capacité de l'immunosérum examiné à neutraliser la neurotoxine (activité) peut alors être exprimée en Unités Internationales. Pour cette étude, l'utilisation d'une préparation appropriée de toxine tétanique comme toxine d'épreuve est exigée. La dose de la toxine d'épreuve est déterminée par rapport à la préparation de référence ; l'activité de l'immunosérum à examiner est déterminée par rapport à l'activité de la préparation de référence à l'aide de la toxine d'épreuve.

**Préparation de la toxine d'épreuve**. Préparez la toxine d'épreuve à partir d'un filtrat stérile d'une culture de 8 à 10 jours de *C. tetani* en milieu liquide. Une toxine d'épreuve peut être préparée par addition de ce filtrat à du *glycérol R* dans la proportion de 1 volume de filtrat pour 1 ou 2 volumes de *glycérol R*. La solution de la toxine d'épreuve peut être conservée à une température égale ou légèrement inférieure

Immunosérums

à 0 °C. La toxine peut aussi être desséchée par une méthode appropriée. Choisissez la toxine d'épreuve en déterminant sur souris la dose Lp/10 et la dose paralysante 50 pour cent. La toxine tétanique appropriée contient au moins 1000 doses paralysantes 50 pour cent dans 1 dose Lp/10.

**Dose Lp/10 (seuil paralytique)**. Cette dose est la plus petite quantité de toxine qui, lorsqu'elle est mélangée à 0,1 UI d'antitoxine et inoculée par voie sous-cutanée à des souris (ou cobayes), provoque la paralysie tétanique chez les animaux dans les 4 jours qui suivent l'inoculation.

**Dose paralysante 50 pour cent**. Cette dose est la quantité de toxine qui, lorsqu'elle est inoculée par voie sous-cutanée à des souris (ou cobayes), provoque la paralysie tétanique de la moitié des animaux traités dans les 4 jours qui suivent l'inoculation.

**Détermination de la dose d'épreuve de toxine**. Reconstituez ou diluez la préparation de référence dans un liquide approprié de façon qu'elle contienne 0,5 UI/mL. Mesurez ou pesez une quantité de la toxine d'épreuve et diluez ou dissolvez dans un liquide approprié. Préparez des mélanges de la solution de préparation de référence et de la solution de toxine d'épreuve de façon qu'ils contiennent chacun 0,1 UI d'antitoxine dans le volume choisi et une quantité variable de la solution de toxine d'épreuve appartenant à une série dont chaque concentration diffère l'une de l'autre d'au plus 20 pour cent, et qui recouvre le point final présumé. Complétez chaque mélange avec un liquide approprié au même volume final (0,4 mL à 0,6 mL si des souris sont utilisées ou 4,0 mL si des cobayes sont utilisés). Laissez reposer les mélanges à température ambiante pendant 60 min. Utilisez pour chaque mélange un groupe d'au moins 2 animaux. Injectez à chacun d'eux, par voie sous-cutanée, le volume choisi. Mettez les animaux en observation pendant 96 h et notez quotidiennement le degré de tétanos provoqué dans chaque groupe d'animaux traités. Répétez la détermination au moins 1 fois et calculez la dose d'épreuve comme étant la moyenne des essais successifs. La dose d'épreuve de toxine est la quantité contenue dans le mélange qui provoque la paralysie tétanique de la moitié des animaux traités.

**Détermination de la capacité de neutralisation de l'immunosérum à examiner**

*Essai préliminaire*. Mesurez ou pesez une quantité de la toxine d'épreuve et diluez ou dissolvez dans un liquide approprié de façon que la solution contienne 5 doses d'épreuve par millilitre (solution de toxine d'épreuve). Préparez une série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de l'antitoxine à examiner de façon qu'ils contiennent chacun une dose d'épreuve de toxine et une quantité variable de l'antitoxine à examiner dans le volume choisi. Complétez chaque mélange au même volume final avec un liquide approprié. Laissez reposer les mélanges à température ambiante pendant 60 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 animaux pour chaque mélange. Injectez à chacun d'eux par voie sous-cutanée le volume choisi du mélange attribué à son groupe. Mettez les animaux en observation pendant 96 h et notez quotidiennement le degré de tétanos dans chaque groupe d'animaux. D'après les résultats obtenus choisissez des mélanges appropriés pour l'essai définitif.

*Essai définitif*. Préparez une série de mélanges de la solution de toxine d'épreuve et de l'antitoxine à examiner de façon que le volume choisi contienne une dose d'épreuve de toxine et une quantité variable de l'antitoxine à examiner appartenant à une série dont chaque concentration diffère l'une de l'autre d'au plus 20 pour cent, et qui recouvre le point final présumé, comme déterminé dans l'essai préliminaire. Préparez une série d'autres mélanges avec la même quantité de toxine d'épreuve et une quantité variable de la solution de préparation de référence, de façon que la concentration médiane soit de 0,1 UI dans le volume choisi afin de vérifier la dose d'épreuve de toxine. Diluez chaque mélange dans un liquide approprié au même volume final. Laissez reposer les mélanges à température ambiante pendant 60 min. Utilisez un groupe d'au moins 2 animaux pour chaque mélange. Injectez à chacun d'eux, par voie sous-cutanée le volume choisi du mélange attribué à son groupe. Mettez les animaux en observation pendant 96 h et notez quotidiennement le degré de tétanos dans chaque groupe d'animaux. Le mélange à examiner qui contient 0,1 UI dans le volume choisi est celui qui provoque la paralysie tétanique du même, ou presque du même nombre d'animaux que le mélange de référence contenant 0,1 UI dans le volume choisi. Répétez la détermination au moins 1 fois et calculez la moyenne de tous les résultats significatifs. L'essai n'est valable que si le résultat obtenu avec la préparation de référence ne diffère pas de plus de 20 pour cent de la valeur escomptée.

Les limites de confiance ($P$ = 0,95) sont évaluées comme suit :

- 85 pour cent et 114 pour cent lorsque 2 animaux sont utilisés par dose,
- 91,5 pour cent et 109 pour cent lorsque 3 animaux sont utilisés par dose,
- 93 pour cent et 108 pour cent lorsque 6 animaux sont utilisés par dose.

## IDENTIFICATION

Il est démontré, par une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), que l'immunosérum réagit de manière spécifique avec la neurotoxine produite par *C. tetani*. L'essai d'activité peut également servir à l'identification.

## ACTIVITÉ

Déterminez le titre en anticorps dirigés contre la neurotoxine formée par *C. tetani* à l'aide d'une méthode immunochimique appropriée (*2.7.1*), par exemple un essai d'inhibition de liaison de la toxine (essai ToBI), et d'un sérum de référence homologue, étalonné en Unités Internationales par millilitre.

L'Unité Internationale correspond à l'activité neutralisante spécifique à l'égard de la toxine tétanique, contenue dans une quantité donnée de l'étalon international constitué par du sérum desséché de cheval immunisé. La correspondance entre l'Unité Internationale et l'étalon international est indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

L'activité du produit fini est exprimée en Unités Internationales par millilitre et ne doit pas être inférieure au nombre minimal indiqué sur l'étiquette.

# PRÉPARATIONS RADIOPHARMACEUTIQUES ET MATIÈRES PREMIÈRES POUR PRÉPARATIONS RADIOPHARMACEUTIQUES

Préparations radiopharmaceutiques

**01/2008:1922**

# ALBUMINE HUMAINE IODÉE ($^{125}$I) (SOLUTION INJECTABLE D')

## Iodinati ($^{125}$I) humani albumini solutio iniectabilis

DÉFINITION

Solution stérile et exempte d'endotoxines bactériennes d'albumine d'origine humaine marquée à l'iode-125. La solution peut contenir un tampon approprié et un conservateur antimicrobien. L'albumine humaine utilisée est conforme aux exigences de la monographie *Solution d'albumine humaine (0255)*.

*Teneur* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due à l'iode-125, indiquée à la date figurant sur l'étiquette.

*Pureté* :

– au minimum 99,0 pour cent de la radioactivité totale correspond à l'iode-125,
– au minimum 80 pour cent de la radioactivité totale est liée aux fractions d'albumine II à V,
– au maximum 5 pour cent de la radioactivité totale correspond à l'iodure libre.

*Teneur en albumine* : 95 pour cent à 105 pour cent de la teneur en albumine indiquée sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore ou jaune pâle.

*Période et nature du rayonnement de l'iode-125* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides*.

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie de rayonnement gamma et de rayonnement X.

*Comparaison* : solution étalon d'iode-125 ou en utilisant un appareil étalonné. Des solutions étalons d'iode-125 et/ou des services d'étalonnage sont disponibles auprès de l'Autorité compétente.

*Résultats* : le spectre obtenu avec la préparation à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une solution étalon d'iode-125, mises à part des différences imputables à la présence d'iode-126. L'énergie du photon principal est de 0,027 MeV, correspondant au rayonnement X du tellure ; des photons gamma d'une énergie de 0,035 MeV sont présents également. L'iode-126 a une période de 13,11 jours et l'énergie des photons gamma principaux est de 0,388 MeV et de 0,666 MeV.

B. Examinez la préparation à examiner par une technique appropriée d'immunoélectrophorèse (*2.7.1*). A l'aide d'un immunosérum du sérum humain normal, comparez un sérum humain normal et la préparation à examiner, tous deux dilués si nécessaire. Le composant principal de la préparation à examiner correspond au composant principal du sérum humain normal. D'autres protéines plasmatiques peuvent être présentes en faibles quantités dans la solution diluée.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 5,0 à 9,0.

**Albumine**

*Solution de référence*. Diluez de la *solution d'albumine humaine R* avec une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L de façon à obtenir une concentration de 5 mg d'albumine par millilitre.

A 1,0 mL de la préparation à examiner et 1,0 mL de solution de référence, ajoutez 4,0 mL de *réactif au biuret R* et mélangez. Après 30 min exactement, mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 540 nm en utilisant comme liquide de compensation une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, traitée de la même manière. Calculez la teneur en albumine en milligrammes par millilitre à partir des absorbances mesurées.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 175/*V* UI/mL, *V* étant la dose maximale recommandée en millilitres.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Iode-125** : au minimum 99,0 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie de rayonnement gamma et de rayonnement X.

*Comparaison* : solution étalon d'iode-125.

Déterminez les quantités relatives d'iode-125 et d'iode-126.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**Iode-125 lié aux fractions d'albumine II à V, iode-125 sous forme d'iodure**. Chromatographie d'exclusion (*2.2.30*).

*Solution à examiner*. Mélangez 0,25 mL de préparation à examiner avec 0,25 mL de phase mobile. Utilisez le mélange immédiatement après sa préparation.

*Solution témoin*. *Solution d'albumine humaine R* ou toute autre préparation d'albumine standardisée, diluée avec la phase mobile à une concentration appropriée d'albumine.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,6 m, Ø = 7,5 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice pour chromatographie d'exclusion R*,
– *température* : 25 °C.

*Phase mobile* : dissolvez 11,24 g de *phosphate monopotassique R*, 42,0 g de *phosphate disodique R*, 11,70 g de *chlorure de sodium R* dans 2000 mL d'*eau R*.

*Débit* : 0,6 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 280 nm et détecteur de radioactivité étalonné pour l'iode-125 montés en série.

*Injection* : injecteur à boucle.

*Enregistrement* : 85 min.

*Temps de rétention* :

| n° du pic | Fraction | Description du composé | Temps de rétention (min) |
|---|---|---|---|
| 1 | I | Composé de masse moléculaire élevée | 18 - 20 |
| 2 | II | Albumine poly III | 23 - 24 |
| 3 | III | Albumine poly II | 25 - 26 |
| 4 | IV | Albumine poly I | 28 |
| 5 | V | Sérum-albumine humaine | 29 - 31 |
| 6 | VI | Iodure | 43 - 45 |

Le pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin correspond à la fraction V.

*Limites* :

– *radioactivité liée aux fractions II à V* : au minimum 80 pour cent de la radioactivité totale déposée sur la colonne,
– *iode-125 dans la fraction VI* : au maximum 5 pour cent de la radioactivité totale.

RADIOACTIVITÉ

Mesurez la radioactivité de la préparation à examiner à l'aide d'un appareillage approprié en comparant avec une solution étalon d'iode-125 ou en utilisant un appareillage étalonné.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– la teneur en albumine,
– le volume maximal à injecter.

**01/2008:1492**
**corrigé 7.0**

# AMMONIAQUE ($^{13}$N) (SOLUTION INJECTABLE D')

## Ammoniae ($^{13}$N) solutio iniectabilis

DÉFINITION

Solution stérile de [$^{13}$N]ammoniaque à usage diagnostique.

*Azote-13* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due à l'azote-13, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement de l'azote-13* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.
   *Résultats* : l'énergie de tous les photons gamma est de 0,511 MeV et selon la géométrie de mesure, il peut apparaître un pic somme de 1,022 MeV.
B. Essai A de pureté radionucléidique (voir Essai).
C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).
   *Résultat* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 5,5 à 8,5.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 175/*V* UI/mL, *V* étant la dose maximale recommandée en millilitres. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Aluminium** : au maximum 2 ppm. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*Solution à examiner.* Dans un tube à essai d'un diamètre intérieur d'environ 12 mm, mélangez 1 mL de *solution tampon acétate pH 4,6 R* et 2 mL d'une dilution au 1/20 de la préparation à examiner dans de l'*eau R*. Ajoutez 0,05 mL d'une solution de *chromazurol S R* à 10 g/L.

*Solution témoin.* Préparez simultanément et dans les mêmes conditions que la solution à examiner avec 2 mL d'une dilution au 1/20 de la *solution à 2 ppm d'aluminium (Al) R.*

Après 3 min, la coloration de la solution à examiner n'est pas plus intense que celle de la solution témoin.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin des essais A et B.

A. *Demi-vie.* La période est de 9 min à 11 min.
B. *Impuretés émettrices gamma* : au maximum 1,0 pour cent de la radioactivité totale.
   *Spectrométrie gamma.* Conservez un échantillon de la préparation à examiner pendant 2 h. Examinez le spectre de rayonnement gamma de la préparation à examiner, après décroissance, pour détecter la présence éventuelle d'impuretés radionucléidiques, et si possible les identifier et les quantifier.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{13}$N]Ammoniaque**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Solution témoin.* Prélevez 1,0 mL d'*ammoniaque diluée R2* et complétez à 10,0 mL avec de l'*eau R*.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,04 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *résine échangeuse de cations R* (10 µm),
– *température* : constante, à 20-30 °C.

*Phase mobile* : *acide nitrique 0,002 M.*

*Débit* : 2 mL/min.

*Détection* : détecteur de radioactivité approprié et détecteur à conductivité.

*Conformité du système* : le pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner et le détecteur de radioactivité est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin et le détecteur à conductivité.

*Limite* :

– *[$^{13}$N]ammoniaque* : au minimum 99 pour cent de la radioactivité totale due à l'azote-13.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

IMPURETÉS

A. [$^{13}$N]$O_2^-$,
B. [$^{13}$N]$O_3^-$,
C. [$^{18}F^-$],
D. $H_2$[$^{15}$O].

**01/2008:1607**

# CARBONE (MONOXYDE ($^{15}$O) DE)

## Carbonei monoxidum ($^{15}$O)

DÉFINITION

Mélange composé de [$^{15}$O]monoxyde de carbone en phase gazeuse et d'un excipient approprié tel que l'*Air médicinal (1238),* à usage diagnostique.

*Pureté* :

– au minimum 99 pour cent de la radioactivité totale correspond à l'oxygène-15,
– au minimum 97 pour cent de la radioactivité totale correspond à l'oxygène-15 sous forme de monoxyde de carbone (CO).

PRODUCTION

*PRODUCTION DU RADIONUCLÉIDE*

L'oxygène-15 est un radio-isotope de l'oxygène qui peut être produit par diverses réactions nucléaires telles que l'irradiation d'azote-15 par des protons ou l'irradiation d'azote-14 par des deutons.

*SYNTHÈSE RADIOCHIMIQUE*

Afin de récupérer l'oxygène-15 en oxygène moléculaire à partir du gaz azote cible, de l'oxygène entraîneur est ajouté à des concentrations variant en général de 0,2 pour cent *V/V* à 1,0 pour cent *V/V*. Après irradiation, le gaz cible est généralement mis en réaction avec du charbon activé à une température d'environ 950 °C. Le charbon activé est prétraité

Préparations radiopharmaceutiques

en faisant passer un gaz inerte au débit de production à une température d'environ 950 °C pendant au moins 1 h. Le [$^{15}$O]monoxyde de carbone obtenu est purifié par un passage à travers un absorbant de dioxyde de carbone, tel que de la chaux sodée, avant d'être mélangé à l'excipient.

CARACTÈRES

*Aspect* : gaz incolore.

*Période et nature du rayonnement de l'oxygène-15* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultats* : l'énergie de tous les photons gamma est de 0,511 MeV ; selon la géométrie de mesure, il peut apparaître un pic somme de 1,022 MeV.

B. Pureté radionucléidique (voir Essai).

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique.

*Résultats* : les pics principaux du chromatogramme obtenu, au moyen du détecteur de radioactivité, avec le gaz à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux pics principaux correspondant au monoxyde de carbone dans le chromatogramme obtenu, au moyen du détecteur à conductivité thermique, avec le gaz témoin (a).

ESSAI

*Les essais suivants sont effectués sur le [$^{15}$O]monoxyde de carbone comme indiqué sous Synthèse radiochimique, avant le mélange avec l'excipient.*

**Monoxyde de carbone**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications de l'essai de pureté radiochimique.

La concentration en monoxyde de carbone dans l'échantillon à examiner est déterminée avant administration ; elle est utilisée pour le calcul de la quantité de monoxyde de carbone administrée au patient.

*Injection* : échantillon à examiner, gaz témoin (b).

Examinez le chromatogramme obtenu au moyen du détecteur à conductivité thermique et calculez la teneur en monoxyde de carbone.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Oxygène-15** : au minimum 99 pour cent de la radioactivité totale.

A. Spectrométrie gamma.

*Comparaison* : solution étalon de fluor-18 ou en utilisant un appareil étalonné avec une telle solution. Des solutions étalons de fluor-18 et/ou des services d'étalonnage sont disponibles auprès de l'Autorité compétente.

*Résultats* : le spectre obtenu avec la solution à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une solution étalon de fluor-18.

B. Période : 1,9 min à 2,2 min.

La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{15}$O]monoxide de carbone**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Echantillon à examiner*. [$^{15}$O]Monoxyde de carbone comme indiqué sous Synthèse radiochimique.

*Gaz témoin (a). Mélange gazeux à base d'azote R.*

*Gaz témoin (b). Azote R* contenant 2,0 pour cent *V/V* de *monoxyde de carbone R1.*

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 1,8 m, Ø1 = 6,3 mm et Ø2 = 3,2 mm,
– *phase stationnaire* : *colonne concentrique pour CPG R,*

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R.*

*Débit* : 65 mL/min.

*Température* :

– *colonne* : 40 °C,
– *chambre à injection* : 40 °C,
– *détecteur à conductivité thermique* : 70 °C.

*Détection* : détecteur à conductivité thermique et détecteur de radioactivité montés en série.

*Injection* : injecteur à boucle.

*Enregistrement* : 10 min.

*Temps de rétention* : oxygène, azote et monoxyde de carbone éluant de la colonne intérieure = environ 0,4 min ; dioxyde de carbone éluant de la colonne intérieure = environ 0,8 min ; oxygène éluant de la colonne extérieure = environ 2,1 min ; azote éluant de la colonne extérieure = environ 3,1 min ; monoxyde de carbone éluant de la colonne extérieure = environ 6,2 min.

*Conformité du système* : gaz témoin (a) :

– 5 pics principaux nettement séparés sont observés dans le chromatogramme obtenu au moyen du détecteur à conductivité thermique,
– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au dioxyde de carbone éluant de la colonne intérieure et à l'oxygène éluant de la colonne extérieure, dans le chromatogramme obtenu au moyen du détecteur à conductivité thermique.

*Limites* : examinez le chromatogramme obtenu au moyen du détecteur de radioactivité et calculez la teneur pour cent en substances contenant de l'oxygène-15 à partir de la surface des pics.

– *[$^{15}$O]monoxyde de carbone* : au minimum 97 pour cent de la radioactivité totale.
– *exclusion* : ne tenez pas compte du premier pic, correspondant aux composants qui sont co-élués de la colonne intérieure.

RADIOACTIVITÉ

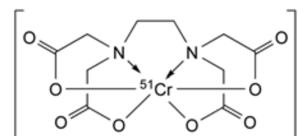
La concentration radioactive est déterminée avant administration.

Mesurez la radioactivité à l'aide d'un compteur approprié et comparez-la à celle d'une préparation étalon de fluor-18 ou à l'aide d'un appareil étalonné au moyen d'une telle préparation.

**07/2008:0266**
**corrigé 7.0**

# CHROME ($^{51}$Cr) (ÉDÉTATE DE), SOLUTION INJECTABLE D'

## Chromii ($^{51}$Cr) edetatis solutio iniectabilis




DÉFINITION

Solution stérile contenant du chrome-51 sous forme d'un complexe de chrome(III) et d'acide (éthylènedinitrilo)tétraacétique, ce dernier étant en excès. La solution injectable peut être rendue isotonique par addition de chlorure de sodium et peut contenir un conservateur antimicrobien approprié tel que l'alcool benzylique.

*Chrome-51* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au chrome-51, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Chrome* : au maximum 1 mg/mL.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, violette.

Préparations radiopharmaceutiques

*Période et nature du rayonnement du chrome-51* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Pureté radionucléidique (voir Essai).

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultat* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son facteur de retardement au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 3,5 à 6,5.

**Chrome** : au maximum 1 mg/mL.

Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible (*2.2.25*).

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Solution témoin.* Dissolvez 0,96 g de *sulfate chromique et de potassium R* et 2,87 g d'*édétate de sodium R* dans 50 mL d'*eau R*. Faites bouillir pendant 10 min, refroidissez, ajustez à pH 3,5-6,5 à l'aide de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R*, puis complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*.

Mesurez l'absorbance de la solution à examiner et de la solution témoin au maximum d'absorption à 560 nm.

*Résultat* : l'absorbance de la solution à examiner n'est pas supérieure à celle de la solution témoin.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Chrome-51** : au minimum 99,9 pour cent de la radioactivité totale.

A. Spectrométrie gamma.

*Résultats* : l'énergie de tous les photons gamma est de 0,320 MeV.

B. Spectrométrie gamma.

Déterminez la quantité relative des impuretés radionucléidiques.

*Résultats* : la radioactivité totale due aux impuretés radionucléidiques est au maximum de 0,1 pour cent.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**Edétate de [$^{51}$Cr]chrome**. Chromatographie descendante sur papier (*2.2.26*).

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Solution témoin.* La solution témoin de l'essai du chrome.

*Solution d'entraîneur de chromate.* Dissolvez 0,1 g de *chromate de potassium R* dans 1 mL d'*ammoniaque concentrée R1* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*.

*Papier* : *papier pour chromatographie R.*

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R1, éthanol à 96 pour cent R, eau R* (1:2:5 *V/V/V*).

*Dépôt.* Déposez une bande d'une solution d'*acétate de plomb R* à 50 g/L sur le papier, à environ 4 cm de la ligne d'origine. Séchez à l'air chaud. Déposez 10 μL de solution d'entraîneur de chromate à l'origine puis 10 μL de solution à examiner au même endroit. Sur un autre papier, répétez la procédure précédente en substituant 10 μL de solution témoin à la solution à examiner.

*Développement* : immédiatement, sur un parcours de 14 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : détecteur de radioactivité approprié permettant de déterminer la répartition de la radioactivité.

*Facteurs de retardement* : impureté A = 0 ; impureté B = 0,2 à 0,4 ; édétate de [$^{51}$Cr]chrome = 0,8 à 0,9.

*Conformité du système.* La bande d'acétate de plomb vire au jaune du fait de la réaction avec la solution d'entraîneur de chromate. Le facteur de retardement de la tache radioactive due à l'édétate de [$^{51}$Cr]chrome dans le radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable à celui de la tache violette dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

*Limite* :

– *édétate de [$^{51}$Cr]chrome* : au minimum 97,0 pour cent de la radioactivité totale due au chrome-51.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

IMPURETÉS

A. ion [$^{51}$Cr]chrome(III),

B. ion [$^{51}$Cr]chromate.

**01/2008:0710**
**corrigé 7.0**

# CYANOCOBALAMINE ($^{57}$Co) (CAPSULES DE)

## Cyanocobalamini ($^{57}$Co) capsulae

DÉFINITION

Capsules contenant du cyanure de α-(5,6-diméthylbenzimidazol-1-yl)cobamide[$^{57}$Co] et pouvant contenir des excipients appropriés.

Les capsules satisfont aux exigences des capsules à enveloppe dure ou gélules prescrites dans la monographie *Capsules (0016),* sauf exception justifiée et autorisée.

*Cobalt-57* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité déclarée due au cobalt-57 à la date indiquée sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : capsules de gélatine dure.

*Période et nature du rayonnement du cobalt-57* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultat* : l'énergie du photon gamma principal du cobalt-57 est de 0,122 MeV.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultat* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Désagrégation**. Les capsules satisfont à l'essai de désagrégation des comprimés et des capsules (*2.9.1*). Utilisez 1 capsule au lieu de 6.

**Uniformité de teneur**. Mesurez à l'aide d'un compteur approprié et dans des conditions géométriques identiques, la radioactivité de chacune d'au moins 10 capsules. Calculez la valeur moyenne de la radioactivité de chaque capsule. Aucune capsule ne présente une activité s'écartant de plus de 10 pour cent de la valeur moyenne. L'écart type relatif est inférieur à 3,5 pour cent.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Cobalt-57** : minimum 99,9 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma.

Déterminez les quantités relatives de cobalt-57, cobalt-56 et cobalt-58 présentes.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{57}$Co]Cyanocobalamine**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Dissolvez le contenu d'une capsule dans 1,0 mL d'*eau R* et laissez reposer pendant 10 min. Centrifugez à 2000 tr/min pendant 10 min. Utilisez le surnageant.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg de *cyanocobalamine SCR* dans la phase mobile et complétez à 100 mL avec la phase mobile. Prélevez 2 mL de cette solution et complétez à 100 mL avec la phase mobile. *Utilisez cette préparation dans l'heure qui suit sa préparation.*

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : 26,5 volumes de *méthanol R* et 73,5 volumes d'une solution de *phosphate disodique R* à 10 g/L ajustée à pH 3,5 à l'aide d'*acide phosphorique R. Utilisez ce mélange dans les 2 jours qui suivent sa préparation.*

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : détecteur de radioactivité réglé pour le cobalt-57 et spectrophotomètre à 361 nm.

*Injection* : 100 µL.

*Enregistrement* : 3 fois le temps de rétention de la cyanocobalamine pour la solution à examiner ; 30 min pour la solution témoin.

*Limite* :

– *[$^{57}$Co]cyanocobalamine* : au minimum 90 pour cent de la radioactivité totale due au cobalt-57.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

CONSERVATION

En récipient étanche, à l'abri de la lumière, à une température de 2 °C à 8 °C.

IMPURETÉS

A. cobalt-56,

B. cobalt-58.

**01/2008:0269**
**corrigé 7.0**

# CYANOCOBALAMINE ($^{57}$Co) (SOLUTION DE)

## Cyanocobalamini ($^{57}$Co) solutio

DÉFINITION

Solution de cyanure de α-(5,6-diméthylbenzimidazol-1-yl)-cobamide[$^{57}$Co]. La solution peut contenir un stabilisant et un conservateur antimicrobien.

*Cobalt-57* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au cobalt-57, à la date figurant sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore ou légèrement rose.

*Période et nature du rayonnement du cobalt-57* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultat* : l'énergie du photon gamma principal du cobalt-57 est de 0,122 MeV.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultat* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 4,0 à 6,0.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Cobalt-57** : au minimum 99,9 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma.

Déterminez les quantités relatives de cobalt-57, cobalt-56 et cobalt-58 présentes.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{57}$Co]Cyanocobalamine**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg de *cyanocobalamine SCR* dans la phase mobile et complétez à 100 mL avec la phase mobile. Prélevez 2 mL de cette solution et complétez à 100 mL avec la phase mobile. *Utilisez cette préparation dans l'heure qui suit sa préparation.*

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : 26,5 volumes de *méthanol R* et 73,5 volumes d'une solution de *phosphate disodique R* à 10 g/L ajustée à pH 3,5 à l'aide d'*acide phosphorique R* (utilisez ce mélange dans les 2 jours qui suivent sa préparation).

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : détecteur de radioactivité réglé pour le cobalt-57 et spectrophotomètre à 361 nm.

*Injection* : 100 µL.

*Enregistrement* : 3 fois le temps de rétention de la cyanocobalamine pour la solution à examiner ; 30 min pour la solution témoin.

*Limite* :

– *[$^{57}$Co]cyanocobalamine* : au minimum 90 pour cent de la radioactivité due au cobalt-57.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière, à une température de 2 °C à 8 °C.

IMPURETÉS

A. cobalt-56,

B. cobalt-58.

**01/2008:1505**
**corrigé 7.0**

# CYANOCOBALAMINE ($^{58}$Co) (CAPSULES DE)

## Cyanocobalamini ($^{58}$Co) capsulae

DÉFINITION

Capsules contenant du cyanure de α-(5,6-diméthylbenzimidazol-1-yl)cobamide[$^{58}$Co] et pouvant contenir des excipients appropriés.

Les capsules satisfont aux spécifications des capsules à enveloppe dure ou gélules prescrites dans la monographie *Capsules (0016)*, sauf exception justifiée et autorisée.

*Cobalt-58* : moyenne entre 90 pour cent et 110 pour cent de la radioactivité due au cobalt-58, à la date figurant sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : capsules de gélatine dure.

*Période et nature du rayonnement du cobalt-58* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultats* : les énergies des photons gamma principaux du cobalt-58 sont de 0,511 MeV (rayonnement d'annihilation) et de 0,811 MeV.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultat* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Désagrégation**. Les capsules satisfont à l'essai de désagrégation des comprimés et des capsules (*2.9.1*). Utilisez 1 capsule au lieu de 6.

**Uniformité de teneur**. Utilisez au moins 10 capsules. Mesurez à l'aide d'un compteur approprié et dans des conditions géométriques identiques, la radioactivité de chacune d'elles. Calculez la valeur moyenne de la radioactivité par capsule. La radioactivité d'aucune capsule ne s'écarte de plus de 10 pour cent de la valeur moyenne. L'écart type relatif est inférieur à 3,5 pour cent.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Cobalt-58** : minimum 98 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma.

Déterminez les quantités relatives de cobalt-58, de cobalt-57 et de cobalt-60 présentes.

*Résultat* :

– *cobalt-60* : au maximum 1 pour cent de la radioactivité totale.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{58}$Co]Cyanocobalamine**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Dissolvez le contenu d'une capsule dans 1,0 mL d'*eau R* et laissez reposer pendant 10 min. Centrifugez à 2000 tr/min pendant 10 min. Utilisez le surnageant.

*Solution témoin.* Dissolvez 10 mg de *cyanocobalamine SCR* dans la phase mobile et complétez à 100 mL avec la phase mobile. Prélevez 2 mL de cette solution et complétez à 100 mL avec la phase mobile. *Utilisez cette préparation dans l'heure qui suit sa préparation.*

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : 26,5 volumes de *méthanol R* et 73,5 volumes d'une solution de *phosphate disodique R* à 10 g/L, ajustée à pH 3,5 avec de l'*acide phosphorique R* (utilisez ce mélange dans les 2 jours).

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : détecteur de radioactivité réglé pour le cobalt-58 et spectrophotomètre à 361 nm.

*Injection* : 100 µL.

*Enregistrement* : 3 fois le temps de rétention de la cyanocobalamine pour la solution à examiner ; 30 min pour la solution témoin.

*Limite* :

– *[$^{58}$Co]cyanocobalamine* : au minimum 84 pour cent de la radioactivité totale due au cobalt-58.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

CONSERVATION

En récipient étanche, à l'abri de la lumière, à une température de 2 °C à 8 °C.

IMPURETÉS

A. cobalt-57,

B. cobalt-60.

**01/2008:0270**
**corrigé 7.0**

# CYANOCOBALAMINE ($^{58}$Co) (SOLUTION DE)

## Cyanocobalamini ($^{58}$Co) solutio

DÉFINITION

Solution de cyanure de α-(5,6-diméthylbenzimidazol-1-yl)-cobamide[$^{58}$Co]. La solution peut contenir un stabilisant et un conservateur antimicrobien.

*Cobalt-58* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au cobalt-58, à la date figurant sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore ou légèrement rose.

*Période et nature du rayonnement du cobalt-58* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultats* : les énergies des photons gamma principaux du cobalt-58 sont de 0,511 MeV (rayonnement d'annihilation) et de 0,811 MeV.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultat* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 4,0 à 6,0.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Cobalt-58** : au minimum 98 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma.

Déterminez les quantités relatives de cobalt-58, de cobalt-57 et de cobalt-60 présentes.

*Résultat* :

– *cobalt-60* : au maximum 1 pour cent de la radioactivité totale.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{58}$Co]Cyanocobalamine**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Solution témoin.* Dissolvez 10 mg de *cyanocobalamine SCR* dans la phase mobile et complétez à 100 mL avec la phase mobile. Prélevez 2 mL de cette solution et complétez à 100 mL avec la phase mobile. *Utilisez cette préparation dans l'heure qui suit sa préparation.*

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : 26,5 volumes de *méthanol R* et 73,5 volumes d'une solution de *phosphate disodique R* à 10 g/L ajustée à pH 3,5 à l'aide d'*acide phosphorique R* (utilisez ce mélange dans les 2 jours).

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : détecteur de radioactivité réglé pour le cobalt-58 et spectrophotomètre à 361 nm.

*Injection* : 100 µL.

*Enregistrement* : 3 fois le temps de rétention de la cyanocobalamine pour la solution à examiner ; 30 min pour la solution témoin.

*Limite* :

– *[$^{58}$Co]cyanocobalamine* : au minimum 90 pour cent de la radioactivité due au cobalt-58.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière, à une température de 2 °C à 8 °C.

IMPURETÉS

A. cobalt-57,

B. cobalt-60.

**01/2008:1582**
**corrigé 7.0**

# EAU ($^{15}$O) INJECTABLE

## Aquae ($^{15}$O) solutio iniectabilis

DÉFINITION

Solution stérile d'[$^{15}$O]eau, à usage diagnostique.

*Oxygène-15* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due à l'oxygène-15, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement de l'oxygène-15* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides*.

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

   *Résultats* : l'énergie des seuls photons gamma de l'[$^{15}$O]eau est de 0,511 MeV ; selon la géométrie de mesure, il peut apparaître un pic somme de 1,022 MeV.

B. Pureté radionucléidique (voir Essai).

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai). Le temps de rétention du 2$^{nd}$ pic du chromatogramme est dû à la radioactivité éluant avec le volume mort.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 5,5 à 8,5.

**Ammonium** (*2.4.1*) : au maximum 10 ppm, déterminé sur 1 mL de préparation à examiner. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Nitrates** : au maximum 10 ppm. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*Solution à examiner.* A 1 mL de préparation à examiner, ajoutez 49 mL d'*eau exempte de nitrate R*. Déposez 5 mL de cette solution dans un tube à essai immergé dans de l'eau glacée, ajoutez 0,4 mL d'une solution de *chlorure de potassium R* à 100 g/L, 0,1 mL de *solution de diphénylamine R* et, goutte à goutte en maintenant sous agitation, 5 mL d'*acide sulfurique R*. Transférez le tube dans un bain-marie à 50 °C.

*Solution témoin.* Préparez simultanément et dans les mêmes conditions que la solution à examiner avec un mélange de 4,5 mL d'*eau exempte de nitrate R* et de 0,5 mL de *solution à 2 ppm de nitrate ($NO_3$) R*.

Après 15 min, si la solution vire au bleu, la coloration de la solution à examiner n'est pas plus intense que celle de la solution témoin.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 175/*V* UI/mL, *V* étant la dose maximale recommandée en millilitres. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Oxygène-15** : au minimum 99 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma.

*Résultats* :

– le spectre de la préparation à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une préparation étalon de fluor-18,
– la période est de 1,9 min à 2,2 min.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**[$^{15}$O]Eau**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice aminopropylsilylé pour chromatographie R* (10 µm),
– *température* : constante, à 20-30 °C.

*Phase mobile* : solution de *phosphate monopotassique R* à 10 g/L, ajustée à pH 3 avec de l'*acide phosphorique R*.

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la radioactivité et système de détection interne du taux de recouvrement, qui se compose d'une dérivation en boucle du tube chromatographique placée entre l'injecteur et la colonne, et passant par le détecteur de radioactivité. Ce système a été étalonné pour calculer le taux de recouvrement.

*Enregistrement* : 10 min.

*Identification des pics* : dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, le 1$^{er}$ pic correspond à la radioactivité injectée de la solution à examiner et le 2$^{nd}$ pic à la quantité de radioactivité présente sous forme d'[$^{15}$O]eau.

*Limite* :

– *[$^{15}$O]eau* : au minimum 99 pour cent de la radioactivité totale due à l'oxygène-15.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

**01/2008:0112**
**corrigé 7.0**

# EAU TRITIÉE ($^3$H) (SOLUTION INJECTABLE D')

## Aquae tritiatae ($^3$H) solutio iniectabilis

DÉFINITION

Eau pour préparations injectables dans laquelle une partie des molécules d'eau renferme des atomes de tritium à la place des atomes de protium. La solution peut être rendue isotonique par addition de chlorure de sodium.

*Tritium* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au tritium, à la date figurant sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du tritium* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides*.

IDENTIFICATION

Spectrométrie bêta selon l'essai A de pureté radionucléidique (voir Essai).

*Résultat* : l'énergie maximale du rayonnement bêta est de 0,019 MeV.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 4,5 à 7,0.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

A. *Solution à examiner*. Mélangez 100 µL d'une dilution appropriée de préparation à examiner avec 10 mL de *liquide scintillant R1*.

*Solution témoin*. Préparation étalon d'eau tritiée ($^3$H) ayant approximativement la même radioactivité que la solution à examiner.

Mesurez la radioactivité de la solution à examiner à l'aide d'un compteur à scintillation liquide équipé d'un discriminateur. Le taux de comptage est de 5000 impulsions environ par seconde au niveau le plus bas du discriminateur. Notez le taux de comptage à différents niveaux du discriminateur. Pour chaque mesure, comptez au minimum 10 000 impulsions par période d'au minimum 1 min. Déterminez immédiatement après, et dans les mêmes conditions, le taux de comptage pour la solution témoin. Reportez sur papier semi-logarithmique les taux de comptage à chaque niveau du discriminateur après déduction du bruit de fond. Convertissez les niveaux du discriminateur en unités arbitraires et portez-les sur l'axe des abscisses. La distance verticale entre les 2 courbes obtenues est constante. Les courbes suivent l'expression mathématique suivante :

$$\frac{\frac{A_1}{B_1} - \frac{A_2}{B_2}}{\frac{A_1}{B_1}} \times 100 < 20$$

$A_1$ = radioactivité enregistrée avec la solution témoin au niveau le plus bas du discriminateur,

$B_1$ = radioactivité enregistrée avec la solution à examiner au niveau le plus bas du discriminateur,

$A_2$ = radioactivité enregistrée avec la solution témoin à un niveau du discriminateur tel que $A_2 \approx A_1 \times 10^{-3}$,

$B_2$ = radioactivité enregistrée avec la solution à examiner à ce même niveau du discriminateur.

B. Spectrométrie gamma. L'appareil n'enregistre que le bruit de fond.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

Dans le ballon d'un appareil entièrement en verre, du type utilisé dans la détermination de l'intervalle de distillation (*2.2.11*), introduisez une quantité de la préparation à examiner correspondant à environ 74 kBq, diluée à 50 mL avec de l'*eau R*. Déterminez la concentration radioactive. Faites distiller jusqu'à obtention d'environ 25 mL de distillat, en prenant les précautions qui s'imposent pour éviter la contamination de l'air. Si l'essai est effectué sous hotte, protégez l'appareil des courants d'air. Déterminez la concentration radioactive du distillat et celle du liquide restant dans le ballon. Aucune des 2 valeurs obtenues ne diffère de plus de 5 pour cent de la valeur déterminée avant la distillation.

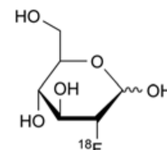
RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un compteur à scintillation liquide.

**07/2008:1325**
**corrigé 7.0**

# FLUDÉSOXYGLUCOSE ($^{18}$F) (SOLUTION INJECTABLE DE)

## Fludeoxyglucosi ($^{18}$F) solutio iniectabilis




DÉFINITION

Solution stérile contenant du 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-glucopyranose (2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-glucose) préparé par substitution nucléophile. Elle peut également contenir du 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-mannose.

*Fluor-18* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au fluor-18, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*2-Fluoro-2-désoxy-D-glucose* : au maximum 0,5 mg par dose maximale recommandée, en millilitres.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore ou légèrement jaune.

*Période et nature du rayonnement du fluor-18* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides*.

IDENTIFICATION

A. Essai A de pureté radionucléidique (voir Essai).

B. Déterminez la période approximative en effectuant au moins 3 mesures de l'activité d'un échantillon dans les mêmes conditions géométriques et sur une durée appropriée (par exemple, 30 min).

*Résultat* : 105 à 115 min.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai A de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultat* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

ESSAI

*Certains des essais de pureté chimique peuvent être omis si les substances mentionnées ne sont pas utilisées ou ne peuvent pas être générées lors de la production.*

**pH** (*2.2.3*) : 4,5 à 8,5.

Préparations radiopharmaceutiques

**2-Fluoro-2-désoxy-D-glucose et impureté A**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 1,0 mg de *2-fluoro-2-désoxy-D-glucose R* dans de l'*eau R* et complétez à 2,0 mL avec le même solvant. Prélevez 1,0 mL de solution et complétez à *V* avec de l'*eau R, V* étant la dose maximale recommandée en millilitres.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 1,0 mg de *2-chloro-2-désoxy-D-glucose R* (impureté A) dans de l'*eau R* et complétez à 2,0 mL avec le même solvant. Prélevez 1,0 mL de solution et complétez à *V* avec de l'*eau R, V* étant la dose maximale recommandée en millilitres.

*Solution témoin (c)*. Dissolvez 1,0 mg de *2-fluoro-2-désoxy-D-mannose R* dans de l'*eau R* et complétez à 2,0 mL avec le même solvant. Mélangez 0,5 mL de cette solution et 0,5 mL de solution témoin (a).

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *résine échangeuse d'anions fortement basique pour chromatographie R* (10 µm),
– *température* : constante, entre 20-25 °C.

*Phase mobile* : solution à 4 g/L d'*hydroxyde de sodium R* dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R*.

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : détecteur d'hydrates de carbone approprié pour l'intervalle de concentration requis, par exemple détecteur ampérométrique à pulsations et détecteur de radioactivité montés en série.

*Injection* : 20 µL.

*Enregistrement* : 2 fois le temps de rétention du 2-fluoro-2-désoxy-D-glucose.

*Rétention relative* par rapport au 2-fluoro-2-désoxy-D-glucose (temps de rétention = environ 12 min) : 2-fluoro-2-désoxy-D-mannose = environ 0,9 ; impureté A = environ 1,1.

*Conformité du système* : solution témoin (c), en utilisant le détecteur d'hydrates de carbone :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au 2-fluoro-2-désoxy-D-mannose et au 2-fluoro-2-désoxy-D-glucose,
– rapport signal/bruit : au minimum 10 pour le pic dû au 2-fluoro-2-désoxy-D-glucose.

*Limites* : dans le chromatogramme obtenu avec le détecteur d'hydrates de carbone :

– *2-fluoro-2-désoxy-D-glucose* : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,5 mg/*V*),
– *impureté A* : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,5 mg/*V*).

**Impureté B**. Essai des taches.

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution témoin (a)* : *eau R*.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 11,0 mg d'*aminopolyéther R* (impureté B) dans de l'*eau R* et complétez à 5,0 mL avec le même solvant. Prélevez 1 mL de solution et complétez à *V* avec de l'*eau R, V* étant la dose maximale recommandée en millilitres.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM pour l'essai de l'aminopolyéther R*.

*Dépôt* : 2,5 µL ; déposez en plus 2,5 µL de solution à examiner puis 2,5 µL de solution témoin (b) au même endroit.

*Détection* : comparez visuellement les taches 1 min après le dépôt.

*Conformité du système* :

– la tache due aux dépôts successifs de la solution à examiner et de la solution témoin (b) est semblable quant à son aspect à la tache due à la solution témoin (b), caractérisée par un certain nombre de disques concentriques ; le disque sombre intérieur (d'intensité proportionnelle à la concentration de l'impureté B) peut être entouré d'un anneau noir-bleu ; en périphérie se trouve un anneau plus clair dont le bord extérieur est sombre ;
– la tache due à la solution témoin (a) présente un disque intérieur plus diffus, rose-brun et sans marge distincte le séparant de la zone extérieure plus claire ;
– la tache due à la solution témoin (b) est nettement différente de celle due à la solution témoin (a).

*Limite* :

– la portion centrale de la tache due à la solution à examiner est moins intense que celle de la tache due à la solution témoin (b) (2,2 mg/*V*).

**Impureté C**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution témoin (a)*. Prélevez 2,1 mL d'une solution d'*hydroxyde de tétrabutylammonium R* (impureté C) à 25,95 g/L et complétez à 20,0 mL avec de l'*eau R*. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à *V* avec de l'*eau R, V* étant la dose maximale recommandée en millilitres.

*Solution témoin (b)*. Prélevez 1 mL d'une solution d'*hydroxyde de tétrabutylammonium R* à 25,95 g/L et complétez à 10 mL avec de l'*eau R*. Prélevez 1 mL de cette solution et complétez à 25 mL avec de l'*eau R*.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,10 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (3 µm),
– *température* : constante, entre 20-25 °C.

*Phase mobile* : 25 volumes d'une solution d'*acide toluènesulfonique R* à 0,95 g/L et 75 volumes d'*acétonitrile R*.

*Débit* : 0,6 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 254 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Enregistrement* : 2 fois le temps de rétention des ions tétrabutylammonium.

*Temps de rétention* : hydroxyde de tétrabutylammonium = environ 3,3 min.

*Conformité du système* : solution témoin (b) :

– *rapport signal/bruit* : au minimum 10 pour le pic principal,
– *facteur de symétrie* : au maximum 1,8 pour le pic principal.

*Limite* :

– *impureté C* : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (2,75 mg/*V*).

**Impureté D** : au maximum 0,02 mg/*V*.

Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible (*2.2.25*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution témoin*. Dissolvez 20,0 mg de *4-(4-méthylpipéridin-1-yl)pyridine R* (impureté D) dans de l'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Prélevez 0,1 mL de solution et complétez à *V* avec de l'*eau R, V* étant la dose maximale recommandée en millilitres.

Mesurez l'absorbance de la solution à examiner et de la solution témoin au maximum d'absorption à 263 nm.

*Résultat* : l'absorbance de la solution à examiner n'est pas supérieure à celle de la solution témoin.

**Solvants résiduels** : limites conformes aux principes définis dans le chapitre général *5.4*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 175/*V* UI/mL, *V* étant la dose maximale recommandée, en millilitres. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai B.

A. Spectrométrie gamma.

*Résultats* : l'énergie de tous les photons gamma est de 0,511 MeV et, selon la géométrie de mesure, il peut apparaître un pic somme de 1,022 MeV.

B. Spectrométrie gamma.

Déterminez la quantité de fluor-18 et d'impuretés radionucléidiques de période supérieure à 2 h. Pour la détection et la quantification des impuretés, retenez la préparation à examiner pendant au moins 24 h pour assurer la décroissance du fluor-18 jusqu'à un niveau permettant la détection des impuretés.

*Résultats* : la radioactivité totale due aux impuretés radionucléidiques est au maximum de 0,1 pour cent.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

A. Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai 2-fluoro-2-désoxy-D-glucose et impureté A. Si nécessaire, diluez la solution à examiner avec de l'*eau R* pour obtenir une concentration de radioactivité appropriée pour le détecteur de radioactivité.

*Injection* : solution à examiner et solutions témoins (a) et (c).

*Rétention relative* par rapport au 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-glucose (temps de rétention = environ 12 min) : 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-mannose = environ 0,9. Les dérivés partiellement ou complètement acétylés des 2 composés sont hydrolysés sous les conditions chromatographiques et sont donc élués comme le 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-glucose et le 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-mannose.

Localisez les pics dus au 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-glucose et au 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-mannose en utilisant les chromatogrammes obtenus avec le détecteur d'hydrates de carbone et les solutions témoins (a) et (c).

*Limites* :

- *[$^{18}$F]fluor sous forme de 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-glucose et de 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-mannose* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale due au fluor-18,
- *2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-mannose* : au maximum 10 pour cent de la radioactivité totale due au 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-glucose et au 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-mannose.

B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution témoin*. Dissolvez, en chauffant doucement, 30 mg de *1,2,3,4-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranose R* et 20 mg de *glucose R* dans 1 mL d'*eau R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *eau R*, *acétonitrile R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : environ 2 µL.

*Développement* : sur un parcours de 8 cm.

*Séchage* : à l'air pendant 15 min.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité ; immergez ensuite la plaque dans une solution d'*acide sulfurique R* à 75 g/L dans le *méthanol R* et séchez avec un pistolet à air chaud ou à 150 °C jusqu'à apparition de taches sombres dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

*Facteurs de retardement* : [$^{18}$F]fluorure = environ 0 ; 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-glucose et 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-mannose = environ 0,45 ; dérivés partiellement ou complètement acétylés du 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-glucose et du 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-mannose = environ 0,8 à 0,95.

*Conformité du système* : solution témoin :

- le chromatogramme présente 2 taches nettement séparées.

*Limites* :

- *[$^{18}$F]fluor sous forme de 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-glucose et de 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-mannose* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale due au fluor-18,
- *[$^{18}$F]fluor sous forme de fluorure et dérivés partiellement ou complètement acétylés du 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-glucose et du 2-[$^{18}$F]fluoro-2-désoxy-D-mannose* : au maximum 5 pour cent de la radioactivité totale due au fluor-18.

RADIOACTIVITÉ

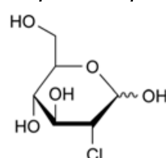
Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique la dose maximale recommandée, en millilitres.

IMPURETÉS

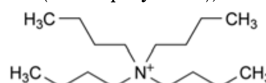
*Impuretés spécifiées : A, B, C, D, E.*



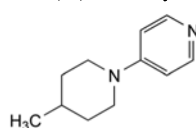

A. 2-chloro-2-désoxy-D-glucopyranose (2-chloro-2-désoxy-D-glucose),




B. 4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosane (aminopolyéther),




C. *N,N,N*-tributylbutan-1-aminium (tétrabutylammonium),



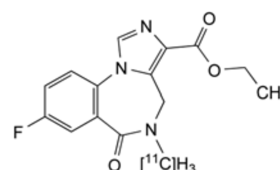

D. 4-(4-méthylpipéridin-1-yl)pyridine,

E. [$^{18}$F]fluorure.

**01/2008:1917**

# FLUMAZÉNIL (*N*-[$^{11}$C]MÉTHYL), SOLUTION INJECTABLE DE

## Flumazenili (*N*-[$^{11}$C]methyl) solutio iniectabilis




DÉFINITION

Solution stérile de 8-fluoro-5-[$^{11}$C]méthyl-6-oxo-5,6-dihydro-4*H*-imidazo[1,5-*a*][1,4]benzodiazépine-3-carboxylate d'éthyle pouvant contenir un stabilisant tel que l'acide ascorbique.

Préparations radiopharmaceutiques

*Teneur* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au carbone-11, indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Teneur en flumazénil* : au maximum 50 µg par dose maximale recommandée en millilitres.

PRODUCTION

*PRODUCTION DU RADIONUCLÉIDE*

Le carbone-11 est un isotope radioactif du carbone généralement obtenu par irradiation protonique de l'azote. Selon l'ajout d'oxygène à l'état de traces ou de petites quantités d'hydrogène, la radioactivité est obtenue sous forme de dioxyde de [$^{11}$C]carbone ou sous forme de [$^{11}$C]méthane, respectivement.

*SYNTHÈSE RADIOCHIMIQUE*

Le [5-méthyl-$^{11}$C]flumazénil peut être préparé par *N*-alkylation du 8-fluoro-6-oxo-5,6-dihydro-4*H*-imidazo[1,5-*a*][1,4]benzodiazépine-3-carboxylate d'éthyle (déméthylflumazénil) avec de l'iodo[$^{11}$C]méthane ou du trifluorométhanesulfonate de [$^{11}$C]méthyle.

**Synthèse de l'iodo[$^{11}$C]méthane**

L'iodo[$^{11}$C]méthane peut être obtenu à partir du dioxyde de [$^{11}$C]carbone ou du [$^{11}$C]méthane. La méthode la plus fréquemment utilisée est la réduction du dioxyde de [$^{11}$C]carbone par l'hydrure de lithium-aluminium. On fait alors réagir le [$^{11}$C]méthanolate ainsi formé avec de l'acide iodhydrique. Il est également possible de faire réagir de l'iode avec du [$^{11}$C]méthane, obtenu directement à partir de la cible ou par des procédés en ligne à partir de dioxyde de [$^{11}$C]carbone.

**Synthèse du trifluorométhanesulfonate de [$^{11}$C]méthyle**

Le trifluorométhanesulfonate de [$^{11}$C]méthyle peut être préparé à partir d'iodo[$^{11}$C]méthane en utilisant un support solide tel que du carbone graphité imprégné de trifluorométhanesulfonate d'argent.

**Synthèse du [5-méthyl-$^{11}$C]flumazénil**

La méthode la plus fréquemment utilisée pour obtenir du [5-méthyl-$^{11}$C]flumazénil est la *N*-alkylation du déméthylflumazénil par l'iodo[$^{11}$C]méthane dans des conditions alcalines et dans un solvant tel que le diméthylformamide ou l'acétone. Le [5-méthyl-$^{11}$C]flumazénil obtenu peut être purifié par chromatographie liquide semi-préparative ; par exemple, avec une colonne remplie de gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie éluée avec un mélange de éthanol et d'eau.

*PRÉCURSEUR DE SYNTHÈSE*

**Déméthylflumazénil**

Point de fusion (*2.2.14*) : 286 °C à 289 °C.

Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*).

*Comparaison* : *spectre de référence du déméthylflumazénil de la Ph. Eur.*

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du carbone-11* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides*.

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

   *Résultats* : l'énergie de tous les photons gamma est de 0,511 MeV ; selon la géométrie de mesure, il peut apparaître un pic somme de 1,022 MeV.

B. La préparation à examiner satisfait à l'essai B de pureté radionucléidique (voir Essai).

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique.

   *Résultats* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 6,0 à 8,0.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 175/*V* UI/mL, *V* étant la dose maximale recommandée en millilitres. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Flumazénil et impureté A**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 2,5 mg de *flumazénil R* dans 5 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 2,5 mg de *déméthylflumazénil R* dans 50 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin (c).* A 0,1 mL de solution témoin (a) ajoutez 0,1 mL de solution témoin (b) et complétez à *V* avec une solution de *chlorure de sodium R* à 0,9 g/L, *V* étant la dose maximale recommandée en millilitres.

*Solution témoin (d).* Prélevez 0,1 mL de solution témoin (a) et complétez à 50 mL avec du *méthanol R*. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à *V* avec une solution de *chlorure de sodium R* à 0,9 g/L, *V* étant la dose maximale recommandée en millilitres.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,15 m, Ø = 3,9 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm) à particules sphériques présentant une surface spécifique de 440 m$^2$/g, un diamètre de pores de 100 nm et un taux de carbone de 19 pour cent,
– *température* : maintenez la colonne à une temperature constante entre 20-30 °C.

*Phase mobile* : *méthanol R, eau R* (45:55 *V/V*).

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 260 nm et détecteur de radioactivité montés en série.

*Injection* : 100 µL.

*Enregistrement* : 10 min.

*Rétention relative* par rapport au flumazénil : impureté A = environ 0,74.

*Conformité du système* : solution témoin (c) :

– *résolution* : au minimum 2,5 entre les pics dus au flumazénil et à l'impureté A.

*Limites* : examinez le chromatogramme obtenu avec le spectrophotomètre :

– *flumazénil* : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) (50 µg/*V*),
– *impureté A* : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) (5 µg/*V*),
– *toute autre impureté* : au maximum la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (d) (1 µg/*V*).

**Solvants résiduels** : limites conformes aux principes définis dans le chapitre général (*5.4*) en utilisant la méthode générale (*2.4.24*). La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Carbone-11** : au minimum 99 pour cent de la radioactivité totale.

La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin des essais.

A. Spectrométrie gamma.

*Résultats* : le spectre obtenu avec la solution à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une solution étalon de fluor-18.

B. Période : 19,9 min à 20,9 min.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai Flumazénil et impureté A, avec les modifications suivantes.

*Injection* : solution à examiner et solution témoin (a) ; diluez si nécessaire la solution à examiner pour obtenir une concentration en radioactivité appropriée pour le détecteur.

*Limite* : examinez le chromatogramme obtenu avec le détecteur de radioactivité :

– *[5-méthyl-$^{11}$C]flumazénil* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale.

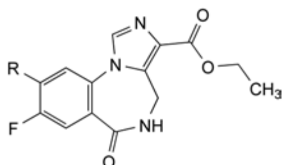
RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique la dose maximale recommandée en millilitres.

IMPURETÉS



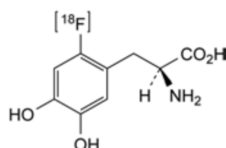

A. R = H : 8-fluoro-6-oxo-5,6-dihydro-4*H*-imidazo[1,5-*a*][1,4]benzodiazépine-3-carboxylate d'éthyle (déméthylflumazénil),

B. R = $CH_2$-CO-$CH_3$ : 8-fluoro-6-oxo-9-(2-oxopropyl)-5,6-dihydro-4*H*-imidazo[1,5-*a*][1,4]benzodiazépine-3-carboxylate d'éthyle (produit d'addition entre l'acétone et le déméthylflumazénil).

**01/2008:1918**

# FLUORODOPA ($^{18}$F) PRÉPARÉE PAR SUBSTITUTION ÉLECTROPHILE (SOLUTION INJECTABLE DE)

## Fluorodopae ($^{18}$F) ab electrophila substitutione solutio iniectabilis




DÉFINITION

Solution stérile d'acide (2*S*)-2-amino-3-(2-([$^{18}$F]fluoro)-4,5-dihydroxyphényl)propanoïque (6-[$^{18}$F]fluorolévodopa). Elle peut contenir des stabilisants comme l'acide ascorbique ou l'acide édétique.

La présente monographie s'applique à une solution injectable contenant de la 6-[$^{18}$F]fluorolévodopa produite par substitution électrophile.

*Teneur* :

– *fluor-18* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au fluor-18 indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette,

– *dopa* : au maximum 1 mg par dose maximale recommandée en millilitres,

– *6-fluorolévodopa* : au maximum 15 mg par dose maximale recommandée en millilitres.

PRODUCTION

*PRODUCTION DU RADIONUCLÉIDE*

Le fluor-18 est un isotope radioactif du fluor qui peut être produit par diverses réactions nucléaires, induites par l'irradiation d'oxygène-18 par des protons, par l'irradiation de néon-20 par des deutons ou par l'irradiation d'oxygène-16 par des noyaux d'hélium-3 ou d'hélium-4.

En vue d'obtenir du fluor-18 sous une forme chimique adaptée aux réactions de substitution électrophile, comme le fluor gazeux ou l'hypofluorure d'acétyle gazeux, une petite quantité de fluor gazeux non radioactif (0,3-0,8 pour cent du volume cible de gaz) doit être ajoutée comme vecteur à une étape du procédé de production.

*SYNTHÈSE RADIOCHIMIQUE*

La 6-[$^{18}$F]fluorolévodopa peut être préparée par diverses voies de synthèse radiochimique qui donnent des produits différents en termes de rendement, de radioactivité spécifique, de sous-produits et d'impuretés éventuelles. Les voies de synthèse de type électrophile, utilisées pour la production de 6-[$^{18}$F]fluorolévodopa, sont basées sur la fluorodémétallation d'un dérivé stannylé de la lévodopa, avec du [$^{18}$F]fluor moléculaire ou du [$^{18}$F]hypofluorure d'acétyle, suivie de l'hydrolyse des groupes protecteurs et de la purification finale par chromatographie liquide semi-préparative. Les voies de synthèse reposant sur la démercuration ou la déthallation ne doivent pas être utilisées.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du fluor-18* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides*.

IDENTIFICATION

A. Essai A de pureté radionucléidique (voir Essai).

B. Déterminez la période approximative en effectuant au moins 3 mesures de l'activité d'un échantillon dans les mêmes conditions géométriques et sur une durée appropriée (par exemple 30 min).

*Résultats* : 105 min à 115 min.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultats* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic dû à la 6-fluorolévodopa dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

D. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai des impuretés C et D (voir Essai).

*Résultats* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son facteur de retardement au pic dû à la 6-fluorolévodopa dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b).

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 4,0 à 5,5.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 175/$V$ UI/mL, $V$ étant la dose maximale recommandée en millilitres. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**6-Fluorolévodopa, dopa, impureté A et impureté B**. Chromatographie liquide (*2.2.29*). *Préparez les solutions témoins extemporanément.*

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 18,0 mg de *chlorhydrate de 6-fluorolévodopa R* dans 5,0 mL de phase mobile et complétez à *V* avec la phase mobile, *V* étant la dose maximale recommandée en millilitres.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 1,0 mg de *lévodopa R* dans 5 mL de phase mobile et complétez à *V* avec la phase mobile, *V* étant la dose maximale recommandée en millilitres.

*Solution témoin (c).* Dissolvez 1,0 mg de *chlorure de triméthylétain R* (impureté A) dans 2,0 mL de phase mobile. Prélevez 1,0 mL de solution et complétez à *V* avec la phase mobile, *V* étant la dose maximale recommandée en millilitres.

*Solution témoin (d).* Mélangez des volumes égaux des solutions témoins (b) et (c).

*Solution témoin (e).* Dissolvez 2,0 mg de *6-hydroxydopa R* (impureté B) dans 20,0 mL de la phase mobile. Prélevez 0,25 mL de solution et complétez à *V* avec la phase mobile, *V* étant la dose maximale recommandée en millilitres.

*Colonne* :

- *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie R* à particules sphériques,
- *température* : maintenez à une température constante entre 20 °C et 30 °C.

*Phase mobile* : solution de *phosphate monosodique R* à 6,9 g/L ajustée à pH 2,4 avec une solution d'*acide phosphorique R* à 4,8 g/L.

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 200 nm et détecteur de radioactivité montés en série.

*Injection* : 20 μL.

*Enregistrement* : 15 min.

*Rétention relative* par rapport à la 6-fluorolévodopa (temps de rétention = environ 6 min) : impureté A et impureté B = environ 0,7 ; dopa = environ 0,8.

*Conformité du système* : solution témoin (d) :

- *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus à la dopa et à l'impureté A.

*Limites* : examinez les chromatogrammes obtenus au moyen du spectrophotomètre :

- *6-fluorolévodopa* : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (15 mg/*V*),
- *dopa* : au maximum la surface du pic dû à la lévodopa dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (1,0 mg/*V*),
- *somme des impuretés A et B* : au maximum la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (e) (correspondant à une limite de 0,5 mg/*V* de l'impureté A ou une limite de 0,025 mg/*V* de l'impureté B ou à des limites inférieures si ces 2 impuretés coexistent).

**Solvants résiduels** : limites conformes aux principes définis dans le chapitre général *5.4.* La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Fluor-18** : au minimum 99,9 pour cent de la radioactivité totale. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai B.

A. Spectrométrie gamma

   *Résultats* : l'énergie de tous les photons gamma est de 0,511 MeV et, selon la géométrie de mesure, il peut apparaître un pic somme de 1,022 MeV.

B. Spectrométrie gamma

   Déterminez la quantité de fluor-18 et d'impuretés radionucléidiques de période supérieure à 2 h. Pour la détection et la quantification des impuretés, retenez la préparation à examiner pendant une durée suffisante pour assurer la décroissance du fluor-18 jusqu'à un niveau permettant la détection des impuretés.

   *Résultats* : le spectre obtenu avec la préparation à examiner ne diffère pas de manière significative d'un spectre du bruit de fond.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai de 6-fluorolévodopa, dopa, impureté A et impureté B.

Examinez le chromatogramme obtenu avec le détecteur de radioactivité et localisez le pic dû à la 6-[$^{18}$F]fluorolévodopa à l'aide du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) et le spectrophotomètre.

*Limite* :

- *6-[$^{18}$F]fluorolévodopa* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale due au fluor-18.

**Impuretés C et D**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 2 mg de *chlorhydrate de* DL*-6-fluorodopa R* dans de l'*eau R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 2 mg de *chlorhydrate de 6-fluorolévodopa R* dans de l'*eau R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice octadécylsilylé pour CCM pour séparation des composés chiraux R.*

*Phase mobile* : *méthanol R, eau R* (50:50 *V/V*).

*Dépôt* : 2 μL.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air pendant 5 min.

*Détection* : pulvérisez une solution de *ninhydrine R* à 2 g/L dans l'*éthanol anhydre R* et chauffez à 60 °C pendant 10 min. Déterminez la distribution de la radioactivité à l'aide d'un détecteur approprié.

*Facteurs de retardement* : impureté D = environ 0 ; 6-[$^{18}$F]fluorolévodopa = environ 0,3 ; impureté C = environ 0,5.

*Conformité du système* : solution témoin (a) :

- le chromatogramme présente 2 taches nettement séparées.

*Limites* :

- *impureté C* : au maximum 2 pour cent de la radioactivité totale due au fluor-18,
- *impureté D* : au maximum 4 pour cent de la radioactivité totale due au fluor-18.

RADIOACTIVITÉ

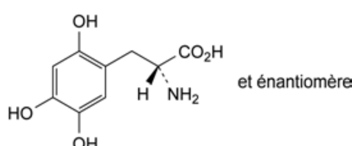
Mesurez la radioactivité en utilisant un appareil étalonné.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique la dose maximale recommandée en millilitres.

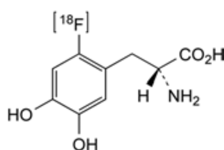
IMPURETÉS

A. Cl-Sn($CH_3$)$_3$ : chlorotriméthylstannane (chlorure de triméthylétain),




B. acide (2*RS*)-2-amino-3-(2,4,5-trihydroxyphényl)propanoïque (6-hydroxydopa),

Préparations radiopharmaceutiques




C. acide (2*R*)-2-amino-3-(2-[$^{18}$F]fluoro-4,5-dihydroxyphényl)propanoïque (6-[$^{18}$F]fluorodextrodopa),

D. [$^{18}$F]fluorure.

**01/2011:2390**

# FLUORURE ($^{18}$F) POUR RADIOMARQUAGE, SOLUTION DE

## Fluoridi ($^{18}$F) solutio ad radio-signandum

DÉFINITION

Solution alcaline contenant du fluor-18 sous forme de [$^{18}$F]fluorure.

*Teneur* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au fluor-18 indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du fluor-18* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultat* : l'énergie des photons principaux est de 0,511 MeV et, selon la géométrie de mesure, il peut apparaître un pic somme de 1,022 MeV.

B. Déterminez la période approximative en effectuant au minimum 3 mesures de l'activité d'un échantillon dans les mêmes conditions géométriques et sur une durée appropriée (par exemple, 30 min).

*Résultat* : 105 min à 115 min.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultats* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, le signal dû au fluorure est négatif.

ESSAI

**pH** : 8,0 à 14,0, en utilisant une *bandelette indicatrice de pH R*.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 20 UI/mL, si la préparation à examiner est destinée à la fabrication de préparations parentérales sans autre procédé approprié d'élimination des endotoxines bactériennes. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

La solution peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai B.

**Fluor-18** : au minimum 99,9 pour cent de la radioactivité totale.

A. Spectrométrie gamma. Test préliminaire.

*Limite* : les pics du spectre gamma correspondant aux photons avec une énergie autre que 0,511 MeV et 1,022 MeV ne représentent pas plus de 0,1 pour cent de la radioactivité totale.

B. Spectrométrie gamma.

Déterminez la quantité de fluor-18 et d'impuretés radionucléidiques de période supérieure à 2 h. Pour la détection et la quantification des impuretés, conservez la préparation à examiner pendant au moins 24 h pour assurer la décroissance du fluor-18 jusqu'à un niveau permettant la détection des impuretés.

*Résultat* : la radioactivité totale due aux impuretés radionucléidiques est au maximum de 0,1 pour cent.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{18}$F]fluorure**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Diluez la préparation à examiner avec de l'*eau R* pour obtenir une concentration de radioactivité appropriée pour le détecteur de radioactivité.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg de *fluorure de potassium R* dans de l'*eau R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *résine échangeuse d'anions fortement basique pour chromatographie R* (10 μm).

*Phase mobile* : solution d'*hydroxyde de sodium R* à 4 g/L dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R*, protégée du dioxyde de carbone de l'air.

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 220 nm et détecteur de radioactivité montés en série.

*Injection* : 20 μL.

*Enregistrement* : 12 min.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *rapport signal/bruit* : au minimum 10 pour le pic principal,
– *temps de rétention du fluorure* : au minimum 3 fois le « temps de rétention nulle ».

Examinez le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner au moyen du détecteur de radioactivité et localisez le pic dû au fluorure par comparaison avec le chromatogramme obtenu avec la solution témoin au moyen du spectrophotomètre.

*Limite* :

– *[$^{18}$F]fluorure* : au minimum 98,5 pour cent de la radioactivité totale due au fluor-18.

*RADIOACTIVITÉ*

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– que la solution ne convient pas pour un usage direct chez l'homme,
– dans les cas appropriés, que la substance convient à la fabrication de préparations parentérales.

**01/2008:0555**
**corrigé 7.0**

# GALLIUM ($^{67}$Ga) (CITRATE DE), SOLUTION INJECTABLE DE

## Gallii ($^{67}$Ga) citratis solutio iniectabilis

DÉFINITION

Solution stérile de gallium-67 sous forme de citrate de gallium. Elle peut être rendue isotonique par addition de chlorure de sodium et de citrate de sodium. Elle peut contenir un conservateur antimicrobien approprié tel que l'alcool benzylique.

*Gallium-67* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au gallium-67, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du gallium-67* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultats* : les énergies des photons gamma principaux sont de 0,093 MeV, 0,185 MeV et 0,300 MeV.

B. A 0,2 mL de la préparation à examiner, ajoutez 0,2 mL d'une solution contenant 1 g/L de *chlorure ferrique R* et 0,1 pour cent *V/V* d'*acide chlorhydrique R,* puis mélangez. Comparez la coloration de la solution à examiner à celle d'une solution contenant 7 g/L de *chlorure de sodium R* et 9 g/L d'*alcool benzylique R,* traitée de la même façon. Une coloration jaune se développe uniquement dans la solution à examiner.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 5,0 à 8,0.

**Zinc** : au maximum 5 ppm.

*Solution à examiner.* A 0,1 mL de préparation à examiner, ajoutez 0,9 mL d'*eau R,* 1 mL d'une solution de *thiosulfate de sodium R* à 250 g/L, 5 mL de *solution tampon acétate pH 4,7 R* et 5,0 mL d'une solution de dithizone préparée comme suit : dissolvez 10 mg de *dithizone R* dans 100 mL de *méthyléthylcétone R* ; laissez reposer pendant 5 min, filtrez et immédiatement avant l'emploi, diluez 10 fois la solution dans de la *méthyléthylcétone R.* Agitez énergiquement pendant 2 min et laissez séparer la couche organique.

*Solution témoin.* 0,1 mL d'une *solution à 5 ppm de zinc (Zn) R* traitée de la même façon que la solution à examiner.

Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) des couches organiques à 530 nm en utilisant la couche organique d'une solution à blanc comme liquide de compensation.

*Résultats* : l'absorbance obtenue avec la couche organique de la solution à examiner n'est pas supérieure à celle de la couche organique obtenue avec la solution témoin.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Gallium-67** : au minimum 99,8 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma.

Déterminez les quantités relatives de gallium-66 et des autres impuretés radionucléiques présentes.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un instrument étalonné.

IMPURETÉS

A. gallium-66.

**01/2008:1227**
**corrigé 7.0**

# INDIUM ($^{111}$In) (CHLORURE D'), SOLUTION DE

## Indii ($^{111}$In) chloridi solutio

DÉFINITION

Solution stérile contenant de l'indium-111 sous la forme de chlorure, dans de l'acide chlorhydrique aqueux sans additifs.

*Indium-111* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due à l'indium-111, à la date et l'heure figurant sur l'étiquette.

*Radioactivité spécifique* : au minimum 1,85 GBq d'indium-111 par microgramme d'indium.

PRODUCTION

Aucun indium vecteur n'est ajouté.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement de l'indium-111* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma et X. *Effectuez l'essai après un temps suffisant pour permettre la décroissance des impuretés à période courte telles que l'indium-110m.*

*Résultats* : les énergies des principaux photons gamma de l'indium-111 sont de 0,171 MeV et de 0,245 MeV.

B. A 100 µL de *solution de nitrate d'argent R2,* ajoutez 50 µL de préparation à examiner. Il se forme un précipité blanc.

C. pH (voir Essai).

D. Examinez le chromatogramme obtenu dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultat* : le facteur de retardement du pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est 0,5 à 0,8.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 1,0 à 2,0.

**Cadmium** : au maximum 0,40 µg/mL.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner.* Prélevez 0,05 mL de solution de chlorure d'indium ($^{111}$In) et complétez à un volume approprié avec une solution d'*acide chlorhydrique R* de concentration appropriée.

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 0,1 pour cent de cadmium (Cd) R,* en la diluant avec une solution d'*acide chlorhydrique R* de même concentration que dans la solution à examiner.

*Source* : lampe à cathode creuse au cadmium.

*Longueur d'onde* : 228,8 nm.

*Dispositif d'atomisation* : électrothermique.

**Cuivre** : au maximum 0,15 µg/mL.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner.* Prélevez 0,1 mL de solution de chlorure d'indium ($^{111}$In) et complétez à un volume approprié avec une solution d'*acide chlorhydrique R* de concentration appropriée.

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 0,1 pour cent de cuivre (Cu) R,* en la diluant avec une solution d'*acide chlorhydrique R* de même concentration que dans la solution à examiner.

*Source* : lampe à cathode creuse au cuivre.

*Longueur d'onde* : 324,8 nm.

*Dispositif d'atomisation* : électrothermique.

**Fer** : au maximum 0,60 µg/mL.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner.* Prélevez 0,1 mL de solution de chlorure d'indium ($^{111}$In) et complétez à un volume approprié avec une solution d'*acide chlorhydrique R* de concentration appropriée.

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 0,1 pour cent de fer (Fe) R,* en la diluant avec une solution d'*acide chlorhydrique R* de même concentration que dans la solution à examiner.

*Source* : lampe à cathode creuse au fer.

*Longueur d'onde* : 248,3 nm.

*Dispositif d'atomisation* : électrothermique.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Indium-111**. Spectrométrie gamma et X.

*Comparaison* : préparation étalon d'indium-111.

*Résultat* : le spectre obtenu avec la préparation à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une préparation étalon d'indium-111, mises à part les différences éventuelles dues à la présence d'indium-114m.

**Impureté A** : au maximum 0,25 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma. *Effectuez l'essai après un temps suffisant pour permettre la désintégration des impuretés à période courte telles que l'indium-110m.*

Prélevez un volume de préparation à examiner équivalant à 30 MBq et enregistrez le spectre du rayonnement gamma au moyen d'un détecteur approprié, en plaçant entre l'échantillon et le détecteur un écran de plomb d'une épaisseur de 6 mm.

*Résultats* : la réponse obtenue dans la région des photons d'énergie 0,558 MeV et 0,725 MeV de l'indium-114m n'est pas supérieure à celle obtenue dans les mêmes conditions avec 75 kBq d'une préparation étalon d'indium-114m, tous les résultats de mesure étant rapportés à la date et l'heure d'administration.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**Ion [$^{111}$In]indium(III)**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*. Utilisez une feuille de fibre de verre recouverte de gel de silice.

*Phase mobile* : solution de *chlorure de sodium R* à 9,0 g/L, ajustée à pH 2,3 ± 0,05 avec de l'*acide chlorhydrique dilué R*.

*Dépôt* : 5 µL.

*Développement* : immédiatement sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : dans un courant d'air froid.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteur de retardement* : ion [$^{111}$In]indium(III) = 0,5 à 0,8.

*Limite* :

– *ion [$^{111}$In]indium(III)* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité due à l'indium-111.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil approprié.

IMPURETÉS

A. indium-114m.

**01/2008:0670**
**corrigé 7.0**

# INDIUM ($^{111}$In) (PENTÉTATE D'), SOLUTION INJECTABLE DE

## Indii ($^{111}$In) pentetatis solutio iniectabilis

DÉFINITION

Solution stérile contenant de l'indium-111 sous la forme de diéthylènetriaminepentaacétate d'indium. Elle peut contenir du calcium et être rendue isotonique par addition de chlorure de sodium et d'un tampon approprié.

*Indium-111* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due à l'indium-111, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement de l'indium-111* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma et X.

*Résultats* : les énergies des principaux photons gamma de l'indium-111 sont de 0,171 MeV et de 0,245 MeV.

B. Examinez le chromatogramme obtenu dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai). La répartition de la radioactivité contribue à l'identification de la préparation.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 7,0 à 8,0.

**Cadmium** : au maximum 5 µg/mL.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé II*).

*Solution à examiner.* Mélangez 0,1 mL de préparation à examiner à 0,9 mL d'un mélange de 1 volume d'*acide chlorhydrique R* et de 99 volumes d'*eau R*.

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 0,1 pour cent de cadmium (Cd) R* en la diluant avec un mélange de 1 volume d'*acide chlorhydrique R* et de 99 volumes d'*eau R*.

*Source* : lampe à cathode creuse au cadmium.

*Longueur d'onde* : 228,8 nm.

*Dispositif d'atomisation* : flamme air-acétylène.

**Acide diéthylènetriaminepentaacétique non complexé** : au maximum 0,4 mg/mL.

Mélangez, dans un microtube à essai, 100 µL de préparation à examiner et 100 µL d'une solution récemment préparée de *sel sodique de bleu d'hydroxynaphtol R* à 1 g/L dans une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 42 g/L. Ajoutez 50 µL d'une solution de *chlorure de calcium R* à 0,15 g/L. La solution conserve sa coloration violet-rose ou vire du bleu au violet-rose.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 14/*V* UI/mL, *V* étant égal à la dose maximale recommandée, exprimée en millilitres.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Indium-111**. Spectrométrie gamma et X.

*Comparaison* : préparation étalon d'indium-111.

*Résultat* : le spectre obtenu avec la préparation à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une préparation étalon d'indium-111, mises à part les différences éventuelles dues à la présence d'indium-114m.

**Impureté A** : au maximum 0,2 pour cent de la radioactivité totale, à la date et à l'heure d'administration.

Spectrométrie gamma.

Conservez un échantillon de la préparation à examiner assez longtemps pour que la radioactivité de l'indium-111 décroisse suffisamment et permette de déceler les impuretés radionucléidiques (échantillon à examiner). Enregistrez le spectre des rayonnements gamma de l'échantillon à examiner à l'aide d'un appareil approprié étalonné avec une préparation étalon d'indium-114m.

*Résultat* : l'indium-114m a une période de 49,5 jours et l'énergie de son photon gamma principal est de 0,190 MeV.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**Pentétate d'[$^{111}$In]indium**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* ; utilisez une feuille de fibre de verre recouverte de gel de silice et chauffée à 110 °C pendant 10 min.

*Phase mobile* : solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L.

*Dépôt* : 5-10 µL.

Préparations radiopharmaceutiques

*Développement* : sur un parcours de 10-15 cm en environ 10 min.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Identification des taches* : le pentétate d'[$^{111}$In]indium migre vers le front du solvant.

*Limite* :

– *pentétate d'[$^{111}$In]indium* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité due à l'indium-111.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

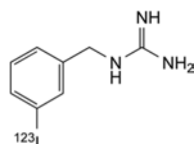
IMPURETÉS

A. indium-114m.

**01/2008:1113**
**corrigé 7.0**

# IOBENGUANE ($^{123}$I) (SOLUTION INJECTABLE D')

## Iobenguani ($^{123}$I) solutio iniectabilis




$C_8H_{10}[^{123}I]N_3$

DÉFINITION

Solution stérile et exempte d'endotoxines bactériennes de 1-(3-[$^{123}$I]iodobenzyl)guanidine ou de ses sels. Elle peut contenir un tampon approprié et un catalyseur de marquage approprié tel que le cuivre ionique et un stabilisant de marquage approprié tel que l'acide ascorbique. Elle peut contenir des agents de conservation antimicrobienne.

*Iode-123* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due à l'iode-123, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Radioactivité spécifique* : au minimum 10 GBq d'iode-123 par gramme d'iobenguane base.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore ou légèrement jaune.

*Période et nature du rayonnement de l'iode-123* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma et X.

*Résultat* : l'énergie du photon gamma principal de l'iode-123 est de 0,159 MeV.

B. Examinez le chromatogramme obtenu dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai). La répartition de la radioactivité contribue à l'identification de la préparation.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 3,5 à 8,0.

**Radioactivité spécifique**. La radioactivité spécifique est calculée à partir des résultats obtenus dans l'essai de pureté radiochimique. Déterminez la teneur en sulfate d'iobenguane à partir de la surface des pics correspondant à l'iobenguane dans les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et avec la solution témoin (b). Calculez la concentration en iobenguane base en multipliant le résultat obtenu dans l'essai par 0,85.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 175/*V* UI/mL, *V* étant la dose maximale recommandée, en millilitres.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Radionucléides autres que l'iode-123** : au maximum 0,35 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma et X.

Enregistrez le spectre des rayonnements gamma et X à l'aide d'un appareil approprié.

Déterminez les quantités relatives d'iode-125, de tellure-121 et des autres impuretés radionucléidiques présentes. Pour leur détection, conservez la préparation à examiner pendant un temps suffisant pour que l'iode-123 puisse décroître jusqu'à un niveau résiduel permettant la détection des impuretés radionucléidiques. Aucun radionucléide de période supérieur à celle de l'iode-125 n'est détecté.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{123}$I]Iobenguane**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 0,100 g d'*iodure de sodium R* dans la phase mobile et complétez à 100 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 10,0 mg de *sulfate d'iobenguane SCR* dans 25 mL de phase mobile et complétez à 50,0 mL avec la phase mobile.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice pour chromatographie R* (5 μm).

*Phase mobile* : solution de *nitrate d'ammonium R* à 80 g/L, *ammoniaque diluée R2, méthanol R* (1:2:27 *V/V/V*).

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité et spectrophotomètre à 254 nm, muni d'une cellule à flux continu.

*Injection* : 10 μL.

*Limites* :

– *[$^{123}$I]iobenguane* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité due à l'iode-123,
– *impureté A* : au maximum 4 pour cent de la radioactivité due à l'iode-123,
– *autres impuretés* : au maximum 1 pour cent de la radioactivité due à l'iode-123.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette porte la mention de la radioactivité spécifique exprimée en GBq d'iode-123 par gramme d'iobenguane base.

IMPURETÉS

A. [$^{123}$I]iodure,

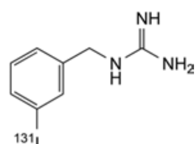
B. iode-125,

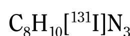
C. tellure-121.

**01/2008:1111**
**corrigé 7.0**

# IOBENGUANE ($^{131}$I) (SOLUTION INJECTABLE D') À USAGE DIAGNOSTIQUE

## Iobenguani ($^{131}$I) solutio iniectabilis ad usum diagnosticum





$C_8H_{10}[^{131}I]N_3$

DÉFINITION

Solution stérile et exempte d'endotoxines bactériennes de 1-(3-[$^{131}$I]iodobenzyl)guanidine ou de ses sels. Elle peut contenir un tampon approprié et également un catalyseur de marquage approprié tel que le cuivre ionique et un stabilisant de marquage approprié tel que l'acide ascorbique. Elle peut contenir des conservateurs antimicrobiens.

*Iode-131* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due à l'iode-131 à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Radioactivité spécifique* : au minimum 20 GBq d'iode-131 par gramme d'iobenguane base.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore ou légèrement jaune.

*Période et nature du rayonnement de l'iode-131* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.
   *Résultat* : l'énergie du photon gamma principal de l'iode-131 est de 0,365 MeV.

B. Examinez le chromatogramme obtenu dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai). La répartition de la radioactivité contribue à l'identification de la préparation.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 3,5 à 8,0.

**Radioactivité spécifique**. La radioactivité spécifique est calculée à partir des résultats obtenus dans l'essai de pureté radiochimique. Déterminez la teneur en sulfate d'iobenguane à partir des surfaces des pics correspondant à l'iobenguane dans les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et la solution témoin (b). Calculez la concentration en iobenguane base en multipliant le résultat obtenu dans l'essai par 0,85.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 175/*V* UI/mL, *V* étant la dose maximale recommandée, en millilitres.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Iode-131** : au minimum 99,9 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma.

Déterminez les proportions relatives d'iode-131, d'iode-133, d'iode-135 et des autres impuretés radionucléidiques présentes.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{131}$I]Iobenguane**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 0,100 g d'*iodure de sodium R* dans la phase mobile et complétez à 100 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 10,0 mg de *sulfate d'iobenguane SCR* dans 25 mL de phase mobile et complétez à 50,0 mL avec la phase mobile.

*Colonne* :
– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice pour chromatographie R* (5 μm).

*Phase mobile* : solution de *nitrate d'ammonium R* à 80 g/L, *ammoniaque diluée R2, méthanol R* (1:2:27 *V/V/V*).

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité et spectrophotomètre à 254 nm, muni d'une cellule à flux continu.

*Injection* : 10 μL.

*Limites* :
– *[$^{131}$I]iobenguane* : au minimum 94 pour cent de la radioactivité due à l'iode-131,
– *impureté A* : au maximum 5 pour cent de la radioactivité due à l'iode-131,
– *autres impuretés* : au maximum 1 pour cent de la radioactivité due à l'iode-131.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique la radioactivité spécifique exprimée en GBq d'iode-131 par gramme d'iobenguane base.

IMPURETÉS

A. [$^{131}$I]iodure,

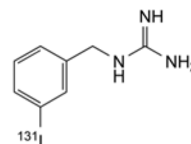
B. iode-133,

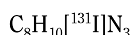
C. iode-135.

**01/2008:1112**
**corrigé 7.0**

# IOBENGUANE ($^{131}$I) (SOLUTION INJECTABLE D') À USAGE THÉRAPEUTIQUE

## Iobenguani ($^{131}$I) solutio iniectabilis ad usum therapeuticum





$C_8H_{10}[^{131}I]N_3$

DÉFINITION

Solution stérile et exempte d'endotoxines bactériennes de 1-(3-[$^{131}$I]iodobenzyl)guanidine ou de ses sels. Elle peut contenir un tampon approprié et également un catalyseur de marquage approprié tel que le cuivre ionique et un stabilisant de marquage approprié tel que l'acide ascorbique. Elle peut contenir des conservateurs antimicrobiens.

*Iode-131* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due à l'iode-131, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Radioactivité spécifique* : au minimum 400 GBq d'iode-131 par gramme d'iobenguane base.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore ou légèrement jaune.

*Période et nature du rayonnement de l'iode-131* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultat* : l'énergie du photon gamma principal de l'iode-131 est de 0,365 MeV.

B. Examinez le chromatogramme obtenu dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai). La répartition de la radioactivité contribue à l'identification de la préparation.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 3,5 à 8,0.

**Radioactivité spécifique**. La radioactivité spécifique est calculée à partir des résultats obtenus dans l'essai de pureté radiochimique. Déterminez la teneur en sulfate d'iobenguane à partir des surfaces des pics correspondant à l'iobenguane dans les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et la solution témoin (b). Calculez la concentration en iobenguane base en multipliant le résultat obtenu dans l'essai par 0,85.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 175/*V* UI/mL, *V* étant la dose maximale recommandée, en millilitres.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Iode-131** : au minimum 99,9 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma.

Déterminez les quantités relatives d'iode-131, d'iode-133, d'iode-135 et des autres impuretés radionucléidiques présentes.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{131}$I]Iobenguane**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 0,100 g d'*iodure de sodium R* dans la phase mobile et complétez à 100 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 10,0 mg de *sulfate d'iobenguane SCR* dans 25 mL de phase mobile et complétez à 50,0 mL avec la phase mobile.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : solution de *nitrate d'ammonium R* à 80 g/L, *ammoniaque diluée R2, méthanol R* (1:2:27 *V/V/V*).

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité et spectrophotomètre à 254 nm, muni d'une cellule à flux continu.

*Injection* : 10 µL.

*Limites* :

– *[$^{131}$I]iobenguane* : au minimum 92 pour cent de la radioactivité due à l'iode-131,
– *impureté A* : au maximum 7 pour cent de la radioactivité due à l'iode-131,
– *autres impuretés* : au maximum 1 pour cent de la radioactivité due à l'iode-131.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique la radioactivité spécifique exprimée en GBq d'iode-131 par gramme d'iobenguane base.

IMPURETÉS

A. [$^{131}$I]iodure,

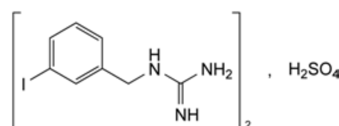
B. iode-133,

C. iode-135.

**01/2010:2351**

# IOBENGUANE (SULFATE D') POUR PRÉPARATIONS RADIOPHARMACEUTIQUES

## Iobenguani sulfas ad radiopharmaceutica




$C_{16}H_{22}I_2N_6O_4S$ $M_r$ 648

DÉFINITION

Sulfate de bis[(3-iodobenzyl)guanidine].

*Teneur* : 98,0 pour cent à 102,0 pour cent (substance desséchée).

CARACTÈRES

*Aspect* : cristaux blancs ou sensiblement blancs.

IDENTIFICATION

A. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*).

*Comparaison* : *spectre de référence du sulfate d'iobenguane de la Ph. Eur.*

B. Dissolvez, en chauffant doucement, environ 10 mg de substance à examiner dans 1 mL d'*eau R*. La solution donne la réaction (a) des sulfates (*2.3.1*).

ESSAI

**Impureté A**. Chromatographie liquide (*2.2.29*). *Préparez les solutions et la phase mobile extemporanément.*

*Solution à examiner*. Dissolvez 10,0 mg de substance à examiner dans 1 mL de phase mobile et complétez à 5,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 10,0 mg de *sulfate d'iobenguane SCR* dans 1 mL de phase mobile et complétez à 5,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 23,1 mg de *chlorure de 3-iodobenzylammonium R* (sel de l'impureté A) dans 1 mL de phase mobile et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin (c).* Mélangez 1 mL de solution témoin (a) et 1 mL de solution témoin (b).

*Solution témoin (d).* Prélevez 0,1 mL de solution témoin (b) et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice pour chromatographie R* (5 µm),
– *température* : maintenez à une température constante entre 20 °C et 30 °C.

*Phase mobile* : mélangez 40 mL d'une solution de *nitrate d'ammonium R* à 80 g/L, 80 mL d'*ammoniaque diluée R2* et 1080 mL de *méthanol R*.

Préparations radiopharmaceutiques

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 254 nm.

*Injection* : 20 µL de solution à examiner et des solutions témoins (c) et (d).

*Enregistrement* : 15 min.

*Rétention relative* par rapport à l'iobenguane (temps de rétention = environ 7 min) : impureté A = environ 0,2.

*Conformité du système* : solution témoin (c) :

– *résolution* : au minimum 4,0 entre les pics dus à l'impureté A et à l'iobenguane.

*Limite* :

– *impureté A* : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (d) (1,0 pour cent).

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 3,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 0,100 g de substance à examiner.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 10 UI/mg, si le sulfate d'iobenguane pour préparations radiopharmaceutiques est destiné à être utilisé sans autre procédé approprié d'élimination des endotoxines bactériennes.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai des substances apparentées avec la modification suivante.

*Injection* : solution à examiner et solution témoin (a).

Calculez la teneur pour cent en $C_{16}H_{22}I_2N_6O_4S$ à partir de la teneur déclarée du *sulfate d'iobenguane SCR*.

CONSERVATION

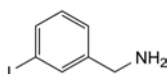
A l'abri de la lumière, à une température inférieure à 25 °C.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette recommande de tester la substance dans un essai de production avant de l'utiliser pour la fabrication de la préparation radiopharmaceutique. Ceci permet de s'assurer que, dans des conditions bien déterminées, la substance permet de produire une préparation radiopharmaceutique de qualité et en quantité souhaitées.

IMPURETÉS

*Impuretés spécifiées : A.*



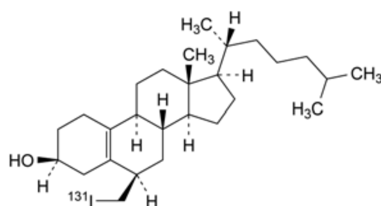

A. 1-(3-iodophényl)méthanamine.

Préparations radiopharmaceutiques

**01/2008:0939**
**corrigé 7.0**

# IODOMÉTHYLNORCHOLESTÉROL ($^{131}$I) (SOLUTION INJECTABLE D')

## Iodomethylnorcholesteroli ($^{131}$I) solutio iniectabilis




DÉFINITION

Solution stérile de 6β-[$^{131}$I]iodométhyl-19-norcholest-5(10)-én-3β-ol. Elle peut contenir un émulsifiant approprié tel que le polysorbate 80 et un conservateur antimicrobien approprié tel que l'alcool benzylique.

*Iode-131* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due à l'iode-131, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Radioactivité spécifique* : 3,7 GBq à 37 GBq par gramme de 6β-iodométhylnorcholestérol.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide ou légèrement opalescente, incolore ou jaune pâle.

*Période et nature du rayonnement de l'iode-131* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultat* : l'énergie du photon principal de l'iode-131 est de 0,365 MeV.

B. Examinez le chromatogramme obtenu dans l'essai de pureté radiochimique 6β-[$^{131}$I]iodométhyl-19-norcholest-5(10)-én-3β-ol (voir Essai).

*Résultat* : le facteur de retardement du pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est d'environ 0,5.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 3,5 à 8,5.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 175/*V* UI/mL, *V* étant la dose maximale recommandée, en millilitres.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Iode-131** : au minimum 99,9 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma.

Déterminez les quantités d'iode-131, d'iode-133, d'iode-135 et des autres impuretés radionucléidiques présentes.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**6β-[$^{131}$I]Iodométhyl-19-norcholest-5(10)-én-3β-ol**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution d'entraîneur*. Dissolvez 10 mg d'*iodure de potassium R*, 20 mg d'*iodate de potassium R* et 0,1g de *bicarbonate de sodium R* dans de l'*eau distillée R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $GF_{254}$ pour CCM R.*

*Phase mobile* : *chloroforme R.*

*Dépôt* : jusqu'à 5 µL de solution à examiner et 10 µL de solution d'entraîneur sur le même point.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm en environ 60 min.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : lumière ultraviolette à 254 nm et détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteur de retardement* : 6β-[$^{131}$I]iodométhyl-19-norcholest-5(10)-én-3β-ol = environ 0,5.

*Identification des taches* : l'impureté C demeure proche de la ligne de dépôt.

*Limite* :

– *6β-[$^{131}$I]iodométhyl-19-norcholest-5(10)-én-3β-ol* : au minimum 85 pour cent de la radioactivité totale due à l'iode-131.

**Impureté C**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution d'entraîneur*. Dissolvez 10 mg d'*iodure de potassium R*, 20 mg d'*iodate de potassium R* et 0,1 g de *bicarbonate de sodium R* dans de l'*eau distillée R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $GF_{254}$ pour CCM R*.

*Phase mobile* : *chloroforme R, éthanol anhydre R* (50:50 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL de solution d'entraîneur et puis jusqu'à 5 µL de solution à examiner sur le même point.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm en environ 90 min.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : lumière ultraviolette à 254 nm pendant 5 min et détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteur de retardement* : impureté C (tache jaune) = environ 0,5.

*Identification des taches* : le pic principal de la radioactivité est près du front du solvant ; d'autres iodocholestérols migrent près du front du solvant.

*Limite* :

– *impureté C* : au maximum 5 pour cent de la radioactivité totale.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière, à une température inférieure ou égale à – 18 °C.

IMPURETÉS

A. iode-133,

B. iode-135,

C. [$^{131}$I]iodure.

**01/2008:1533**

# KRYPTON ($^{81m}$Kr) (GAZ POUR INHALATION)

## Kryptonum ($^{81m}$Kr) ad inhalationem

DÉFINITION

Mélange gazeux composé de krypton-81m et d'un vecteur approprié tel que l'air.

PRODUCTION

Le krypton-81m résulte de la désintégration de son radionucléide parent, le rubidium-81. Le rubidium-81 possède une période de 4,58 h.

Le krypton-81m formé est séparé du rubidium-81 par un courant gazeux approprié traversant un générateur rubidium/krypton. Le rubidium-81 est produit par irradiation protonique des isotopes du krypton, ou par irradiation du brome avec des noyaux d'hélium-3 ou d'hélium-4. Après séparation de l'élément cible, le rubidium-81 est retenu sur un support approprié.

Le krypton-81m est obtenu par élution au moyen d'un vecteur tel que l'air à un débit approprié. Le taux d'humidité requis dans le gaz est fonction du type de générateur utilisé. Le tuyau utilisé lors de l'administration présente une longueur et un diamètre intérieur définis. La concentration de la radioactivité est déterminée avant l'administration.

CARACTÈRES

*Aspect* : gaz limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du krypton-81m* : voir chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma et X.

*Résultat* : l'énergie du photon gamma du krypton-81m est de 0,190 MeV.

B. La période du krypton-81m est de 11,8 s à 14,4 s.

ESSAI

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Radionucléides autres que le krypton-81m** : au maximum 0,1 pour cent de la radioactivité passée au travers de l'absorbant, calculée par rapport à la date et à l'heure d'administration.

Spectrométrie gamma et X.

Procédez à une élution à partir du générateur, comme décrit. Faites passer une quantité suffisante (2 L à 10 L) d'éluat à travers un absorbant approprié, tel que l'eau, à un débit approprié. Déterminez la radioactivité de l'éluat. Laissez décroître le krypton-81m pendant 5 min puis enregistrez le spectre de rayonnement gamma et de rayonnement X à partir de la radioactivité résiduelle de l'absorbant, au moyen d'un appareil approprié. Examinez le spectre de rayonnement gamma et de rayonnement X de l'absorbant quant à la présence d'impuretés radioactives, lesquelles doivent être identifiées et quantifiées.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la concentration radioactive de la préparation à l'aide d'un appareil approprié, par exemple une chambre à ionisation ou un spectromètre pour rayonnements gamma. La radioactivité est mesurée dans des conditions opératoires prédéfinies (telles que débit du courant gazeux et géométrie de mesure) identiques à celles utilisées pour l'étalonnage de l'instrument.

CONSERVATION

Les conditions de conservation s'appliquent au générateur.

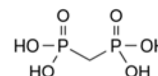
ÉTIQUETAGE

Les conditions d'étiquetage s'appliquent au générateur.

**07/2009:2350**

# MÉDRONIQUE (ACIDE) POUR PRÉPARATIONS RADIOPHARMACEUTIQUES

## Acidum medronicum ad radiopharmaceutica




$CH_6O_6P_2$ $M_r$ 176,0

[1984-15-2]

DÉFINITION

Acide méthylènediphosphonique.

*Teneur* : 99,0 pour cent à 101,0 pour cent (substance desséchée).

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre cristalline ou amorphe, blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique.

*Solubilité* : très soluble dans l'eau, très peu soluble dans l'éthanol anhydre, pratiquement insoluble dans le chlorure de méthylène.

IDENTIFICATION

*Première identification : A.*

*Seconde identification : B.*

A. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire $^1$H (*2.2.33*).

*Préparation* : solution à 100 g/L dans de l'*oxyde de deutérium R*.

*Comparaison* : solution d'*acide médronique SCR* à 100 g/L dans de l'*oxyde de deutérium R*.

B. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*).

*Comparaison* : *acide médronique SCR*.

ESSAI

**Impuretés A et B**. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire $^{1}$H (*2.2.33*).

*Solution à examiner.* A 1,0 g d'acide médronique, ajoutez 10 mL de *chloroforme deutérié R*. Agitez pendant 1 h. Filtrez sur verre fritté afin d'éliminer le précipité contenant de l'acide médronique. Evaporez le filtrat jusqu'à réduction du volume à environ 0,5 mL.

*Solution témoin (a).* Mélangez 10 µL d'*impureté A d'acide médronique SCR* avec 1,0 mL de *chloroforme deutérié R*.

*Solution témoin (b).* Mélangez 10 µL d'*impureté B d'acide médronique SCR* avec 1,0 mL de *chloroforme deutérié R*.

*Solution témoin (c).* Après l'enregistrement du spectre RMN de la solution à examiner, ajoutez à la solution à examiner : 10 µL d'*impureté A d'acide médronique SCR* et 10 µL d'*impureté B d'acide médronique SCR*.

*Appareillage* : spectromètre RMN opérant au minimum à 250 MHz.

Enregistrez les spectres RMN $^{1}$H protoniques de la solution à examiner et des solutions témoins, en utilisant si nécessaire du *tétraméthylsilane R* comme témoin interne du déplacement chimique.

*Position des signaux* : chloroforme deutérié = environ 7,3 ppm ; impureté A = environ 4,4 ppm et 1,3 ppm ; impureté B = environ 4,7 ppm, 2,4 ppm et 1,3 ppm.

*Conformité du système* :

– la position des signaux dus aux impuretés A et B dans le spectre obtenu avec la solution témoin (c) ne diffèrent pas significativement des positions dans les spectres obtenus avec les solutions témoins (a) et (b).

*Limites* :

– *intégration* : intégrez le multiplet à 4,4 ppm dû à l'impureté A et le multiplet à 2,4 ppm dû à l'impureté B dans les spectres obtenus avec la solution à examiner et la solution témoin (c) pour obtenir les surfaces des pics utilisées dans la comparaison des taux d'impuretés,
– *impuretés A, B* : pour chaque impureté, au maximum 0,5 fois la surface du pic correspondant dans le spectre obtenu avec la solution témoin (c) (1 pour cent).

**Phosphates** (*2.4.11*) : au maximum 1,0 pour cent.

Dissolvez 0,100 g d'acide médronique dans 10 mL d'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 0,5 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 0,500 g d'acide médronique.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 2,0 UI/mg.

DOSAGE

Dissolvez 75 mg d'acide médronique dans de l'*eau R* et complétez à 50 mL avec le même solvant. Titrez par l'*hydroxyde de sodium 0,1 M*, en présence de 0,1 mL de *solution de vert de bromocrésol R*.

1 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* correspond à 8,80 mg de $CH_6O_6P_2$.

CONSERVATION

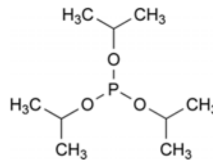
En récipient étanche, à l'abri de la lumière.

ÉTIQUETAGE

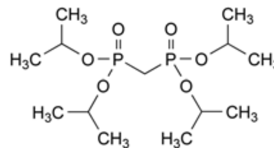
L'étiquette recommande de tester la substance dans un essai de production avant de l'utiliser pour fabrication de la préparation radiopharmaceutique. Ceci permet de s'assurer que, dans des conditions bien déterminées, la substance permet de produire une préparation radiopharmaceutique de qualité et en quantité souhaitées.

IMPURETÉS

*Impuretés spécifiées : A, B.*




A. tris(1-méthyléthoxy)phosphane,

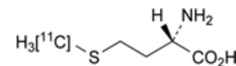



B. méthylènediphosphonate de tétrakis(1-méthyléthyle).

**01/2008:1617**

# L-MÉTHIONINE ([$^{11}$C]MÉTHYL), SOLUTION INJECTABLE DE

## L-Methionini ([$^{11}$C]methyl) solutio iniectabilis




DÉFINITION

Solution stérile d'acide (2*S*)-2-amino-4-([$^{11}$C]méthylsulfanyl)butanoïque à usage diagnostique.

*Teneur* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au carbone-11 indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Pureté* :

– au minimum 99 pour cent de la radioactivité totale correspond au carbone-11,
– au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale correspond au carbone-11 sous forme de L-[*méthyl*-$^{11}$C]méthionine et de D-[*méthyl*-$^{11}$C]méthionine,
– au maximum 10 pour cent de la radioactivité totale correspond au carbone-11 sous forme de D-[*méthyl*-$^{11}$C]méthionine.

*Teneur en méthionine* : au maximum 2 mg par dose maximale recommandée en millilitres.

PRODUCTION

*PRODUCTION DU RADIONUCLÉIDE*

Le carbone-11 est un radio-isotope du carbone généralement obtenu par irradiation protonique d'azote. Selon l'ajout d'oxygène à l'état de traces ou l'ajout de petites quantités d'hydrogène, la radioactivité est obtenue sous forme de dioxyde de [$^{11}$C] carbone ou de [$^{11}$11C]méthane.

*SYNTHÈSE RADIOCHIMIQUE*

La L-[*Méthyl*-$^{11}$C]méthionine peut être préparée par diverses voies de synthèse chimique. Toutes les méthodes reposent sur l'alkylation de l'anion sulfure généré à partir de la L-homocystéine avec de l'iodure de [$^{11}$C]méthyle ou du triflate de [$^{11}$C]méthyle. Les variantes utilisées pour générer l'anion sulfure de la L-homocystéine et pour obtenir l'iodure de [$^{11}$C]méthyle n'engendrent que des différences qualitatives négligeables en termes de radioactivité spécifique, de pureté énantiomérique et d'éventuelles impuretés chimiques et radiochimiques.

**Synthèse de l'iodure de [$^{11}$C]méthyle**

L'iodure de [$^{11}$C]méthyle peut être obtenu à partir du dioxyde de [$^{11}$C]carbone ou du [$^{11}$C]méthane. Le procédé le plus couramment utilisé est la réduction du dioxyde de [$^{11}$C]carbone

Préparations radiopharmaceutiques

par l'hydrure de lithium-aluminium. On fait ensuite réagir le [$^{11}$C]méthanol formé avec l'acide iodhydrique. Un autre procédé consiste à faire réagir de l'iode avec du [$^{11}$C]méthane, obtenu soit directement dans la cible soit par des procédés en ligne à partir du dioxyde de [$^{11}$C]carbone.

**Synthèse du triflate de [$^{11}$C]méthyle**

Le triflate de [$^{11}$C]méthyle peut être préparé à partir d'iodure de $^{11}$[C]méthyle en utilisant un support solide tel que du carbone graphité imprégné avec du triflate d'argent.

**Synthèse de la L-[*méthyl*-$^{11}$C]méthionine**

Le procédé le plus couramment utilisé pour obtenir la L-[*méthyl*-$^{11}$C]méthionine est l'alkylation de l'anion sulfure généré par la L-homocystéine thiolactone avec de l'iodure de [$^{11}$C]méthyle ou avec du triflate de [$^{11}$C]méthyle, dans des conditions alcalines et dans un solvant tel que l'acétone. La L-[*méthyl*-$^{11}$C]méthionine obtenue peut être purifiée par chromatographie liquide semi-préparative, par exemple sur une colonne remplie de gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie avec, comme éluant, une solution de chlorure de sodium à 9 g/L.

**Chlorhydrate de L-homocystéine thiolactone**

Pouvoir rotatoire spécifique (*2.2.7*) : + 20,5 à + 21,5, déterminé avec une solution à 10 g/L à 25 °C.

Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*).

*Comparaison : spectre de référence du chlorhydrate de L-homocystéine thiolactone de la Ph. Eur.*

## CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du carbone-11* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

## IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

   *Résultats* : l'énergie de tous les photons gamma est de 0,511 MeV ; selon la géométrie de mesure, il peut apparaître un pic somme de 1,022 MeV.

B. Pureté radionucléidique (voir Essai).

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique.

   *Résultats* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b).

## ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 4,5 à 8,5.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 175/*V* UI/mL, *V* étant la dose maximale recommandée en millilitres. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ CHIMIQUE*

**Impureté A, impureté B et méthionine**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 0,6 mg de *chlorhydrate de L-homocystéine thiolactone R*, 2 mg de *DL-homocystéine R* et 2 mg de *DL-méthionine R* dans de l'*eau R* et complétez au volume *V* avec le même solvant, *V* étant la dose maximale recommandée en millilitres.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 2 mg de *L-méthionine R* dans le même solvant que celui utilisé pour la préparation de la solution à examiner et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 μm) à particules sphériques d'une surface spécifique de 220 m$^2$/g, d'un diamètre de pores de 8 nm et présentant un taux de carbone de 6,2 pour cent,
– *température* : 25 °C.

*Phase mobile* : solution de *phosphate monopotassique R* à 1,4 g/L.

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 225 nm et détecteur de radioactivité monté en série.

*Injection* : injecteur à boucle.

*Enregistrement* : 10 min.

*Rétention relative* par rapport à la méthionine (temps de rétention = environ 2,6 min) : impureté B = environ 0,8 ; impureté A = environ 2,7.

*Conformité du système* : solution témoin (a) :

– *résolution* : au minimum 2,5 entre les pics dus à la méthionine et l'impureté B.

*Limites* : examinez le chromatogramme obtenu au moyen du spectrophotomètre :

– *impureté A* : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,6 mg/*V*),
– *impureté B* : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (2 mg/*V*),
– *méthionine* : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (2 mg/*V*).

**Solvants résiduels** (*2.4.24*) : au maximum 50 mg/*V* pour la teneur en acétone, *V* étant la dose maximale recommandée en millilitres. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Carbon-11** : au minimum 99 pour cent de la radioactivité totale.

A. Spectrométrie gamma.

   *Comparaison* : solution étalon de fluor-18 ou en utilisant un appareil étalonné avec une telle solution. Des solutions étalons de fluor-18 et/ou des services d'étalonnage sont disponibles auprès de l'Autorité compétente.

   *Résultats* : le spectre obtenu avec la solution à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une solution étalon de fluor-18.

B. Période : 19,9 min à 20,9 min.

La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**L-[Méthyl-$^{11}$C]méthionine et impureté E**. Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai d'impureté A, impureté B et méthionine.

*Injection* : solution à examiner et solution témoin (b).

*Limites* : examinez le chromatogramme obtenu au moyen des détecteurs de radioactivité :

– *total de L-[méthyl-$^{11}$C]méthionine et d'impureté E* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale,
– le chromatogramme peut présenter d'autres pics dus à l'impureté C, à l'impureté D et l'impureté F.

*PURETÉ ÉNANTIOMÉRIQUE*

**Impureté E**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 2 mg de *L-méthionine R* dans l'*eau R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

Préparations radiopharmaceutiques

*Solution témoin (b).* Dissolvez 4 mg de *DL-méthionine R* dans de l'*eau R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice octadecylsilylé pour CCM pour séparation des composés chiraux R.*

*Phase mobile* : *méthanol R, eau R* (50:50 *V/V*).

*Dépôt* : 2-10 µL.

*Développement* : sur un parcours de 8 cm.

*Séchage* : à l'air pendant 5 min.

*Détection* : pulvérisez une solution de *ninhydrine R* à 2 g/L dans l'*éthanol R* et chauffez à 60 °C pendant 10 min. Déterminez la distribution de radioactivité à l'aide d'un détecteur approprié.

*Facteurs de retardement* : L-[*méthyl*-$^{11}$C]méthionine = environ 0,58 ; impureté E = environ 0,51.

*Conformité du système* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) présente 2 taches nettement séparées.

*Limites* :

– *total de L-[méthyl-$^{11}$C]méthionine et d'impureté E* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale.
– *impureté E* : au maximum 10 pour cent de la radioactivité totale.

La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

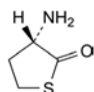
RADIOACTIVITÉ

Mesurez la radioactivité de la préparation à examiner à l'aide d'un appareillage approprié, en comparant avec une solution étalon de fluor-18 ou en utilisant un appareil étalonné avec une telle solution.

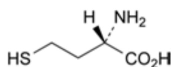
ÉTIQUETAGE

La notice indique la dose maximale recommandée en millilitres.

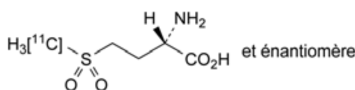
IMPURETÉS



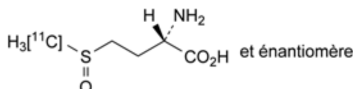

A. (3*S*)-3-aminodihydrothiophén-2(3*H*)-one (thiolactone de L-homocystéine),



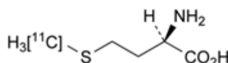

B. acide (2*S*)-2-amino-4-sulfanylbutanoïque (L-homocystéine),




C. acide (2*RS*)-2-amino-4-([$^{11}$C]méthylsulfonyl)butanoïque (DL-[*méthyl*-$^{11}$C]méthionine *S,S*-dioxyde),




D. acide (2*RS*)-2-amino-4-([$^{11}$C]méthylsulfinyl)butanoïque (DL-[*méthyl*-$^{11}$C]méthionine *S*-oxyde),




E. acide (2*R*)-2-amino-4-([$^{11}$C]méthylsulfanyl)butanoïque (D-[*méthyl*-$^{11}$C]méthionine),

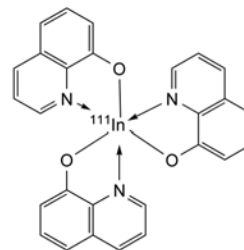
[$^{11}$C]H$_3$-OH

F. [$^{11}$C]méthanol.

**01/2008:1109**
**corrigé 7.0**

# OXINE INDIÉE ($^{111}$In) (SOLUTION D')

## Indii ($^{111}$In) oxini solutio




$C_{27}H_{18}[^{111}In]N_3O_3$ $M_r$ 543,5

DÉFINITION

Solution stérile contenant de l'indium-111 combiné à la 8-hydroxyquinoléine, sous la forme d'un complexe. Elle peut contenir des agents tensioactifs et être rendue isotonique par addition de chlorure de sodium et d'un tampon approprié.

*Indium-111* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due à l'indium-111, à la date et l'heure figurant sur l'étiquette.

*Radioactivité spécifique* : au minimum 1,85 GBq d'indium-111 par microgramme d'indium.

PRODUCTION

Aucun indium vecteur n'est ajouté.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement de l'indium-111* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma et X. *Effectuez l'essai après un temps suffisant pour permettre la décroissance des impuretés à période courte telles que l'indium-110m.*

*Résultats* : les énergies des principaux photons gamma de l'indium-111 sont de 0,171 MeV et de 0,245 MeV.

B. Dans un récipient de verre d'un diamètre intérieur d'environ 20 mm, placez 5-10 mg d'*oxyde de magnésium R*. Ajoutez 20 µL de préparation à examiner. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm. Il apparaît une fluorescence jaune vif.

C. La répartition de la radioactivité entre les phases organique et aqueuse obtenues dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai) contribue à l'identification de la préparation.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 6,0 à 7,5.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Indium-111**. Spectrométrie gamma et X.

*Comparaison* : préparation étalon d'indium-111.

*Résultat* : le spectre obtenu avec la préparation à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une préparation étalon d'indium-111, mises à part les différences éventuelles dues à la présence d'indium-114m.

**Impureté A** : au maximum 0,25 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma. *Effectuez l'essai après un temps suffisant pour permettre la décroissance des impuretés à période courte telles que l'indium-110m.*

Prélevez un volume de préparation à examiner équivalent à 30 MBq et enregistrez le spectre du rayonnement gamma au moyen d'un détecteur approprié, en plaçant entre l'échantillon et le détecteur un écran de plomb d'une épaisseur de 6 mm.

*Résultats* : la réponse obtenue dans la région correspondant aux photons d'énergie 0,558 MeV et 0,725 MeV de l'indium-114m n'est pas supérieure à celle obtenue dans les mêmes conditions avec 75 kBq d'une préparation étalon d'indium-114m, tous les résultats de mesure étant rapportés à la date et l'heure d'administration.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**Oxine [$^{111}$In]indiée**. Dans une ampoule à décantation silanisée contenant 3 mL d'une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, introduisez 100 µL de préparation à examiner et mélangez. Ajoutez 6 mL d'*octanol R* et agitez énergiquement. Laissez décanter, puis transférez la phase inférieure dans un flacon approprié pour le comptage. Laissez la phase supérieure s'écouler totalement dans un flacon semblable. Introduisez 1 mL d'*octanol R* dans l'ampoule à décantation, agitez énergiquement et ajoutez au flacon contenant la fraction organique. Introduisez 5 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* dans l'ampoule à décantation, agitez énergiquement et versez les produits de rinçage dans un 3$^{e}$ flacon. Scellez-les puis, à l'aide d'un appareil approprié, mesurez la radioactivité contenue dans chaque flacon. Calculez la pureté radiochimique en exprimant la radioactivité de l'oxine [$^{111}$In]indiée, contenu dans la phase organique, en pourcentage de la radioactivité totale due à l'indium-111 mesurée dans les 3 flacons.

*Résultat* : au minimum 90 pour cent de la radioactivité due à l'indium-111.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique que la solution ne convient pas pour un usage direct chez l'homme.

IMPURETÉS

A. indium-114m.

**01/2008:1620**

# OXYGÈNE ($^{15}O$)

## Oxygenium ($^{15}O$)

DÉFINITION

Mélange composé d' [$^{15}$O]oxygène en phase gazeuse et d'un excipient approprié tel que l'*Air médicinal (1238)*, à usage diagnostique.

*Pureté* :

– au minimum 99 pour cent de la radioactivité totale correspond à l'oxygène-15,
– au minimum 97 pour cent de la radioactivité totale correspond à l'oxygène-15 sous forme d'oxygène ($O_2$).

PRODUCTION

*PRODUCTION DE RADIONUCLEIDE*

L'oxygène-15 est un radio-isotope de l'oxygène qui peut être produit par diverses réactions nucléaires telles que l'irradiation d'azote-15 par des protons ou l'irradiation d'azote-14 par des deutons.

*SYNTHESE RADIOCHIMIQUE*

Afin de récupérer l'oxygène-15 en oxygène moléculaire à partir du gaz azote cible, de l'oxygène entraîneur est ajouté à des concentrations variant en général de 0,2 pour cent *V/V* à 1,0 pour cent *V/V*. Après irradiation, le gaz cible est généralement passé au travers de charbon activé et d'un absorbant de dioxyde de carbone, tel que de la chaux sodée, avant d'être mélangé à l'excipient.

CARACTÈRES

*Aspect* : gaz incolore.

*Période et nature du rayonnement de l'oxygène-15* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.
   *Résultats* : l'énergie de tous les photons gamma est de 0,511 MeV ; selon la géométrie de mesure, il peut apparaître un pic somme de 1,022 MeV.
B. Pureté radionucléidique (voir Essai).
C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique.
   *Résultats* : les pics principaux du chromatogramme obtenu au moyen du détecteur de radioactivité avec le gaz à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux pics principaux correspondant à l'oxygène dans le chromatogramme obtenu au moyen du détecteur à conductivité thermique avec le gaz témoin.

ESSAI

*Les essais suivants sont effectués sur l'[$^{15}$O]oxygène, comme indiqué sous Synthèse radiochimique, avant le mélange avec l'excipient.*

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Oxygène-15** : au minimum 99 pour cent de la radioactivité totale.

A. Spectrométrie gamma.
   *Comparaison* : solution étalon de fluor-18 ou en utilisant un appareil étalonné avec une telle solution. Des solutions étalons de fluor-18 et/ou des services d'étalonnage sont disponibles auprès de l'Autorité compétente.
   *Résultats* : le spectre obtenu avec la solution à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une solution étalon de fluor-18.
B. Période : 1,9 min à 2,2 min.

La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**Oxygène-15 sous forme de $O_2$**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Echantillon à examiner.* [$^{15}$O]oxygène comme indiqué sous Synthèse radiochimique.

*Gaz témoin. Mélange gazeux à base d'azote R.*

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 1,8 m, Ø1 = 6,3 mm et Ø2 = 3,2 mm,
– *phase stationnaire* : *colonne concentrique pour CPG R.*

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R.*

*Débit* : 65 mL/min.

*Température* :

– *colonne* : 40 °C,
– *chambre à injection* : 40 °C,
– *détecteur à conductivité thermique* : 70 °C.

*Détection* : détecteur à conductivité thermique et détecteur de radioactivité montés en série.

*Injection* : injecteur à boucle.

*Enregistrement* : 10 min.

Préparations radiopharmaceutiques

*Temps de rétention* : oxygène, azote et monoxyde de carbone éluant de la colonne intérieure = environ 0,4 min ; dioxyde de carbone éluant de la colonne intérieure = environ 0,8 min ; oxygène éluant de la colonne extérieure = environ 2,1 min ; azote éluant de la colonne extérieure = environ 3,1 min ; monoxyde de carbone éluant de la colonne extérieure = environ 6,2 min.

*Conformité du système* : gaz témoin :

– 5 pics principaux nettement séparés sont observés dans le chromatogramme obtenu au moyen du détecteur à conductivité thermique,
– résolution : au minimum 1,5 entre les pics dus au dioxyde de carbone éluant de la colonne intérieure et à l'oxygène éluant de la colonne extérieure, dans le chromatogramme obtenu au moyen du détecteur à conductivité thermique.

*Limites* : examinez le chromatogramme obtenu au moyen du détecteur de radioactivité et calculez la teneur pour cent en substances contenant de l'oxygène-15 à partir de la surface des pics.

– *oxygène-15 gazeux sous forme de* $O_2$ : au minimum 97 pour cent de la radioactivité totale,
– *exclusion* : ne tenez pas compte du premier pic, correspondant aux composants qui sont co-élués de la colonne intérieure.

RADIOACTIVITÉ

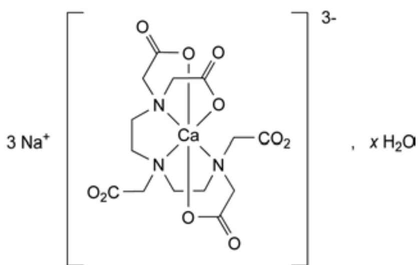
La concentration radioactive est déterminée avant administration.

Mesurez la radioactivité à l'aide d'un compteur approprié et comparez-la à celle d'une préparation étalon de fluor-18 ou à l'aide d'un appareil étalonné au moyen d'une telle préparation.

**01/2009:2353**

# PENTÉTATE (CALCIUM) DE SODIUM POUR PRÉPARATIONS RADIOPHARMACEUTIQUES

## Natrii calcii pentetas ad radiopharmaceutica




$C_{14}H_{18}CaN_3Na_3O_{10},xH_2O$ $M_r$ 497,4 (substance anhydre)

DÉFINITION

[1,1′,1″,1‴-[[(Carboxylatométhyl)imino]bis(éthylènenitrilo)]tétraacétato]calciate(3-) de trisodium.

Le calcium pentétate de sodium pour préparations radiopharmaceutiques est une matière première pour la préparation de solution injectable de pentétate-technétium ($^{99m}$Tc).

*Teneur* : 98,0 pour cent à 102,0 pour cent (substance anhydre).

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre ou cristaux blancs ou sensiblement blancs, hygroscopique.

*Solubilité* : facilement soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

IDENTIFICATION

A. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*).
*Comparaison* : *calcium pentétate de sodium SCR*.
B. Incinérez. Le résidu donne la réaction (b) du calcium (*2.3.1*).
C. La substance à examiner donne la réaction (a) du sodium (*2.3.1*).

ESSAI

**Solution S**. Dissolvez 5,0 g de substance à examiner dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R* et complétez à 25,0 mL avec le même solvant.

**Aspect de la solution**. La solution S est limpide (*2.2.1*) et incolore (*2.2.2, Procédé II*).

**pH** (*2.2.3*) : 8,0 à 9,5 pour la solution S.

**Impureté A**. Chromatographie liquide (*2.2.29*). *Effectuez l'essai à l'abri de la lumière.*

*Mélange de solvants.* Dissolvez 10 g de *sulfate ferrique pentahydraté R* dans 20 mL d'*acide sulfurique 0,5 M* et ajoutez 780 mL d'*eau R*. Ajustez à pH 2,0 avec de l'*hydroxyde de sodium 1 M* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

*Solution à examiner.* Dissolvez 0,100 g de substance à examiner dans le mélange de solvants et complétez à 25,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 0,100 g de *calcium édétate de sodium R* dans le mélange de solvants et complétez à 25,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 40,0 mg d'*acide nitrilotriacétique R* (impureté A) dans le mélange de solvants et complétez à 100,0 mL avec le mélange de solvants. A 10,0 mL de solution, ajoutez 1 mL de solution témoin (a) et complétez à 100,0 mL avec le mélange de solvants. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec le mélange de solvants.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,10 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *carbone graphité pour chromatographie R1* (5 µm) à particules sphériques présentant une surface spécifique de 120 $m^2/g$ et un diamètre de pores de 25 nm.

*Phase mobile* : dissolvez 50 mg de *sulfate ferrique pentahydraté R* dans 50 mL d'*acide sulfurique 0,5 M* et ajoutez 750 mL d'*eau R*. Ajustez à pH 1,5 avec de l'*acide sulfurique 0,5 M* ou de l'*hydroxyde de sodium 1 M*, ajoutez 20 mL d'*éthylèneglycol R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R*.

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 273 nm.

*Injection* : 20 µL de solution à examiner et de solution témoin (b) ; filtrez les solutions et injectez immédiatement.

*Enregistrement* : 4 fois le temps de rétention du complexe de fer et d'impureté A.

*Temps de rétention* : complexe de fer et d'impureté A = environ 5 min ; complexe de fer et d'acide édétique = environ 10 min ; le complexe de fer et d'acide pentétique elue avec le volume mort.

*Conformité du système* : solution témoin (b) :

– *résolution* : au minimum 7 entre les pics dus au complexe de fer et d'impureté A et au complexe de fer et d'acide édétique,
– *rapport signal/bruit* : au minimum 50 pour le pic dû au complexe de fer et d'impureté A.

*Limite* :

– *impureté A* : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,1 pour cent).

**Impureté B** : au maximum 1,0 pour cent.

Dissolvez 5,0 g de substance à examiner dans 250 mL d'*eau R*. Ajoutez 10 mL de *solution tampon chlorure d'ammonium pH 10,0 R* et 50 mg de *mélange composé au mordant noir*

Préparations radiopharmaceutiques

*11 R*. Le virage au violet de l'indicateur ne nécessite pas plus de 1,3 mL de *chlorure de magnésium 0,1 M*.

**Chlorures** : au maximum 0,1 pour cent.

Dissolvez 0,7 g de substance à examiner dans de l'*eau R* et complétez à 20 mL avec le même solvant. Ajoutez 30 mL d'*acide nitrique dilué R,* laissez reposer pendant 30 min et filtrez. Prélevez 10 mL de filtrat et complétez à 50 mL avec de l'*eau R*. Utilisez cette solution comme solution à examiner. Préparez le témoin avec 0,40 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M,* ajoutez 6 mL d'*acide nitrique dilué R* et complétez à 50 mL avec de l'*eau R*. Filtrez les 2 solutions si nécessaire. Ajoutez, à chacune des solutions, 1 mL de *solution nitrate d'argent R2,* mélangez et laissez reposer pendant 5 min à l'abri de la lumière. Si la solution à examiner présente une opalescence, celle-ci n'est pas plus prononcée que celle de la solution témoin.

**Fer** (*2.4.9*) : au maximum 20 ppm.

Prélevez 2,5 mL de solution S et complétez à 10 mL avec de l'*eau R*. A la solution à examiner et au témoin, ajoutez 0,25 g de *chlorure de calcium R* avant l'addition d'*acide thioglycolique R*.

**Métaux lourds** (*2.4.8*) : au maximum 20 ppm.

1,0 g de substance à examiner satisfait à l'essai F. Pour la minéralisation, remplacez l'*acide sulfurique R* par de l'*acide nitrique R*. Préparez la solution témoin avec 2 mL de *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R*.

**Eau** (*2.5.12*) : au maximum 15,0 pour cent, déterminé sur 0,100 g de substance à examiner.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 0,1 UI/mg, si la substance à examiner est destinée à la fabrication de préparations parentérales sans autre procédé approprié d'élimination des endotoxines bactériennes.

DOSAGE

Dissolvez 0,100 g de substance à examiner dans de l'*eau R* et complétez à 50,0 mL avec le même solvant. A 25,0 mL de solution, ajoutez 80 mL d'*eau R*. Ajustez à pH 2,3 avec de l'*acide nitrique dilué R*. Titrez par le *nitrate de bismuth 0,01 M* en présence de 0,1 mL d'une solution de *xylénolorange R* à 1 g/L comme indicateur. La coloration de la solution vire du jaune au rouge.

1 mL de *nitrate de bismuth 0,01 M* correspond à 4,974 mg de $C_{14}H_{18}CaN_3Na_3O_{10}$.

CONSERVATION

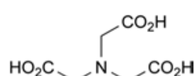
En récipient étanche, à l'abri de la lumière.

ÉTIQUETAGE

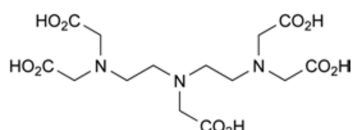
L'étiquette recommande de contrôler la substance dans un essai de production avant de l'utiliser pour la fabrication de préparations radiopharmaceutiques. Ceci permet de s'assurer que, dans des conditions de production spécifiées, la substance permet de produire une préparation radiopharmaceutique de qualité spécifiée et en quantité souhaitée.

IMPURETÉS

*Impuretés spécifiées : A, B.*




A. acide nitrilotriacétique,

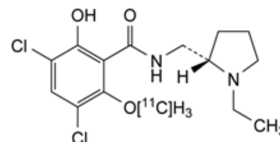



B. acide [[(carboxyméthyl)imino]bis(éthylènenitrilo)]tétra acétique (acide pentétique).

01/2008:1924

# RACLOPRIDE ([$^{11}$C]MÉTHOXY), SOLUTION INJECTABLE DE

## Raclopridi ([$^{11}$C]methoxy) solutio iniectabilis




DÉFINITION

Solution stérile de 3,5-dichloro-*N*-[[(2*S*)-1-éthylpyrrolidin-2-yl]méthyl]-2-hydroxy-6-([$^{11}$C]méthoxy)benzamide.

*Teneur* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au carbone-11 indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Pureté* :

- au minimum 99 pour cent de la radioactivité totale correspondant au carbone-11,
- au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale correspondant au carbone-11 sous forme de [*méthoxy*-$^{11}$C]raclopride.

*Teneur en raclopride* : au maximum 10 µg par dose maximale recommandée en millilitres.

PRODUCTION

*PRODUCTION DU RADIONUCLÉIDE*

Le carbone-11 est un isotope radioactif du carbone généralement obtenu par irradiation protonique de l'azote. Selon l'ajout d'oxygène à l'état de traces ou l'ajout de petites quantités d'hydrogène, la radioactivité est obtenue sous forme de dioxyde de [$^{11}$C]carbone ou de [$^{11}$C]méthane.

*SYNTHÈSE RADIOCHIMIQUE*

Le [*méthoxy*-$^{11}$C]raclopride peut être préparé par *O*-alkylation de l'anion phénolate de (*S*)-3,5-dichloro-2,6-dihydroxy-*N*-[(1-éthylpyrrolidin-2-yl)méthyl]benzamide avec de l'iodo[$^{11}$C]méthane ou du trifluorométhanesulfonate de [$^{11}$C]méthyle.

**Synthèse de l'iodo[$^{11}$C]méthane**

L'iodo[$^{11}$C]méthane peut être obtenu à partir du dioxyde de [$^{11}$C]carbone ou du [$^{11}$C]méthane. Le procédé le plus couramment utilisé est la réduction du dioxyde de [$^{11}$C]carbone par l'hydrure de lithium-aluminium. On fait ensuite réagir le [$^{11}$C]méthanolate de lithium-aluminium ainsi formé avec l'acide iodhydrique pour obtenir de l'iodo[$^{11}$C]méthane via le [$^{11}$C]méthanol. Un autre procédé consiste à faire réagir de l'iode avec du [$^{11}$C]méthane, obtenu soit directement dans la cible soit par des procédés en ligne à partir du dioxyde de [$^{11}$C]carbone.

**Synthèse du trifluorométhanesulfonate de [$^{11}$C]méthyle**

Le trifluorométhanesulfonate de [$^{11}$C]méthyle peut être préparé à partir d'iodo[$^{11}$C]méthane en utilisant un support solide tel que du carbone graphité imprégné de trifluorométhane sulfonate d'argent.

**Synthèse du [*méthoxy*-$^{11}$C]raclopride**

La méthylation avec de l'iodo[$^{11}$C]méthane se fait dans des conditions alcalines et dans un solvant tel que le diméthylsulfoxyde. La méthylation avec du trifluorométhanesulfonate de [$^{11}$C]méthyle se fait dans un solvant tel que le diméthylformamide ou l'acétone. Le [*méthoxy*-$^{11}$C]raclopride obtenu peut être purifié par chromatographie liquide semi-préparative, par exemple sur une colonne remplie de gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie avec, comme éluant, un mélange de 25 volumes d'acétonitrile et de 75 volumes d'acide phosphorique 0,01 M.

*PRÉCURSEUR DE SYNTHÈSE*

**Bromhydrate de (*S*)-3,5-dichloro-2,6-dihydroxy-*N*-[(1-éthylpyrrolidin-2-yl)méthyl]benzamide**

Point de fusion (*2.2.14*) : 211 °C à 213 °C.

Pouvoir rotatoire spécifique (*2.2.7*) : + 11,3 à + 11,5, déterminé avec une solution à 15,0 g/L dans l'*éthanol R* à 22 °C.

## CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du carbone-11* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides*.

## IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultats* : l'énergie de tous les photons gamma est de 0,511 MeV ; selon la géométrie de mesure, il peut apparaître un pic somme de 1,022 MeV.

B. La préparation à examiner satisfait à l'essai B de pureté radionucléidique (voir Essai).

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique.

*Résultats* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (d).

## ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 4,5 à 8,5.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 175/*V* UI/mL, *V* étant la dose maximale recommandée en millilitres. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ CHIMIQUE*

**Raclopride et impureté A**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 7,2 mg de *tartrate de raclopride R* dans de l'*eau R* et complétez à 50 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 1,2 mg de *bromhydrate de (S)-3,5-dichloro-2,6-dihydroxy-N-[(1-éthylpyrrolidin-2-yl)méthyl]benzamide R* dans du *méthanol R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (c)*. A 0,1 mL de solution témoin (a) ajoutez 0,1 mL de solution témoin (b) et complétez au volume *V* avec de l'*eau R, V* étant la dose maximale recommandée en millilitres.

*Solution témoin (d)*. Prélevez 1,0 mL de la solution témoin (a) et complétez à 10,0 mL avec de l'*eau R*.

*Colonne* :

- *dimensions* : *l* = 0,05 m, Ø = 4,6 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie R* (3,5 µm) à particules sphériques présentant une surface spécifique de 175 m$^2$/g, un diamètre de pores de 12,5 nm, un volume de pores de 0,7 cm$^3$/g et un taux de carbone de 15 pour cent,
- *température* : 30 °C.

*Phase mobile* : dissolvez 2 g d'*heptanesulfonate de sodium R* dans 700 mL d'*eau R*, ajustez à pH 3,9 avec de l'*acide phosphorique R* et complétez à 1000 mL avec de l'*acétonitrile R*.

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 220 nm et détecteur de radioactivité montés en série.

*Injection* : injecteur à boucle ; injectez la solution à examiner et les solutions témoins (b) et (c).

*Enregistrement* : 10 min.

*Rétention relative* par rapport au raclopride :
impureté A = environ 0,46.

*Conformité du système* : solution témoin (c) :

- *résolution* : au minimum 5 entre les pics dus au raclopride et à l'impureté A.

*Limites* : examinez le chromatogramme obtenu avec le spectrophotomètre :

- *raclopride* : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) (10 µg/*V*),
- *impureté A* : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) (1 µg/*V*).

**Solvants résiduels** : limites conformes aux principes définis dans le chapitre général (*5.4*), en utilisant la méthode générale (*2.4.24*). La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Carbone-11** : au minimum 99 pour cent de la radioactivité totale.

La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

A. Spectrométrie gamma.

*Comparaison* : solution étalon de fluor-18 ou en utilisant un appareil étalonné. Des solutions étalons de fluor-18 et/ou des services d'étalonnage sont disponibles auprès de l'Autorité compétente.

*Résultats* : le spectre obtenu avec la solution à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une solution étalon de fluor-18.

B. Période : 19,9 min à 20,9 min.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai Raclopride et impureté A avec la modification suivante.

*Injection* : solution à examiner et solution témoin (d).

*Limites* : examinez le chromatogramme obtenu avec le détecteur de radioactivité :

- *[méthoxy-$^{11}$C]raclopride* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale.

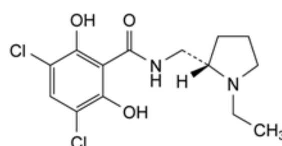
## RADIOACTIVITÉ

Mesurez la radioactivité de la préparation à examiner à l'aide d'un appareillage approprié, en comparant avec une préparation étalon de fluor-18 ou en utilisant un appareil étalonné.

## ÉTIQUETAGE

La notice indique la dose maximale recommandée en millilitres.

## IMPURETÉS




A. 3,5-dichloro-*N*-[[(2*S*)-1-éthylpyrrolidin-2-yl]méthyl]-2,6-dihydroxybenzamide.

Préparations radiopharmaceutiques

**01/2008:1920**

# SODIUM (ACÉTATE [1-$^{11}$C] DE), SOLUTION INJECTABLE D'

## Natrii acetatis ([1-$^{11}$C]) solutio iniectabilis

$CH_3{}^{11}COONa$

DÉFINITION

Solution stérile de [1-$^{11}$C]acétate de sodium en équilibre avec l'acide [1-$^{11}$C]acétique.

*Teneur* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au carbone-11 indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

PRODUCTION

*PRODUCTION DU RADIONUCLÉIDE*

Le carbone-11 est un isotope radioactif du carbone généralement obtenu par irradiation protonique de l'azote. Par l'addition d'oxygène à l'état de traces, la radioactivité est obtenue sous forme de dioxyde de [$^{11}$C]carbone.

*SYNTHÈSE RADIOCHIMIQUE*

Le dioxyde de [$^{11}$C]carbone peut être séparé du mélange gazeux cible par piégeage cryogénique ou par adsorption sur un tamis moléculaire à température ambiante. Le dioxyde de [$^{11}$C]carbone est ensuite libéré avec un gaz inerte tel que l'azote, à une température supérieure à la température de capture. Le [1-$^{11}$C]acétate est généralement préparé par la réaction du bromure de méthylmagnésium avec le dioxyde de [$^{11}$C]carbone dans des solvants organiques tels que l'éther ou le tétrahydrofurane.

L'hydrolyse du produit de la réaction donne l'acide [1-$^{11}$C]acétique. Il est purifié par des méthodes chromatographiques. L'éluat est dilué dans une solution de chlorure de sodium.

*PRÉCURSEUR DE SYNTHÈSE*

**Bromure de méthylmagnésium**. La réactivité du bromure de méthylmagnésium est testée par la décomposition d'une quantité définie dans l'eau. La quantité de méthane libéré pendant cette réaction est au minimum de 90 pour cent de la valeur théorique.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide incolore.

*Période et nature du rayonnement du carbone-11* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

   *Résultats* : l'énergie de tous les photons gamma est de 0,511 MeV ; selon la géométrie de mesure, il peut apparaître un pic somme de 1,022 MeV.

B. La préparation à examiner satisfait à l'essai B de pureté radionucléidique (voir Essai).

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique.

   *Résultats* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 4,5 à 8,5.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 175/*V* UI/mL, *V* étant la dose maximale recommandée en millilitres. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ CHIMIQUE*

**Acétate**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution témoin*. Dissolvez 28 mg d'*acétate de sodium R* dans de l'*eau R* et complétez à *V, V* étant la dose maximale recommandée en millilitres.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *résine échangeuse d'anions fortement basique pour chromatographie R* (10 µm),
– *température* : 25 °C.

*Phase mobile* : *hydroxyde de sodium 0,1 M* protégé du dioxyde de carbone de l'air.

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 220 nm et détecteur de radioactivité montés en série.

*Injection* : injecteur à boucle.

*Enregistrement* : 10 min.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 4,0 entre les pics dus au « hold-up volume » et à l'acétate.

*Limite* : examinez les chromatogrammes obtenus au moyen du spectrophotomètre :

– *acétate* : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (20 mg par *V*).

**Solvants résiduels** : limites conformes aux principes définis dans le chapitre général (*5.4*), en utilisant la méthode générale (*2.4.24*). La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Carbone-11** : au minimum 99 pour cent de la radioactivité totale.

La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin des essais.

A. Spectrométrie gamma.

   *Comparaison* : solution étalon de fluor-18 ou en utilisant un appareil étalonné. Des solutions étalons de fluor-18 et/ou des services d'étalonnage sont disponibles auprès de laboratoires désignés par l'Autorité compétente.

   *Résultats* : le spectre obtenu avec la solution à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une solution étalon de fluor-18.

B. Période : 19,9 min à 20,9 min.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[1-$^{11}$C]Acétate**. Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai Acétate.

*Limite* : examinez les chromatogrammes obtenus au moyen du spectrophotomètre et du détecteur de radioactivité :

– *[1-$^{11}$C]acétate total* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale.

RADIOACTIVITÉ

Mesurez la radioactivité de la préparation à examiner à l'aide d'un appareillage approprié, en comparant avec une préparation étalon de fluor-18 ou en utilisant un appareil étalonné.

ÉTIQUETAGE

Les informations jointes spécifient la dose maximale recommandée en millilitres.

**01/2008:0279**
**corrigé 7.0**

# SODIUM (CHROMATE ($^{51}$Cr) DE), SOLUTION STÉRILE DE

## Natrii chromatis ($^{51}$Cr) solutio sterilis

DÉFINITION

Solution stérile de [$^{51}$Cr]chromate de sodium rendue isotonique par addition de chlorure de sodium.

*Chrome-51* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au chrome-51 à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Radioactivité spécifique* : au minimum 370 MBq de chrome-51 par milligramme d'ion chromate.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore ou légèrement jaune.

*Période et nature du rayonnement du chrome-51* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

   *Résultat* : l'énergie du photon gamma du chrome-51 est de 0,320 MeV.

B. Examinez le chromatogramme obtenu dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

   *Résultat* : le facteur de retardement du pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est d'environ 0,9.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 6,0 à 8,5.

**Chromate total** : au maximum 2,7 µg d'ion chromate ($CrO_4^{2-}$) par MBq.

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Solution témoin.* Solution de *chromate de potassium R* à 1,7 mg/L.

Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) des solutions au maximum d'absorption à 370 nm. Si nécessaire, ajustez à pH 8,0 la solution à examiner et la solution témoin avec de la *solution de bicarbonate de sodium R*. A partir des absorbances mesurées, calculez la teneur en chromate de la préparation à examiner.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Chrome-51**. Spectrométrie gamma.

*Résultat* : le spectre obtenu avec la préparation à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une préparation étalon de chrome-51.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**Ion [$^{51}$Cr]chromate**. Chromatographie ascendante sur papier (*2.2.26*).

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Papier* : *papier pour chromatographie R.*

*Phase mobile* : *ammoniaque R, éthanol à 96 pour cent R, eau R* (25:50:125 *V/V/V*).

*Dépôt* : une prise suffisante de la solution à examiner adaptée au procédé de détection.

*Développement* : immédiatement, pendant 2 h 1/2.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteur de retardement* : impureté A = 0,0 à 0,1 ; ion chromate = environ 0,9.

*Limite* :

– *ion [$^{51}$Cr]chromate* : au minimum 90 pour cent de la radioactivité totale due au chrome-51.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

IMPURETÉS

A. ion [$^{51}$Cr]chrome(III).

**01/2008:2100**

# SODIUM (FLUORURE ($^{18}$F) DE), SOLUTION INJECTABLE DE

## Natrii fluoridi ($^{18}$F) solutio iniectabilis

DÉFINITION

Solution stérile contenant du fluor-18 sous forme de fluorure de sodium. Elle peut contenir du fluorure entraîneur et un tampon approprié.

*Teneur* :

– *fluor-18* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au fluor-18 indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette,

– *fluorure* : au maximum 4,52 mg par dose maximale recommandée en millilitres.

PRODUCTION

Le radionucléide fluor-18 est généralement obtenu par irradiation protonique d'eau enrichie en oxygène-18. Le fluor-18 sous forme de fluorure est récupéré de l'eau cible, généralement par adsorption et désorption sur des résines échangeuses d'anions ou par dépôt électrochimique et redissolution.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du fluor-18* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

   *Résultats* : l'énergie de tous les photons gamma est de 0,511 MeV ; selon la géométrie de mesure, il peut apparaître un pic somme de 1,022 MeV.

B. La préparation à examiner satisfait à l'essai B de pureté radionucléidique (voir Essai).

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

   *Résultats* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, le pic dû au fluorure est négatif.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 5,0 à 8,5.

**Fluorure**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Solution témoin.* Dissolvez 10 mg de *fluorure de sodium R* dans de l'*eau R* et complétez à *V* avec le même solvant, *V* étant la dose maximale recommandée en millilitres.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4 mm,

– *phase stationnaire* : *résine échangeuse d'anions fortement basique pour chromatographie R* (10 µm),

– *température* : constante entre 20 °C et 30 °C.

Préparations radiopharmaceutiques

*Phase mobile* : solution d'*hydroxyde de sodium R* à 4 g/L, protégée du dioxyde de carbone de l'air.

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 220 nm et détecteur de radioactivité montés en série.

*Injection* : 20 μL.

*Enregistrement* : 15 min.

*Conformité du système* : examinez le chromatogramme de la solution témoin obtenu avec le spectrophotomètre :

– *rapport signal/bruit* : au minimum 10 pour le pic principal,

– *temps de rétention du fluorure* : au minimum 3 fois le « hold-up time ».

*Limite* : examinez le chromatogramme obtenu avec le spectrophotomètre :

– *fluorure* : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (4,52 mg/*V*).

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 175/*V* UI/mL, *V* étant la dose maximale recommandée en millilitres. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Fluor-18** : au minimum 99,9 pour cent de la radioactivité totale.

La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin des essais.

A. Spectrométrie gamma.

Déterminez la quantité de fluor-18 et d'impuretés radionucléidiques de période supérieure à 2 h. Pour la détection et la quantification des impuretés, retenez la préparation à examiner pendant une durée suffisante pour assurer la décroissance du fluor-18 jusqu'à un niveau permettant la détection des impuretés.

*Résultats* : le spectre obtenu avec la préparation à examiner ne diffère pas de manière significative d'un spectre correspondant au bruit de fond.

B. Période : 105 min à 115 min.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{18}$F]fluorure**. Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai du fluorure. Si nécessaire, diluez la solution à examiner avec de l'*eau R* pour obtenir une concentration de radioactivité appropriée pour le détecteur de radioactivité.

*Limite* : examinez le chromatogramme obtenu avec le détecteur de radioactivité :

– *[$^{18}$F]fluorure* : au minimum 98,5 pour cent de la radioactivité totale.

## RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique la dose maximale recommandée en millilitres.

**01/2008:0564**
**corrigé 7.0**

# SODIUM (IODOHIPPURATE ($^{123}$I) DE), SOLUTION INJECTABLE D'

## Natrii iodohippurati ($^{123}$I) solutio iniectabilis

## DÉFINITION

Solution stérile de (2-[$^{123}$I]iodobenzamido)acétate de sodium. La solution peut être additionnée d'un tampon approprié et d'un conservateur antimicrobien approprié tel que l'alcool benzylique.

*Iode-123* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due à l'iode-123 à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Radioactivité spécifique* : 0,74 GBq à 10,0 GBq d'iode-123 par gramme de 2-iodohippurate de sodium.

## CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement de l'iode-123* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

## IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma et X.

*Résultats* : l'énergie du photon gamma principal est de 0,159 MeV auquel s'ajoute un rayonnement X de 0,027 MeV.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultat* : la tache principale du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son facteur de retardement à la tache correspondant à l'acide 2-iodohippurique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

## ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 3,5 à 8,5.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Radionucléides autres que l'iode-123** : au maximum 0,35 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma et X.

Déterminez les quantités relatives d'iode-125, de tellure-121 et des autres impuretés radionucléidiques présentes. Pour leur détection, conservez la préparation à examiner pendant un temps suffisant pour que l'iode-123 puisse décroître jusqu'à un niveau résiduel permettant la détection des impuretés radionucléidiques. Enregistrez après décroissance le spectre des rayonnements gamma et X. Aucun radionucléide de période supérieure à celle de l'iode-125 n'est détecté.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**Acide 2-[$^{123}$I]iodohippurique**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 1 g d'*iodure de potassium R* dans 10 mL d'*eau R*. Ajoutez 1 volume de solution à 10 volumes de la préparation à examiner et utilisez dans les 10 min qui suivent la préparation du mélange. Si nécessaire, diluez avec la solution témoin (entraîneur) pour obtenir une concentration radioactive adaptée au procédé de détection, par exemple 3,7 MBq par millilitre.

Préparations radiopharmaceutiques

*Solution témoin (entraîneur).* Dissolvez 40 mg d'*acide 2-iodobenzoïque R* et 40 mg d'*acide 2-iodohippurique R* dans 4 mL d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 4 g/L. Ajoutez 10 mg d'*iodure de potassium R* et complétez à 10 mL avec de l'*eau R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $GF_{254}$ pour CCM R*.

*Phase mobile* : *eau R, acide acétique glacial R, butanol R, toluène R* (1:4:20:80 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL.

*Développement* : sur un parcours de 12 cm en environ 75 min.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm puis déterminez la répartition de la radioactivité à l'aide d'un détecteur approprié.

*Identification des taches* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente une tache correspondant à l'acide 2-iodohippurique et une tache correspondant à l'impureté D située plus près de la ligne du front des solvants ; l'impureté C reste près de la ligne de dépôt.

*Limites* :

- *acide 2-[[123]I]iodohippurique* : au minimum 96 pour cent de la radioactivité totale due à l'iode-123,
- *impureté C* : au maximum 2 pour cent de la radioactivité totale due à l'iode-123,
- *impureté D* : au maximum 2 pour cent de la radioactivité totale due à l'iode-123.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique que la préparation convient ou non aux études de la circulation plasmatique rénale.

IMPURETÉS

A. iode-125,

B. tellure-121,

C. [[123]I]iodure,

D. acide 2-[[123]I]iodobenzoïque.

**01/2008:0282**
**corrigé 7.0**

# SODIUM (IODOHIPPURATE ([131]I) DE), SOLUTION INJECTABLE D'

## Natrii iodohippurati ([131]I) solutio iniectabilis

DÉFINITION

Solution stérile de 2-(2-[[131]I]iodobenzamido)acétate de sodium. La solution peut être additionnée d'un tampon approprié et d'un conservateur antimicrobien convenable tel que l'alcool benzylique.

*Iode-131* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due à l'iode-131 indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Radioactivité spécifique* : 0,74 GBq à 7,4 GBq d'iode-131 par gramme de 2-iodohippurate de sodium.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement de l'iode-131* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultat* : l'énergie du photon gamma principal de l'iode-131 est de 0,365 MeV.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultat* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son facteur de retardement à la tache du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, correspondant à l'acide 2-iodohippurique.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 6,0 à 8,5.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Iode-131** : au minimum 99,9 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma.

Déterminez les quantités relatives d'iode-131, d'iode-133, d'iode-135 et des autres impuretés radionucléidiques présentes.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**Acide 2-[[131]I]iodohippurique**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 1 g d'*iodure de potassium R* dans 10 mL d'*eau R*. Ajoutez 1 volume de cette solution à 10 volumes de la préparation à examiner et utilisez au cours des 10 min qui suivent la préparation du mélange. Si nécessaire, diluez avec la solution témoin (entraîneur) pour obtenir une concentration radioactive adaptée au procédé de détection, par exemple 3,7 MBq/mL.

*Solution témoin* (entraîneur). Dissolvez 40 mg d'*acide 2-iodobenzoïque R* et 40 mg d'*acide 2-iodohippurique R* dans 4 mL d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 4 g/L. Ajoutez 10 mg d'*iodure de potassium R* et complétez à 10 mL avec de l'*eau R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $GF_{254}$ pour CCM R*.

*Phase mobile* : *eau R, acide acétique glacial R, butanol R, toluène R* (1:4:20:80 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL.

*Développement* : sur un parcours de 12 cm en environ 75 min.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : en lumière ultraviolette à 254 nm et avec un détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Identification des taches* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente une tache correspondant à l'acide 2-iodohippurique et une tache correspondant à l'impureté C située plus près de la ligne du front des solvants ; l'impureté D reste près de la ligne de dépôt.

*Limites* :

- *acide 2-[[131]I]iodohippurique* : au minimum 96 pour cent de la radioactivité totale due à l'iode-131,
- *impureté C* : au maximum 2 pour cent de la radioactivité totale due à l'iode-131,
- *impureté D* : au maximum 2 pour cent de la radioactivité totale due à l'iode-131.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique si la préparation convient ou non aux études de la circulation plasmatique rénale.

IMPURETÉS

A. iode-133,

B. iode-135,

C. acide 2-[$^{131}$I]iodobenzoïque,

D. [$^{131}$I]iodure.

**01/2008:2314**

# SODIUM (IODURE ($^{123}$I) DE) POUR RADIOMARQUAGE, SOLUTION D'

## Natrii iodidi ($^{123}$I) solutio ad radio-signandum

DÉFINITION

Solution fortement alcaline contenant de l'iode-123 sous forme d'iodure de sodium.

*Teneur* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due à l'iode-123 indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

PRODUCTION

L'iode-123 est obtenu par irradiation protonique de xénon hautement enrichi en xénon-124, suivie de la décroissance du xénon-123 formé directement et par la décroissance du césium-123. Il n'est pas ajouté d'iodure entraîneur ou d'agents réducteurs.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement de l'iode-123* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides*.

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultats* : l'énergie du photon gamma principal de l'iode-123 est de 0,159 MeV et ce photon est accompagné d'un rayonnement X principal de 0,027 MeV.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultats* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

ESSAI

**Alcalinité** (*2.2.4*). La solution est fortement alcaline.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Iode-123** : au minimum 99,7 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma.

Déterminez les quantités relatives d'iode-123, d'iode-125, de tellure-121 et des autres impuretés radionucléidiques présentes. Pour la détection du tellure-121 et de l'iode-125, conservez la préparation à examiner pendant un temps suffisant pour que l'iode-123 puisse décroître jusqu'à un niveau résiduel permettant la détection des impuretés radionucléidiques. Aucun radionucléide de période supérieure à celle de l'iode-125 n'est détecté.

La solution peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{123}$I]iodure**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Diluez la préparation à examiner avec un volume égal d'une solution contenant 1 g/L d'*iodure de potassium R*, 2 g/L d'*iodate de potassium R* et 10 g/L de *bicarbonate de sodium R* et mélangez. Si nécessaire, diluez au préalable la préparation à examiner avec une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 2 g/L pour s'assurer que la concentration de radioactivité du mélange final soit appropriée pour le détecteur de radioactivité.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 10 mg d'*iodure de potassium R* dans de l'*eau R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 20 mg d'*iodate de potassium R* dans de l'*eau R* et complétez à 10 mL avec le même solvant. Mélangez des volumes égaux de cette solution et de solution témoin (a).

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
– *température* : constante, entre 20 °C et 30 °C.

Utilisez des tubulures en acier inoxydable.

*Phase mobile* : dissolvez 5,85 g de *chlorure de sodium R* dans 1000 mL d'*eau R*, ajoutez 0,65 mL d'*octylamine R* et ajustez à pH 7,0 avec de l'*acide phosphorique dilué R* ; ajoutez 50 mL d'*acétonitrile R* et mélangez.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 220 nm et détecteur de radioactivité montés en série.

*Injection* : 20 µL.

*Enregistrement* : 12 min.

*Rétention relative* par rapport à l'iodure (temps de rétention = environ 5 min) : iodate = 0,2 à 0,3.

*Conformité du système* : solution témoin (b) :

– *résolution* : au minimum 2 entre les pics dus à l'iodure et à l'iodate dans le chromatogramme enregistré avec le spectrophotomètre.

Examinez le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner au moyen du détecteur de radioactivité et localisez le pic dû à l'iodure par comparaison avec le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) avec le spectrophotomètre.

*Limite* :

– *[$^{123}$I]iodure* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité en utilisant un appareil étalonné.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nom de tout excipient,
– que la solution ne convient pas pour une administration directe chez l'homme.

IMPURETÉS

A. iode-125,

B. tellure-121,

C. ion [$^{123}$I]iodate.

**01/2008:0563**

# SODIUM (IODURE ($^{123}$I) DE), SOLUTION INJECTABLE D'

## Natrii iodidi ($^{123}$I) solutio iniectabilis

DÉFINITION

Solution stérile contenant de l'iode-123 sous forme d'iodure de sodium ; la préparation peut contenir du thiosulfate de sodium ou un autre agent réducteur approprié, ainsi qu'un tampon adéquat.

*Teneur* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due à l'iode-123 indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

PRODUCTION

L'iode-123 est obtenu par irradiation protonique de xénon enrichi en xénon-124 (au minimum 98 pour cent), suivie de la décroissance du xénon-123 formé directement et de la décroissance du césium-123. Il n'est pas ajouté d'iodure entraîneur.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement de l'iode-123* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultats* : le spectre obtenu avec la préparation à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une solution étalon d'iode-123. L'énergie du photon gamma principal est de 0,159 MeV accompagné d'un rayonnement X principal de 0,027 MeV.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique.

*Résultats* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 7,0 à 10,0.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* Elle peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Iode-123** : au minimum 99,65 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma.

Déterminez les quantités relatives d'iode-123, d'iode-125, de tellure-121 et des autres impuretés radionucléidiques présentes. Pour la détection du tellure-121 et de l'iode-125, conservez la préparation à examiner pendant un temps suffisant pour que l'iode-123 puisse décroître jusqu'à un niveau résiduel permettant la détection des impuretés radionucléidiques. Aucun radionucléide de période supérieure à celle de l'iode-125 ne doit être détecté.

La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{123}$I]iodure**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Diluez la préparation à examiner avec une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 2 g/L jusqu'à obtention d'une concentration radioactive appropriée au détecteur. Ajoutez un volume égal d'une solution contenant 1 g/L d'*iodure de potassium R*, 2 g/L d'*iodate de potassium R* et 10 g/L de *bicarbonate de sodium R* et mélangez.

*Solution témoin (a).* Prélevez 1 mL d'une solution d'*iodure de potassium R* à 26,2 mg/L et complétez à 10 mL avec de l'*eau R*.

*Solution témoin (b).* Prélevez 1 mL d'une solution d'*iodate de potassium R* à 24,5 mg/L et complétez à 10 mL avec de l'*eau R*. Préparez un mélange à volumes égaux de cette solution et de solution témoin (a).

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
– *température* : constante entre 20 °C et 30 °C.

*Phase mobile* : dissolvez 5,85 g de *chlorure de sodium R* dans 1000 mL d'*eau R*, ajoutez 0,65 mL de *octylamine R* et ajustez à pH 7,0 avec de l'*acide phosphorique dilué R* ; ajoutez 50 mL d'*acétonitrile R* et mélangez.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 220 nm et détecteur de radioactivité montés en série.

*Injection* : 20 µL.

*Enregistrement* : 12 min.

*Rétention relative* par rapport à l'iodure (temps de rétention = environ 5 min) : iodate = 0,2 à 0,3.

*Conformité du système* : solution témoin (b) :

– *résolution* : au minimum 2 entre les pics dus à l'iodure et à l'iodate dans le chromatogramme enregistré au moyen du spectrophotomètre.

*Limite* : examinez le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner au moyen du détecteur de radioactivité et repérez le pic dû à l'iodure par comparaison avec le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) au moyen du spectrophotomètre :

– *[$^{123}$I]iodure* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique le nom de tout excipient.

IMPURETÉS

A. ion [$^{123}$I]iodate.

**01/2008:0938**

## SODIUM (IODURE ($^{131}$I) DE) À USAGE DIAGNOSTIQUE, CAPSULES D'

### Natrii iodidi ($^{131}$I) capsulae ad usum diagnosticum

DÉFINITION

Capsules à usage diagnostique contenant de l'iode-131 sous forme d'iodure de sodium sur un support solide ; elles peuvent également contenir du thiosulfate de sodium ou d'autres agents réducteurs convenables et peuvent contenir une substance tampon appropriée. Un emballage contient 1 ou plusieurs capsules.

*Teneur* :

– iode-131 : au maximum 37 MBq par capsule ; la radioactivité moyenne déterminée dans l'essai d'uniformité de teneur est de 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due à l'iode-131, indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette ;
– iodure : au maximum 20 µg par capsule.

PRODUCTION

L'iode-131 est obtenu par irradiation neutronique du tellure ou par extraction des produits de fission de l'uranium. Il n'est pas ajouté d'iodure entraîneur.

CARACTÈRES

*Période et nature du rayonnement de l'iode-131* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultats* : le spectre obtenu avec la préparation à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une solution étalon d'iode-131. L'énergie du photon gamma principal est de 0,365 MeV.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique.

*Résultats* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b) est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

ESSAI

**Désagrégation** : le contenu de la capsule se dissout complètement en 15 min.

Dans un petit vase à précipiter, chauffez dans un bain-marie à 37 °C environ 20 mL d'une solution d'*iodure de potassium R* à 2,0 g/L. Ajoutez 1 capsule à examiner. Agitez à l'aide d'un agitateur magnétique à une vitesse de 20 tr/min.

**Uniformité de teneur**. Utilisez au moins 10 capsules. Déterminez la radioactivité de chacune d'elles. Calculez la valeur moyenne de la radioactivité par capsule. Aucune des capsules ne présente d'activité s'écartant de plus de 10 pour cent de la valeur moyenne. L'écart type relatif n'est pas supérieur à 3,5 pour cent.

**Iodure**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner (a).* Dissolvez 1 capsule à examiner dans 10 mL d'*eau R*. Filtrez sur un filtre à pores de 0,2 µm.

*Solution à examiner (b).* Dissolvez 1 capsule à examiner dans de l'*eau R*. Filtrez à travers un filtre à pores de 0,2 µm et diluez le filtrat avec une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 2 g/L jusqu'à obtention d'une concentration en radioactivité appropriée pour le détecteur. Ajoutez un volume égal d'une solution contenant 1 g/L d'*iodure de potassium R*, 2 g/L d'*iodate de potassium R* et 10 g/L de *bicarbonate de sodium R* et mélangez.

*Solution témoin (a).* Prélevez 1 mL de solution d'*iodure de potassium R* à 26,2 mg/L et complétez à 10 mL avec de l'*eau R*.

*Solution témoin (b).* Prélevez 1 mL de solution d'*iodate de potassium R* à 24,5 mg/L et complétez à 10 mL avec de l'*eau R*. Mélangez à volumes égaux cette solution et la solution témoin (a).

*Solution à blanc.* Préparez une solution contenant 2 mg/mL de chacun des composants indiqués sur l'étiquette, à l'exception de l'iodure.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
– *température* : constante entre 20 °C et 30 °C.

*Phase mobile* : dissolvez 5,85 g de *chlorure de sodium R* dans 1000 mL d'*eau R*, ajoutez 0,65 mL de *octylamine R* et ajustez à pH 7,0 avec de l'*acide phosphorique dilué R* ; ajoutez 50 mL d'*acétonitrile R* puis mélangez.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 220 nm et détecteur de radioactivité montés en série.

*Injection* : 20 µL de solution à examiner (a), des solutions témoins (a) et (b) et de solution à blanc.

*Enregistrement* : 12 min.

*Rétention relative* par rapport à l'iodure (temps de rétention = environ 5 min) : iodate = 0,2 à 0,3.

*Conformité du système* :

– dans le chromatogramme obtenu avec la solution à blanc, aucun pic ne présente un temps de rétention semblable à celui du pic dû à l'iodure,
– *résolution* : au minimum 2 entre les pics dus à l'iodure et à l'iodate dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) enregistré avec le spectrophotomètre.

*Limite* : examinez les chromatogrammes obtenus avec le spectrophotomètre :

– *iodure* : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (20 µg/capsule).

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Iode-131** : au minimum 99,9 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma.

Déterminez les quantités relatives d'iode-131, d'iode-133, d'iode-135 et des autres impuretés radionucléidiques présentes.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{131}$I]iodure**. Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai de l'iodure avec les modifications suivantes.

*Injection* : 20 µL de solution à examiner (b) et de solution témoin (a).

*Limite* : examinez le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner au moyen du détecteur de radioactivité et localisez le pic dû à l'iodure par comparaison avec le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) au moyen du spectrophotomètre :

– *[$^{131}$I]iodure* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité de l'emballage à l'aide d'un appareil étalonné.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique le nom de tout excipient et le nombre de capsules dans l'emballage.

IMPURETÉS

A. ion [$^{131}$I]iodate.

**01/2008:2116**

# SODIUM (IODURE ($^{131}$I) DE) À USAGE THÉRAPEUTIQUE, CAPSULES D'

## Natrii iodidi ($^{131}$I) capsulae ad usum therapeuticum

DÉFINITION

Capsules à usage thérapeutique contenant de l'iode-131 sous forme d'iodure de sodium sur un support solide ; elles contiennent du thiosulfate de sodium ou d'autres agents réducteurs appropriés et une substance tampon appropriée.

*Teneur* :

– iode-131 : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette,
– iodure : au maximum 20 µg par capsule.

PRODUCTION

L'iode-131 est obtenu par irradiation neutronique du tellure ou par extraction des produits de fission de l'uranium. Il n'est pas ajouté d'iodure entraîneur.

CARACTÈRES

*Période et nature du rayonnement de l'iode-131* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultats* : le spectre obtenu avec la préparation à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une solution étalon d'iode-131. L'énergie du photon gamma principal de l'iode-131 est de 0,365 MeV.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique.

*Résultats* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b) est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

ESSAI

**Désagrégation** : le contenu de la capsule se dissout complètement en 15 min.

Dans un petit vase à précipiter, chauffez dans un bain-marie à 37 °C environ 20 mL d'une solution d'*iodure de potassium R* à 2,0 g/L. Ajoutez une capsule à examiner. Agitez à l'aide d'un agitateur magnétique à une vitesse de 20 tr/min.

**Iodure**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner (a).* Dissolvez une capsule à examiner dans 10 mL d'*eau R*. Filtrez sur un filtre à pores de 0,2 µm.

*Solution à examiner (b).* Dissolvez une capsule à examiner dans de l'*eau R*. Filtrez sur un filtre à pores de 0,2 µm et diluez le filtrat avec un volume égal d'une solution contenant 1 g/L d'*iodure de potassium R*, 2 g/L d'*iodate de potassium R* et 10 g/L de *bicarbonate de sodium R*. Si nécessaire, diluez d'abord le filtrat avec une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 2 g/L afin que le mélange final ait une concentration en radioactivité appropriée pour le détecteur de radioactivité.

*Solution témoin (a).* Prélevez 1,0 mL de solution d'*iodure de potassium R* à 26,2 mg/L et complétez à 10,0 mL avec de l'*eau R*.

*Solution témoin (b).* Prélevez 1 mL de solution d'*iodate de potassium R* à 24,5 mg/L et complétez à 10 mL avec de l'*eau R*. Mélangez des volumes égaux de cette solution et de solution témoin (a).

*Solution à blanc.* Préparez une solution contenant 2 mg/mL de chacun des excipients indiqués sur l'étiquette, à l'exception de l'iodure.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
– *température* : constante, entre 20 °C et 30 °C.

Utilisez des tubulures en acier inoxydable.

*Phase mobile* : dissolvez 5,85 g de *chlorure de sodium R* dans 1000 mL d'*eau R*, ajoutez 0,65 mL d'*octylamine R* et ajustez à pH 7,0 avec de l'*acide phosphorique dilué R* ; ajoutez 50 mL d'*acétonitrile R* puis mélangez.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 220 nm et détecteur de radioactivité montés en série.

*Injection* : 20 µL de solution à examiner (a), des solutions témoins (a) et (b) et de solution à blanc.

*Enregistrement* : 12 min.

*Rétention relative* par rapport à l'iodure (temps de rétention = environ 5 min) : iodate = 0,2 à 0,3.

*Conformité du système* :

– dans le chromatogramme obtenu avec la solution à blanc, aucun pic ne présente un temps de rétention semblable à celui du pic dû à l'iodure,
– *résolution* : au minimum 2 entre les pics dus à l'iodure et à l'iodate dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) en utilisant le spectrophotomètre.

*Limites* : examinez les chromatogrammes obtenus avec le spectrophotomètre ; localisez le pic dû à l'iodure à l'aide du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) :

– *iodure* : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (20 µg/capsule).

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Iode-131** : au minimum 99,9 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma.

Déterminez les quantités relatives d'iode-130, d'iode-131, d'iode-133, d'iode-135 et des autres impuretés radionucléidiques présentes.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{131}$I]iodure**. Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai de l'iodure avec les modifications suivantes.

*Injection* : 20 µL de solution à examiner (b) et de solution témoin (a).

*Limites* : examinez le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b) en utilisant le détecteur de radioactivité et localisez le pic dû à l'iodure à l'aide du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) en utilisant le spectrophotomètre :

– *[$^{131}$I]iodure* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité de chaque capsule à l'aide d'un appareil étalonné.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique le nom de tout excipient.

IMPURETÉS

A. ion [$^{131}$I]iodate,

B. iode-130,

C. iode-133,

D. iode-135.

**01/2008:2121**

# SODIUM (IODURE ($^{131}$I) DE) POUR RADIOMARQUAGE, SOLUTION D'

## Natrii iodidi ($^{131}$I) solutio ad radio-signandum

DÉFINITION

Solution fortement alcaline contenant de l'iode-131 sous forme d'iodure de sodium. Elle ne contient pas d'agent réducteur.

*Teneur* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due à l'iode-131 indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

PRODUCTION

L'iode-131 est obtenu par irradiation neutronique du tellure ou par extraction des produits de fission de l'uranium. Il n'est pas ajouté d'iodure entraîneur.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement de l'iode-131* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultats* : le spectre obtenu avec la solution à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une solution étalon d'iode-131. L'énergie du photon gamma principal de l'iode-131 est de 0,365 MeV.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultats* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

ESSAI

**Alcalinité** (*2.2.4*). La préparation est fortement alcaline.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Iode-131** : au minimum 99,9 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma.

Déterminez les quantités relatives d'iode-130, d'iode-131, d'iode-133, d'iode-135 et des autres impuretés radionucléidiques présentes.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{131}$I]iodure**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Diluez la préparation à examiner avec un volume égal d'une solution contenant 1 g/L d'*iodure de potassium R*, 2 g/L d'*iodate de potassium R* et 10 g/L de *bicarbonate de sodium R* et mélangez. Si nécessaire, diluez au préalable la préparation à examiner avec une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 2 g/L pour s'assurer que la concentration de radioactivité du mélange final soit approprié pour le détecteur de la radioactivité.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 10 mg d'*iodure de potassium R* dans de l'*eau R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 20 mg d'*iodate de potassium R* dans de l'*eau R* et complétez à 10 mL avec le même solvant. Mélangez des volumes égaux de cette solution et de solution témoin (a).

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
– *température* : constante, entre 20 °C et 30 °C.

Utilisez des tubulures en acier inoxydable.

*Phase mobile* : dissolvez 5,85 g de *chlorure de sodium R* dans 1000 mL d'*eau R*, ajoutez 0,65 mL d'*octylamine R* et ajustez à pH 7,0 avec de l'*acide phosphorique dilué R* ; ajoutez 50 mL d'*acétonitrile R* puis mélangez.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 220 nm et détecteur de radioactivité montés en série.

*Injection* : 20 µL.

*Enregistrement* : 12 min.

*Rétention relative* par rapport à l'iodure (temps de rétention = environ 5 min) : iodate = 0,2 à 0,3.

*Conformité du système* : solution témoin (b) :

– *résolution* : au minimum 2 entre les pics dus à l'iodure et à l'iodate dans le chromatogramme enregistré avec le spectrophotomètre.

*Limite* : examinez le chromatogramme obtenu avec le détecteur de radioactivité :

– *[$^{131}$I]iodure* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– la méthode de production de l'iode-131,
– le nom de tout excipient,
– que la préparation ne convient pas pour un usage direct chez l'homme.

IMPURETÉS

A. ion [$^{131}$I]iodate.

**01/2008:0281**

# SODIUM (IODURE ($^{131}$I) DE), SOLUTION D'

## Natrii iodidi ($^{131}$I) solutio

DÉFINITION

Solution contenant de l'iode-131 sous forme d'iodure de sodium et également du thiosulfate de sodium ou un autre agent réducteur approprié. Un tampon approprié peut être ajouté à la préparation.

*Teneur* :

– *iode-131* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette,
– *iodure* : au maximum 20 µg dans la dose maximale recommandée en millilitres.

PRODUCTION

L'iode-131 est un isotope radioactif de l'iode. Il peut être obtenu par irradiation neutronique du tellure ou par extraction des produits de fission de l'uranium. Il n'a pas été ajouté d'iodure entraîneur.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement de l'iode-131* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultats* : le spectre obtenu avec la préparation à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une solution étalon d'iode-131. L'énergie du photon gamma principal est de 0,365 MeV.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de l'iodure.

*Résultats* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a) est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 7,0 à 10,0.

**Stérilité**. La solution d'iodure ($^{131}$I) de sodium destinée à une administration parentérale satisfait également à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Iodure**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner (a).* La préparation à examiner.

*Solution à examiner (b).* Diluez la préparation à examiner avec de l'*hydroxyde de sodium 0,05 M* jusqu'à ce que la radioactivité corresponde à environ 74 MBq/mL. Ajoutez un volume égal d'une solution contenant 1 g/L d'*iodure de potassium R,* 2 g/L d'*iodate de potassium R* et 10 g/L de *bicarbonate de sodium R,* puis mélangez.

*Solution témoin (a).* Prélevez 1 mL d'une solution d'*iodure de potassium R* à 26,2 mg/L et complétez à $V$ avec de l'*eau R, V* étant la dose maximale recommandée en millilitres.

*Solution témoin (b).* Prélevez 1 mL d'une solution d'*iodate de potassium R* à 24,5 mg/L et complétez à $V$ avec de l'*eau R, V* étant la dose maximale recommandée en millilitres. Mélangez des volumes égaux de cette solution et de la solution témoin (a).

*Solution à blanc.* Préparez une solution contenant 2 mg/mL de chaque composé indiqué sur l'étiquette à l'exception de l'iodure.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
– *température* : maintenez à une température constante entre 20 °C et 30 °C.

Utilisez des tubulures en acier inoxydable.

*Phase mobile* : dissolvez 5,844 g de *chlorure de sodium R* dans 1000 mL d'*eau R*, ajoutez 650 µL d'*octylamine R* et ajustez à pH 7,0 avec de l'*acide phosphorique R* ; ajoutez 50 mL d'*acétonitrile R* et mélangez.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 220 nm et détecteur de radioactivité montés en série.

*Injection* : 25 µL ; injectez la solution à examiner (a), la solution à blanc et les solutions témoins (a) et (b).

*Enregistrement* : 12 min.

*Rétention relative* par rapport à l'iodure (temps de rétention = environ 5 min) : iodate = 0,2 à 0,3.

*Conformité du système* :

– dans le chromatogramme obtenu avec la solution à blanc, aucun pic ne présente un temps de rétention similaire à celui du pic dû à l'iodure,
– *résolution* : au minimum 2 entre les pics dus à l'iodure et à l'iodate dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) enregistré avec le spectrophotomètre.

*Limite* : examinez le chromatogramme obtenu avec le spectrophotomètre ; localisez le pic dû à l'iodure par comparaison avec le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) :

– *iodure* : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Iode-131** : au minimum 99,9 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma.

Déterminez les quantités relatives d'iode-131, d'iode-133, d'iode-135 et des autres impuretés radionucléidiques présentes.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{131}$I]Iodure**. Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai de l'iodure avec la modification suivante.

*Injection* : solution à examiner (b).

*Limite* : examinez le chromatogramme obtenu avec le détecteur de radioactivité :

– *[$^{131}$I]iodure* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale.

## RADIOACTIVITÉ

Mesurez la radioactivité de la préparation à examiner à l'aide d'un appareillage approprié, en comparant avec une solution étalon d'iode-131 ou en utilisant un appareil étalonné.

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le nom de tout excipient,
– la dose maximale recommandée, en millilitres,
– dans les cas appropriés, que la préparation convient à la fabrication de préparations parentérales.

## IMPURETÉS

A. ion [$^{131}$I]iodate.

Préparations radiopharmaceutiques

**01/2008:1923**

# SODIUM (MOLYBDATE ($^{99}$Mo) DE, OBTENU PAR FISSION), SOLUTION DE

## Natrii molybdatis ($^{99}$Mo) fissione formati solutio

## DÉFINITION

Solution alcaline de [$^{99}$Mo]molybdate de sodium obtenue par extraction des produits de fission de l'uranium-235. Elle peut contenir des stabilisants.

*Teneur* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au molybdène-99 indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

## PRODUCTION

Le molybdène-99 est généralement produit lors de la fission d'uranium enrichi en uranium-235 causée par l'absorption d'un neutron thermique qui permet d'obtenir une activité spécifique élevée du molybdène-99. La fission de l'uranium après capture des neutrons entraîne la production de plus de 200 radionucléides différents ; le molybdène-99 se forme à partir d'environ 6 pour cent des fissions, après décroissance d'un certain nombre de radionucléides parents à période courte. Après dissolution de la cible, le molybdène-99 est séparé du mélange de nucléides et purifié par des procédés chromatographiques afin d'obtenir du molybdène-99 à un niveau élevé de pureté radionucléidique.

## CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore ou presque incolore.

*Période et nature du rayonnement du molybdène-99* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

## IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultats* : l'énergie du photon gamma principal du molybdène-99 est de 0,740 MeV, un pic de 0,141 MeV dû au technétium-99m est également visible.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultats* : la tache principale du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner a le même facteur de retardement que la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

## ESSAI

**Solution S**. Diluez la préparation à examiner à une concentration d'environ 370 MBq/mL avec une solution de *molybdate de sodium R* à 2,42 g/L. Utilisez la solution au minimum 6 h après la séparation du molybdène-99.

**Alcalinité**. La préparation est alcaline (*2.2.4*).

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Iode-131, ruthénium-103 et tellure-132** :

– *iode-131* : au maximum $5 \times 10^{-3}$ pour cent de la radioactivité totale,
– *ruthénium-103* : au maximum $5 \times 10^{-3}$ pour cent de la radioactivité totale,
– *tellure-132* : au maximum $5 \times 10^{-3}$ pour cent de la radioactivité totale.

La méthode décrite ci-après s'est avérée satisfaisante ; d'autres méthodes validées, approuvées par l'Autorité compétente, peuvent être utilisées.

Spectrométrie gamma.

Conditionnez une colonne d'environ 1,5 mL de volume intérieur, remplie de *résine échangeuse d'ions fortement basique R* avec un mélange à volumes égaux d'*acide acétique glacial R* et d'*eau R*. Toutes les élutions de la colonne sont effectuées à un débit ne dépassant pas 1 mL/min.

*Solution à examiner.* Dans un tube à essai, ajoutez successivement, en mélangeant, 1 mL de solution de *molybdate de sodium R* à 24,2 g/L, 0,5 mL de *solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R*, 2,5 mL d'*acide acétique glacial R*, 1,0 mL de *solution dopante d'iode-123 et de ruthénium-106 R* et 1,0 mL de solution S. Laissez reposer pendant 30 min à température ambiante.

*Solution témoin.* Mélangez 1,0 mL de *solution dopante d'iode-123 et de ruthénium-106 R* et 4,0 mL d'*eau R*.

Déposez la solution à examiner sur la colonne et éluez. Immédiatement, avant que le liquide ne disparaisse du haut de la colonne, déposez un volume supplémentaire de 6 mL d'un mélange à volumes égaux d'*acide acétique glacial R* et d'*eau R* et éluez. Transférez 5,0 mL des éluats combinés dans un tube de comptage. Déterminez la radioactivité de l'iode-123, de l'iode-131, du ruthénium-103, du ruthénium-106 et de l'iode-132 aux énergies de rayonnement gamma de 0,159 MeV pour l'iode-123, 0,365 MeV pour l'iode-131, 0,497 MeV pour le ruthénium-103, 0,512 MeV pour le ruthénium-106 et 0,668 MeV pour l'iode-132. Déterminez de la même façon la radioactivité de l'iode-123 et du ruthénium-106 dans la solution témoin et calculez le taux de récupération de l'iode-123 et du ruthénium-106 dans les éluats combinés.

Calculez la radioactivité de l'iode-131, de l'iode-132 et du ruthénium-103 dans les éluats combinés, en tenant compte du taux de récupération, de la fraction d'éluat utilisée, de l'efficacité du comptage et de la décroissance radioactive. A partir de la radioactivité de l'iode-132 (radionucléide de filiation du tellure-132), calculez la radioactivité du tellure-132, en tenant compte du moment de l'essai et du moment de la séparation du molybdène-99.

**Radioactivité totale due au strontium-89 et au strontium-90** : au maximum $6 \times 10^{-5}$ pour cent de la radioactivité totale.

La méthode décrite ci-après s'est avérée satisfaisante ; d'autres méthodes validées, approuvées par l'Autorité compétente, peuvent être utilisées.

Spectrométrie à scintillation liquide.

Connectez en série 2 colonnes d'environ 1,5 mL de volume intérieur et remplies de *résine échangeuse d'ions fortement basique R* et conditionnez les colonnes avec 10 mL d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 4 g/L. Toutes les élutions de la colonne sont effectuées à un débit ne dépassant pas 1 mL/min.

*Solution à examiner.* Dans un tube à essai, introduisez successivement, en mélangeant, 1,0 mL de solution S, 50 µL de *solution dopante de strontium-85 R* et 0,05 mL de *solution concentrée d'hypochlorite de sodium R*. Laissez reposer pendant 10 min à température ambiante.

*Solution témoin.* Mélangez 50 µL de *solution dopante de strontium-85 R* et 5,0 mL d'une solution d'*acide nitrique R* à 9,5 g/L dans un flacon pour comptage par scintillation liquide et ajoutez 10 mL de *liquide scintillant R*.

Déposez la solution à examiner sur la colonne supérieure des 2 colonnes et éluez. Immédiatement avant que le liquide ne disparaisse du haut de la colonne supérieure, déposez un volume supplémentaire de 3 mL d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 4 g/L et éluez jusqu'à ce que les colonnes soient sèches. Combinez les éluats et ajoutez 4 mL d'une solution d'*acide nitrique R* à 947 g/L (éluat pauvre en molybdène). Déterminez la radioactivité due au molybdène-99 par spectrométrie gamma. Si la radioactivité due au molybdène-99 est supérieure à $6 \times 10^{-7}$ pour cent de la radioactivité due au molybdène-99 dans 1 mL de solution S, répétez la procédure décrite ci-dessus en utilisant 2 nouvelles colonnes.

Préparez une colonne d'environ 2 mL de volume intérieur remplie de *résine d'extraction sélective du strontium R* avec 5 mL d'une solution d'*acide nitrique R* à 473 g/L et séchez la colonne. Toutes les élutions de la colonne sont effectuées à un débit ne dépassant pas 1 mL/min. Déposez l'éluat pauvre en molybdène sur la colonne et éluez. Immédiatement avant que le liquide ne disparaisse du haut de la colonne, déposez un volume supplémentaire de 20 mL d'une solution d'*acide nitrique R* à 473 g/L et éluez jusqu'à ce que la colonne soit sèche. Lavez la colonne avec 2 mL d'une solution d'*acide nitrique R* à 9,5 g/L, séchez la colonne et rejetez l'éluat. Déposez 8,0 mL d'une solution d'*acide nitrique R* à 9,5 g/L sur la colonne et éluez jusqu'à ce que la colonne soit sèche. Transférez 5,0 mL d'éluat dans un flacon pour comptage par scintillation liquide et ajoutez 10 mL de *liquide de scintillation R*.

Déterminez la radioactivité totale due au strontium-89 et au strontium-90 dans cette solution par spectrométrie à scintillation liquide et la radioactivité due au strontium-85 par spectrométrie gamma. Déterminez la radioactivité due au strontium-85 dans la solution témoin par spectrométrie gamma. Calculez le taux de récupération du strontium-85 dans l'éluat. Calculez la radioactivité totale mesurée du strontium-89 et du strontium-90 dans l'éluat en tenant compte du taux de récupération du strontium et de la fraction d'éluat utilisée.

**Radioactivité totale due aux émetteurs de particules alpha** : au maximum $1 \times 10^{-7}$ pour cent de la radioactivité totale.

La méthode décrite ci-après s'est avérée satisfaisante ; d'autres méthodes validées, approuvées par l'Autorité compétente, peuvent être utilisées.

Spectrométrie alpha.

*Solution à examiner.* A 0,2 mL de la préparation à examiner, ajoutez 1,0 mL de *solution dopante de plutonium-242 R*, 1,0 mL de *solution dopante d'américium-243 R* et 9,0 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 927 g/L. Evaporez l'échantillon à siccité. Dissolvez le résidu dans 2 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 927 g/L. Evaporez à nouveau à siccité. Dissolvez le résidu dans 2 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 10,3 g/L.

Déposez la solution à examiner sur une colonne contenant 0,7 g de *résine échangeuse d'anions R1*. Recueillez l'éluat et lavez la colonne avec 1 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 10,3 g/L. Evaporez les éluats combinés à siccité et dissolvez le résidu dans 2 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 10,3 g/L. Déposez cette solution sur une 2^e^ colonne contenant 0,7 g de *résine échangeuse d'anions R1*. Recueillez l'éluat et lavez la colonne avec 1 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 10,3 g/L. Evaporez les éluats combinés à siccité et dissolvez le résidu dans 1 mL d'*acide nitrique R*. Evaporez à siccité. Dissolvez à nouveau le résidu dans 1 mL d'*acide nitrique R* et évaporez à siccité.

Ajoutez 1 mL d'une solution de *sulfate de sodium anhydre R* à 42,6 g/L et évaporez à siccité. Ajoutez 0,3 mL d'*acide sulfurique R*. Chauffez légèrement jusqu'à dissolution du résidu. Ajoutez 4 mL d'*eau distillée R* et 0,01 mL de solution de *bleu de bromothymol R*. Ajoutez de l'*ammoniaque concentrée R* goutte à goutte jusqu'au virage de la couleur du rouge au jaune.

Préparez une cellule d'électrodéposition comme décrit ci-après. Une plaquette d'acier inoxydable traitée par électropolissage est placée sur la fermeture d'un flacon comptage par pour scintillation de polyéthylène de 20 mL. Le fond du flacon a été découpé et la fermeture perforée au centre afin d'établir la connexion électrique avec la plaquette qui forme la cathode. La plaquette, d'un diamètre de 20 mm et d'une épaisseur de 0,5 m, est rincée à l'aide d'*acétone R* et d'*eau R* avant l'emploi. L'anode, constituée d'une spirale de platine, est introduite via le fond du flacon et placée à 5 mm de la cathode.

Versez la solution, préparée comme décrit ci-dessus, dans la cellule d'électrodéposition et rincez le récipient avec un total de 5 mL d'une solution d'*acide sulfurique R* à 10 g/L (la solution devient légèrement rose). Ajustez à pH 2,1-2,4

avec de l'*ammoniaque concentrée R* ou une solution d'*acide sulfurique R* à 200 g/L. Procédez à l'électrolyse sans agitation à une intensité de courant de 1,2 A pendant 75 min.

Ajoutez 1 mL d'*ammoniaque concentrée R* 1 min environ avant l'arrêt du courant. Rincez la plaquette à l'aide d'une solution d'*ammoniaque R* à 57 g/L. Rincez la plaquette à l'aide d'*acétone R* puis enlevez le surplus de solvant à l'aide de papier absorbant. Placez la plaquette sur une plaque chauffante à 180 °C pendant 10 min.

Déterminez la radioactivité des émetteurs alpha par spectrométrie alpha, en tenant compte du taux de récupération des radionucléides émetteurs de particules alpha (mesuré à l'aide de solutions dopantes de plutonium-242 et d'américium-243).

**Radionucléides émetteurs de rayonnements gamma totaux autres que le molybdène-99, le technétium-99m, l'iode-131, le ruthénium-103 et le tellure-132** : au maximum $1 \times 10^{-2}$ pour cent de la radioactivité totale.

La méthode décrite ci-après s'est avérée satisfaisante ; d'autres méthodes validées, approuvées par l'Autorité compétente, peuvent être utilisées.

Spectrométrie gamma.

Laissez décroître la préparation pendant 4-6 semaines. Examinez le spectre gamma pour déceler la présence d'autres émetteurs de rayonnements gamma. Identifiez et quantifiez les autres émetteurs de rayonnements gamma. La préparation peut être libérée avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{99}$Mo]Molybdate**

La méthode décrite ci-après s'est avérée satisfaisante ; d'autres méthodes validées, approuvées par l'Autorité compétente, peuvent être utilisées.

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Diluez la préparation à examiner avec une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 4,0 g/L pour obtenir une concentration radioactive appropriée pour le détecteur.

*Solution témoin* : solution de *molybdate de sodium R* à 50 g/L dans une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 4,0 g/L.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : solution de *carbonate de sodium anhydre R* à 10,6 g/L.

*Dépôt* : 5 µL de solution à examiner et 2 µL de solution témoin.

*Développement* : sur les 2/3 de la plaque.

*Séchage* : dans un courant d'air chaud.

*Détection* : déterminez la répartition de la radioactivité à l'aide d'un détecteur approprié et pulvérisez une solution de *phénylhydrazine R* à 2 g/L dans de l'*acide acétique glacial R*. Chauffez à 100-105 °C pendant 5 min.

*Facteur de retardement* : molybdate et pertechnetate = environ 0,9.

*Limite* :

– *somme du [$^{99}$Mo]molybdate et du [$^{99m}$Tc]pertechnetate* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité en utilisant un instrument étalonné.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique que l'usage de la solution est réservé à la préparation des générateurs de technétium-99m.

IMPURETÉS

A. iode-131,

B. ruthénium-103,

C. tellure-132,

D. strontium-89,

E. strontium-90.

Préparations radiopharmaceutiques

**01/2008:0283**
**corrigé 7.0**

# SODIUM (PERTECHNÉTATE ($^{99m}$Tc) DE, NON OBTENU PAR FISSION), SOLUTION INJECTABLE DE

## Natrii pertechnetatis ($^{99m}$Tc) sine fissione formati solutio iniectabilis

*Cette monographie ne concerne que la solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu à partir du molybdène-99 produit par irradiation neutronique du molybdène. La solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu à partir du molybdène-99 extrait des produits de fission de l'uranium est décrite dans la monographie Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu par fission (0124).*

DÉFINITION

Solution stérile contenant du technétium-99m sous forme d'ion pertechnétate, rendue isotonique par addition de chlorure de sodium.

*Technétium-99m* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du technétium-99m* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultat* : l'énergie du photon gamma principal du technétium-99m est de 0,141 MeV.

B. Examinez le chromatogramme obtenu dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultat* : le facteur de retardement du pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est d'environ 0,6.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 4,0 à 8,0.

**Aluminium** : au maximum 5 ppm.

*Solution à examiner.* Diluez la préparation à examiner au 1/2,5 avec de l'*eau R*. Dans un tube à essai d'un diamètre intérieur d'environ 12 mm, introduisez 1 mL de *solution tampon acétate pH 4,6 R* et 2 mL de la dilution. Ajoutez 0,05 mL d'une solution de *chromazurol S R* à 10 g/L.

*Solution témoin.* Préparez simultanément dans les mêmes conditions que la solution à examiner et avec 2 mL de *solution à 2 ppm d'aluminium (Al) R*.

Après 3 min, la solution à examiner n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

*Essai préliminaire.* Il permet d'obtenir une estimation approximative avant l'utilisation de la préparation. Enregistrez le spectre des rayonnements gamma sur un volume de la solution correspondant à 37 MBq à l'aide d'un détecteur à iodure de sodium en interposant, entre l'échantillon et le détecteur, un écran de plomb d'une épaisseur de 6 mm. La réponse dans la région correspondant au photon de 0,740 MeV

du molybdène-99 ne dépasse pas la réponse obtenue avec 37 kBq d'une préparation étalon de molybdène-99 mesurée dans les mêmes conditions, toutes les mesures étant rapportées à la date et à l'heure de l'administration.

*Essai définitif.* Conservez un échantillon de la préparation à examiner assez longtemps pour que la radioactivité du technétium-99m décroisse suffisamment et permette de déceler les impuretés radionucléidiques. Toutes les mesures de la radioactivité sont rapportées à la date et à l'heure d'administration.

– *Impureté A* : au maximum 0,1 pour cent de la radioactivité totale.

  Spectrométrie gamma. *Enregistrez le spectre des rayonnements gamma de l'échantillon à examiner.*

  *Comparaison* : préparation étalon de molybdène-99.

  *Résultats* : les énergies des photons les plus caractéristiques sont respectivement de 0,181 MeV, 0,740 MeV et 0,778 MeV ; le molybdène-99 a une période de 66,0 h.

– *Autres émetteurs de rayonnement gamma* : au maximum 0,01 pour cent de la radioactivité totale.

  Spectrométrie gamma. Enregistrez le spectre des rayonnements gamma de l'échantillon à examiner pour rechercher la présence éventuelle d'autres impuretés radionucléidiques dont l'identification et la mesure devraient, si possible, être effectuées.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**Ion [$^{99m}$Tc]pertechnétate**. Chromatographie descendante sur papier (*2.2.26*).

*Solution à examiner.* Diluez la préparation à examiner dans de l'*eau R* pour obtenir une concentration radioactive appropriée.

*Papier* : *papier pour chromatographie R.*

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R* (20:80 *V/V*).

*Dépôt* : 5 μL.

*Développement* : pendant 2 h.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteur de retardement* : ion [$^{99m}$Tc]pertechnétate = environ 0,6.

*Limite* :

– *ion [$^{99m}$Tc]pertechnétate* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale due au technétium-99m.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

IMPURETÉS

A. molybdène-99.

**01/2008:0124**
**corrigé 7.0**

# SODIUM (PERTECHNÉTATE ($^{99m}$Tc) DE, OBTENU PAR FISSION), SOLUTION INJECTABLE DE

## Natrii pertechnetatis ($^{99m}$Tc) fissione formati solutio iniectabilis

*Cette monographie ne concerne que la solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu à partir du molybdène-99 extrait des produits de fission de l'uranium. La solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu à partir du molybdène-99 produit par irradiation neutronique du molybdène est décrite dans la monographie Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium non obtenu par fission (0283).*

DÉFINITION

Solution stérile contenant du technétium-99m sous forme d'ion pertechnétate, rendue isotonique par addition de chlorure de sodium. La solution injectable peut être préparée à partir d'une préparation stérile de molybdène-99 dans des conditions aseptiques.

*Technétium-99m* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du technétium-99m* :voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

Spectrométrie gamma.

*Résultat* : l'énergie du photon gamma principal du technétium-99m est de 0,141 MeV.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 4,0 à 8,0.

**Aluminium** : au maximum 5 ppm.

*Solution à examiner.* Diluez la préparation à examiner au 1/2,5 avec de l'*eau R*. Dans un tube à essai d'un diamètre intérieur d'environ 12 mm, introduisez 1 mL de *solution tampon acétate pH 4,6 R* et 2 mL de la dilution. Ajoutez 0,05 mL d'une solution de *chromazurol S R* à 10 g/L.

*Solution témoin.* Préparez simultanément dans les mêmes conditions que la solution à examiner et avec 2 mL de *solution à 2 ppm d'aluminium (Al) R.*

Après 3 min, la solution à examiner n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

*Essai préliminaire.* Pour obtenir une estimation approximative avant l'utilisation de la préparation, enregistrez le spectre des rayonnements gamma sur un volume correspondant à 37 MBq de la préparation à examiner à l'aide d'un détecteur à iodure de sodium en interposant entre l'échantillon et le détecteur un écran de plomb d'une épaisseur de 6 mm. La réponse dans la région correspondant au photon de 0,740 MeV du molybdène-99 ne dépasse pas celle obtenue avec 37 kBq d'une préparation étalon de molybdène-99 mesurée dans les mêmes conditions, toutes les mesures étant rapportées à la date et à l'heure de l'administration.

*Essai définitif.* Conservez un échantillon de la préparation à examiner assez longtemps pour que la radioactivité du technétium-99m décroisse suffisamment et permette de déceler les impuretés radionucléidiques. Toutes les mesures de la radioactivité sont rapportées à la date et à l'heure de l'administration.

– *Impureté A* : au maximum $5 \times 10^{-3}$ pour cent de la radioactivité totale.

  Spectrométrie gamma. *Enregistrez le spectre de l'échantillon à examiner.*

  *Comparaison* : appareil approprié étalonné avec une préparation étalon d'iode-131.

  *Résultats* : l'énergie du photon le plus caractéristique est de 0,365 MeV ; l'iode-131 a une période de 8,04 jours.

– *Impureté B* : au maximum 0,1 pour cent de la radioactivité totale.

  Spectrométrie gamma. *Enregistrez le spectre de l'échantillon à examiner.*

  *Comparaison* : appareil approprié étalonné avec une préparation étalon de molybdène-99.

  *Résultats* : les énergies des photons les plus caractéristiques sont respectivement de 0,181 MeV, 0,740 MeV et 0,778 MeV ; le molybdène-99 a une période de 66,0 h.

– *Impureté C* : au maximum $5 \times 10^{-3}$ pour cent de la radioactivité totale.

  Spectrométrie gamma. *Enregistrez le spectre de l'échantillon à examiner.*

  *Comparaison* : appareil approprié étalonné avec une préparation étalon de ruthénium-103.

  *Résultats* : l'énergie du photon le plus caractéristique est de 0,497 MeV ; le ruthénium-103 a une période de 39,3 jours.

– *Impureté D* : au maximum $6 \times 10^{-5}$ pour cent de la radioactivité totale.

  Déterminez la présence du strontium-89 dans l'échantillon à examiner à l'aide d'un appareil approprié à la détection des rayonnements bêta. Cet essai nécessite généralement une séparation chimique préalable du strontium qui permet d'obtenir sous une même forme physique et chimique l'étalon et l'échantillon.

  *Comparaison* : préparation étalon de strontium-89.

  *Résultats* : le strontium-89 décroît en émettant un rayonnement bêta dont l'énergie maximale est de 1,492 MeV ; il a une période de 50,5 jours.

– *Impureté E* : au maximum $6 \times 10^{-6}$ pour cent de la radioactivité totale.

  Déterminez la présence du strontium-90 dans l'échantillon à examiner à l'aide d'un appareil approprié à la détection des rayonnements bêta. La comparaison de la radioactivité due à l'yttrium-90, nucléide de filiation du strontium-90, et celle d'une préparation étalon d'yttrium-90, permet de distinguer le strontium-89 du strontium-90, après séparation chimique de l'yttrium. Si une séparation chimique préalable du strontium s'avère nécessaire, veillez à respecter les conditions d'équilibre radioactif et à utiliser un étalon et un échantillon se présentant sous la même forme physique et chimique.

  *Résultats* : le strontium-90 et l'yttrium-90 décroissent en émettant un rayonnement bêta dont l'énergie maximale est respectivement de 0,546 MeV et de 2,284 MeV ; ils ont une période de 29,1 années et de 64,0 h respectivement.

– *Autres émetteurs de rayonnements gamma* : au maximum 0,01 pour cent de la radioactivité totale.

  Spectrométrie gamma.

  Enregistrez le spectre de l'échantillon à examiner pour rechercher la présence éventuelle d'autres impuretés radionucléidiques dont l'identification et la mesure devraient, si possible, être effectuées.

– *Emetteurs de rayonnements alpha* : au maximum $1 \times 10^{-7}$ pour cent de la radioactivité totale.

  Enregistrez la radioactivité alpha de l'échantillon à examiner pour rechercher la présence éventuelle d'impuretés radionucléidiques, émetteurs de rayonnement alpha dont l'identification et la mesure devraient, si possible, être effectuées.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**Ion [$^{99m}$Tc]pertechnétate**. Chromatographie descendante sur papier (*2.2.26*).

*Solution à examiner.* Diluez la préparation à examiner avec de l'*eau R* pour obtenir une concentration radioactive appropriée.

*Papier* : *papier pour chromatographie R.*

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R* (20:80 *V/V*).

*Dépôt* : 5 µL.

*Développement* : pendant 2 h.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteur de retardement* : ion [$^{99m}$Tc]pertechnétate = environ 0,6.

*Limite* :

– *ion [$^{99m}$Tc]pertechnétate* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale due au technétium-99m.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

IMPURETÉS

A. iode-131,

B. molybdène-99,

C. ruthénium-103,

D. strontium-89,

E. strontium-90.

**01/2008:0284**
**corrigé 7.0**

# SODIUM (PHOSPHATE ($^{32}$P) DE), SOLUTION INJECTABLE DE

## Natrii phosphatis ($^{32}$P) solutio iniectabilis

DÉFINITION

Solution stérile d'orthophosphates ($^{32}$P) disodique et monosodique, rendue isotonique par addition de chlorure de sodium.

*Phosphore-32* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au phosphore-32, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Radioactivité spécifique* : au minimum 11,1 MBq de phosphore-32 par milligramme d'ion orthophosphate.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du phosphore-32* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie bêta.

   *Résultat* : l'énergie maximale du rayonnement bêta est de 1,71 MeV.

B. Examinez le chromatogramme obtenu dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultat* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son facteur de retardement au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 6,0 à 8,0.

**Phosphates** : au maximum 89 µg/MBq.

*Solution à examiner.* Diluez la préparation à examiner dans de l'*eau R* afin d'obtenir une concentration radioactive de 370 kBq de phosphore-32 par millilitre. Dans une fiole jaugée, introduisez 1,0 mL de cette solution. Ajoutez, en agitant à plusieurs reprises, un mélange de 0,5 mL de *solution de molybdate d'ammonium R*, de 0,5 mL d'une solution de *vanadate d'ammonium R* à 2,5 g/L et de 1 mL d'*acide perchlorique R,* puis complétez à 5,0 mL avec de l'*eau R*.

*Solution témoin.* Préparez simultanément dans les mêmes conditions que la solution à examiner avec 1,0 mL d'une solution contenant 33 mg d'ion orthophosphate par litre.

Après 30 min, la solution à examiner n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

Spectrométrie bêta.
*Résultat* : le spectre obtenu avec la préparation à examiner ne diffère pas significativement de celui obtenu dans les mêmes conditions avec une préparation étalon de phosphore-32.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{32}$P]Phosphate**. Chromatographie ascendante sur papier (*2.2.26*).

*Solution à examiner.* Diluez la préparation à examiner avec de l'*eau R* jusqu'à ce que la radioactivité de 10 µL soit de 10 000-20 000 impulsions par minute.

*Solution témoin.* Solution d'*acide phosphorique R* contenant 2 mg de phosphore par millilitre.

*Papier* : *papier pour chromatographie R* ; utilisez une bande de papier d'une largeur de 25 mm et d'une longueur d'environ 300 mm.

*Phase mobile* : mélange de 0,3 mL d'*ammoniaque R,* 5 g d'*acide trichloracétique R,* 25 mL d'*eau R* et 75 mL de *2-propanol R*.

*Dépôt* : 10 µL de solution témoin puis déposez sur le même dépôt 10 µL de la solution à examiner.

*Développement* : pendant 16 h.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : localisez la tache d'acide phosphorique non-radioactive en pulvérisant une solution d'*acide perchlorique R* à 50 g/L, puis une solution de *molybdate d'ammonium R* à 10 g/L. Exposez ensuite le chromatogramme au *sulfure d'hydrogène R*. Il se développe une coloration bleue. Déterminez la distribution de la radioactivité à l'aide d'un détecteur approprié.

*Limite* :

– *[$^{32}$P]phosphate* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale due au phosphore-32.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

**01/2008:1475**
**corrigé 7.0**

# STRONTIUM ($^{89}$Sr) (CHLORURE DE), SOLUTION INJECTABLE DE

## Strontii ($^{89}$Sr) chloridi solutio iniectabilis

DÉFINITION

Solution stérile de chlorure de [$^{89}$Sr]strontium.

*Strontium-89* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au strontium-89, à la date figurant sur l'étiquette.

*Radioactivité spécifique* : au minimum 1,8 MBq de strontium-89 par milligramme de strontium.

*Strontium* : 6,0 mg/mL à 12,5 mg/mL.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du strontium-89* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma et X.
   *Résultat* : l'énergie du photon gamma détecté est de 0,909 MeV ; il est dû à l'yttrium-89m (formé dans 0,01 pour cent des désintégrations), produit de filiation de courte durée de vie, en équilibre avec le strontium-89.
B. A 0,1 mL de la préparation à examiner, ajoutez 1 mL d'une solution récemment préparée de *rhodizonate de sodium R* à 1 g/L. Mélangez et laissez reposer pendant 1 min. Il se forme un précipité brun-rouge.
C. A 0,1 mL de *solution de nitrate d'argent R2,* ajoutez 50 µL de la préparation à examiner. Il se forme un précipité blanc.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 4,0 à 7,5.

*Note : les essais suivants, à savoir Aluminium, Fer et Plomb peuvent être réalisés simultanément à l'essai Strontium. Si tel n'est pas le cas, préparez les solutions de référence en veillant à ce que leur concentration en strontium soit approximativement égale à celle de la solution à examiner.*

**Aluminium** : au maximum 2 µg/mL.

Spectrométrie d'émission atomique (méthode plasma ou arc) (*2.2.22, Procédé I*).

*Solution à examiner.* Prélevez 0,2 mL de préparation à examiner et complétez à un volume approprié avec de l'*acide nitrique dilué R*.

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 10 ppm d'aluminium (Al) R* diluée avec la quantité nécessaire d'*acide nitrique dilué R*.

**Fer** : au maximum 5 µg/mL.

Spectrométrie d'émission atomique (méthode plasma ou arc) (*2.2.22, Procédé I*).

*Solution à examiner.* Prélevez 0,2 mL de préparation à examiner et complétez à un volume approprié avec de l'*acide nitrique dilué R*.

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 20 ppm de fer (Fe) R* diluée avec la quantité nécessaire d'*acide nitrique dilué R*.

**Plomb** : au maximum 5 µg/mL.

Spectrométrie d'émission atomique (méthode plasma ou arc) (*2.2.22, Procédé I*).

*Solution à examiner.* Prélevez 0,2 mL de préparation à examiner et complétez à un volume approprié avec de l'*acide nitrique dilué R*.

Préparations radiopharmaceutiques

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R* diluée avec la quantité nécessaire d'*acide nitrique dilué R*.

**Strontium** : 6,0 mg/mL à 12,5 mg/mL.

Spectrométrie d'émission atomique (*2.2.22, Procédé I*).

*Solution à examiner.* Prélevez 0,2 mL de préparation à examiner et complétez à un volume approprié avec de l'*acide nitrique dilué R*.

*Solutions de référence.* Préparez les solutions de référence à partir de *solution à 1,0 pour cent de strontium (Sr) R* diluée avec la quantité nécessaire d'*acide nitrique dilué R*.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).*

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

La radioactivité totale due aux radionucléides autres que le strontium-89 est au maximum de 0,6 pour cent.

**Emetteurs gamma autres que l'yttrium-89m** : au maximum 0,4 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma et X.

**Emetteurs bêta**. Evaporez à siccité 100 µL de préparation à examiner sous un épiradiateur. Dissolvez le résidu dans 2 mL d'*acide bromhydrique à 47 pour cent R*, évaporez à siccité sous l'épiradiateur et dissolvez le résidu dans 2 mL d'*acide bromhydrique dilué R1*. Transférez la solution à l'extrémité d'une colonne d'un diamètre de 5-6 mm, remplie d'environ 2 mL de *résine échangeuse de cations R1* (100-250 µm), préconditionnée avec de l'*acide bromhydrique dilué R1* et éluez la colonne avec le même solvant jusqu'à recueillir 10 mL d'éluat dans un récipient contenant 50 µL d'une solution de *sulfate de sodium anhydre R* à 15 g/L dans de l'*acide chlorhydrique 1 M*.

Dans une fiole pour liquide scintillant, ajoutez un volume approprié de *liquide scintillant R*, puis 1 mL d'*eau R*, 0,1 mL d'une solution de *sulfate de sodium anhydre R* à 15 g/L dans de l'*acide chlorhydrique 1 M* et 100 µL d'éluat. Agitez pour obtenir une solution limpide. Déterminez la radioactivité due aux impuretés A et B dans l'échantillon à l'aide d'un appareil approprié.

En tenant compte du taux de recouvrement atteint lors de la séparation, de l'efficacité du comptage et de la décroissance radioactive, déterminez la concentration radioactive des impuretés A et B dans l'échantillon et, à partir de ce résultat, le pourcentage total des impuretés émettrices bêta dans la préparation à examiner.

*Résultat* :

– *impuretés A et B* : au maximum 0,2 pour cent de la radioactivité totale.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

IMPURETÉS

A. soufre-35,

B. phosphore-32.



**01/2008:0640**
**corrigé 7.0**

# TECHNÉTIUM ($^{99m}$Tc) (ALBUMINE HUMAINE-), SOLUTION INJECTABLE D'

## Technetii ($^{99m}$Tc) humani albumini solutio iniectabilis

DÉFINITION

Solution apyrogène et stérile d'albumine d'origine humaine marquée au technétium-99m. La solution est préparée à partir de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium, obtenu par fission (0124)* ou de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium, non obtenu par fission (0283).* La solution injectable contient une substance réductrice telle qu'un sel d'étain à une concentration maximale de 1 mg de Sn par millilitre. Bien qu'au stade actuel, aucune limite précise pour la teneur maximum en étain ne puisse être fixée, les données disponibles tendent à montrer l'importance de maintenir le rapport étain/albumine à une valeur aussi basse que possible. La solution injectable peut contenir un tampon approprié et un conservateur antimicrobien. L'albumine humaine utilisée est conforme aux exigences de la monographie *Solution d'albumine humaine (0255).*

*Technétium-99m* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Albumine* : 90,0 pour cent à 110,0 pour cent de la quantité d'albumine indiquée sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore ou jaune pâle.

*Période et nature du rayonnement du technétium-99m* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

   *Résultat* : l'énergie du photon gamma principal du technétium-99m est de 0,141 MeV.

B. Effectuez sur la préparation à examiner des essais de précipitation avec une gamme appropriée d'immunosérums spécifiques d'espèces. L'essai doit être effectué à l'aide d'immunosérums spécifiques aux protéines plasmatiques de chaque espèce d'animal domestique couramment utilisée pour la préparation de produits d'origine biologique dans le territoire concerné. La préparation contient des protéines d'origine humaine et donne des résultats négatifs avec les immunosérums spécifiques aux protéines plasmatiques d'autres espèces.

C. Examinez la préparation à examiner par une technique appropriée d'immunoélectrophorèse. A l'aide d'un immunosérum du sérum humain normal, comparez un sérum humain normal et la préparation à examiner, dilués si nécessaire. Le composant principal de la préparation à examiner correspond au composant principal du sérum humain normal. D'autres protéines plasmatiques peuvent être présentes en faibles quantités dans la préparation diluée.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 2,0 à 6,5.

**Albumine**

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Solution témoin.* Diluez de la *solution d'albumine humaine R* avec une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L de façon à obtenir une concentration d'albumine de 5 mg par millilitre.

A 1,0 mL de la solution à examiner et 1,0 mL de la solution témoin, ajoutez 4,0 mL de *réactif au biuret R* et mélangez. Après 30 min exactement, mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 540 nm en utilisant comme liquide de compensation une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, traitée de la même manière. Calculez la teneur en albumine en milligrammes par millilitre à partir des absorbances mesurées.

**Etain** : au maximum 1 mg/mL.

*Solution à examiner.* A 1,0 mL de la préparation à examiner, ajoutez 1,0 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 206 g/L. Chauffez dans un bain-marie à 100 °C pendant 30 min. Refroidissez et centrifugez à 300 *g* pendant 10 min. Prélevez 1,0 mL du surnageant et complétez à 10 mL avec une solution d'*acide chlorhydrique R* à 103 g/L.

*Solution témoin.* Dissolvez 95 mg de *chlorure stanneux R* dans une solution d'*acide chlorhydrique R* à 103 g/L et complétez à 1000,0 mL avec le même acide.

A 1,0 mL de chaque solution, ajoutez 0,05 mL d'*acide thioglycolique R,* 0,1 mL de *réactif au dithiol R,* 0,4 mL d'une solution de *laurilsulfate de sodium R* à 20 g/L et 3,0 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 21 g/L. Mélangez. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 540 nm en utilisant une solution d'*acide chlorhydrique R* à 21 g/L comme liquide de compensation. L'absorbance de la solution à examiner n'est pas supérieure à celle de la solution témoin.

**Distribution physiologique**. Injectez un volume de préparation à examiner ne dépassant pas 0,5 mL et contenant au maximum 1,0 mg d'albumine, dans une veine appropriée telle qu'une veine caudale ou une veine saphène de 3 rats mâles, pesant chacun de 150-250 g. Mesurez la radioactivité dans la seringue avant et après l'injection. Euthanasiez les rats 30 min après l'injection. Recueillez 1 mL de sang par une méthode appropriée puis prélevez le foie et, si l'injection a été effectuée dans une veine caudale, la queue. Mesurez la radioactivité de ces organes et du sang à l'aide d'un appareil approprié. Déterminez le pourcentage de radioactivité dans le foie et dans 1 mL de sang par rapport à la radioactivité totale calculée comme étant la différence entre les 2 mesures de la seringue, moins l'activité dans la queue si l'injection a été effectuée dans une veine caudale. Effectuez une correction de la radioactivité du sang en multipliant la valeur obtenue par le facteur $m/200$ dans lequel $m$ correspond à la masse corporelle du rat exprimé en grammes.

Dans au moins 2 des 3 rats, la radioactivité du foie est au maximum de 15 pour cent et la radioactivité dans le sang, après correction, est au minimum de 3,5 pour cent.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 175/$V$ UI/mL, $V$ étant la dose maximale recommandée, en millilitres.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**Impureté A**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* ; utilisez une feuille de fibre de verre recouverte de gel de silice, préalablement chauffée à 110 °C pendant 10 min.

*Phase mobile* : *méthyléthylcétone R.*

*Dépôt* : 5-10 µL et laissez sécher.

*Développement* : sur un parcours de 10-15 cm en environ 10 min.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteurs de retardement* : albumine humaine-[$^{99m}$Tc]technétium = 0,0 à 0,1 ; impureté A = 0,9 à 1,0.

*Limite* :

– *impureté A* : au maximum 5,0 pour cent de la radioactivité totale due au technétium-99m.

**Fractions II à V de [$^{99m}$Tc]technétium-albumine**. Chromatographie d'exclusion (*2.2.30*).

*Phase mobile concentrée.* Dissolvez 1,124 g de *phosphate monopotassique R,* 4,210 g de *phosphate disodique R,* 1,17 g de *chlorure de sodium R* et 0,10 g d'*azide de sodium R* dans de l'*eau R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

*Solution à examiner.* A 0,25 mL de la préparation à examiner, ajoutez 0,25 mL de phase mobile concentrée. *Utilisez immédiatement après dilution.*

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,6 m, Ø = 7,5 mm,

– *phase stationnaire* : *gel de silice pour chromatographie d'exclusion R.*

*Phase mobile* : phase mobile concentrée, *eau R* (50:50 *V/V*).

*Débit* : 0,6 mL/min.

*Détection* : détecteur de radioactivité étalonné pour le technétium-99m.

*Injection* : 200 µL.

*Enregistrement* : au minimum 10 min après le retour de l'enregistreur à la ligne de base.

*Temps de rétention* des pics élués :

| | | |
|---|---|---|
| I | Composé de masse moléculaire élevée | 19-20 min |
| II | Albumine Poly III | 23-24 min |
| III | Albumine Poly II | 25-27 min |
| IV | Albumine Poly I | 28-29 min |
| V | Sérum-albumine humaine | 32-33 min |
| VI | Colloïde (étain) | 40-47 min |
| VII | Pertechnétate | 48 min |

*Limite* :

– *fractions II à V de [$^{99m}$Tc]technétium-albumine* : au minimum 80 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m déposée sur la colonne.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– la quantité d'albumine,

– la quantité éventuelle d'étain.

IMPURETÉS

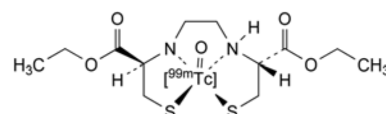
A. ion [$^{99m}$Tc]pertechnétate.

Préparations radiopharmaceutiques

**01/2008:2123**

# TECHNÉTIUM ($^{99m}$Tc) (BICISATE-), SOLUTION INJECTABLE DE

## Technetii ($^{99m}$Tc) bicisati solutio iniectabilis




DÉFINITION

Solution stérile d'un complexe de technétium-99m avec le *N,N'*-éthylènedi-L-cystéinate de diéthyle. Elle peut contenir des stabilisants et des additifs inertes tels que le *Mannitol (0559)* ou l'*Edétate disodique (0232).*

*Teneur* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

PRODUCTION

La solution injectable de bicisate-technétium ($^{99m}$Tc) est préparée à partir de l'ester diéthylique de *N,N'*-(1,2-éthylènediyl)bis[acide (2*R*)-2-amino-3-sulfanylpropanoïque] et d'une *Solution injectable de pertechnétate de ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu par fission (0124)* ou d'une *Solution injectable de pertechnétate de ($^{99m}$Tc) de sodium non obtenu par fission (0283)* en présence d'agents réducteurs tels qu'un sel stanneux.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du technétium-99m* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides*.

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultats* : l'énergie du photon gamma principal du technétium-99m est de 0,141 MeV.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultats* : le pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son facteur de retardement au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 6,5 à 7,5.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. Elle peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**Impuretés A, B, C, D, E, F**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution témoin (a)*. Dans le flacon B d'une *trousse pour radiomarquage de bicisate SCR* protégé par une enveloppe extérieure en plomb, ajoutez 2 mL de solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium (obtenu ou non par fission) contenant 400-800 MBq. Dissolvez le contenu du flacon A de la *trousse pour radiomarquage de bicisate SCR* dans 3 mL d'une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L. Transférez immédiatement 1,0 mL de la solution contenue dans le flacon A vers le flacon B. Mélangez et laissez reposer pendant 30 min à température ambiante.

*Solution témoin (b)*. Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium (obtenu ou non par fission).

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R.*

*Dépôt* : 5 µL, laissez sécher les dépôts pendant 5-10 min.

*Développement* : sur les 4/5 de la plaque.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : déterminez la distribution de la radioactivité à l'aide d'un détecteur approprié.

*Facteurs de retardement* : bicisate-technétium-99m = supérieur à 0,4 ; impuretés A, B, C, D, E et F = inférieur à 0,2.

*Conformité du système* : le facteur de retardement du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) diffère nettement de celui du pic du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b).

*Limite* :

– *somme des impuretés A, B, C, D, E et F* : au maximum 6 pour cent de la radioactivité totale.

Préparations radiopharmaceutiques

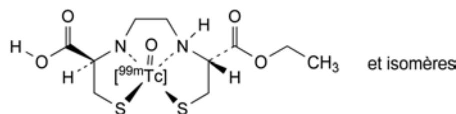
RADIOACTIVITÉ

Mesurez la radioactivité en utilisant un instrument étalonné.

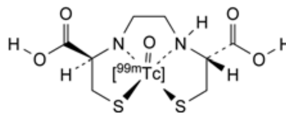
IMPURETÉS

A. technétium-99m sous forme colloïdale,

B. ion [$^{99m}$Tc]pertechnétate,




C. complexe de technétium-99m avec l'hydrogéno-*N,N'*-éthylènedi-L-cystéinate d'éthyle,



D. complexe de technétium-99m avec la *N,N'*-éthylènedi-L-cystéine,

E. complexe de technétium-99m avec le mannitol,

F. complexe de technétium-99m avec l'édétate disodique.

**01/2008:0689**
**corrigé 7.0**

# TECHNÉTIUM ($^{99m}$Tc) (ÉTAIN COLLOÏDAL ET DE), SOLUTION INJECTABLE D'

## Stanni colloidalis et technetii ($^{99m}$Tc) solutio iniectabilis

DÉFINITION

Dispersion colloïdale stérile d'étain marqué au technétium-99m. La solution est préparée à partir de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu par fission (0124)* ou de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium non obtenu par fission (0283)*. La solution injectable contient des ions fluorure ainsi que des sels d'étain en quantité variable ne dépassant pas 1 mg de Sn par millilitre. Elle peut aussi contenir un stabilisateur de colloïde apyrogène et un tampon appropriés.

*Technétium-99m* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Etain* : au maximum 1 mg/mL.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution incolore, limpide à opalescent.

*Période et nature du rayonnement du technétium-99m* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides*.

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultat* : l'énergie du photon gamma principal du technétium-99m est de 0,141 MeV.

B. Mélangez 0,05 mL de *solution de nitrate de zirconyle R* à 0,05 mL de *solution d'alizarine S R*. Ajoutez 0,05 mL de la préparation à examiner. Il apparaît une coloration jaune.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 4,0 à 7,0.

**Etain** : au maximum 1 mg/mL.

*Solution à examiner.* Prélevez 3,0 mL de préparation à examiner et complétez à 50,0 mL avec une solution d'*acide chlorhydrique R* à 103 g/L.

*Solution de référence.* Dissolvez 0,115 g de *chlorure stanneux R* dans une solution d'*acide chlorhydrique R* à 103 g/L et complétez à 1000,0 mL avec le même acide.

A 1,0 mL de chaque solution, ajoutez 0,05 mL d'*acide thioglycolique R*, 0,1 mL de *réactif au dithiol R*, 0,4 mL d'une solution de *laurilsulfate de sodium R* à 20 g/L et 3,0 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 21 g/L. Mélangez. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 540 nm en utilisant une solution d'*acide chlorhydrique R* à 21 g/L comme liquide de compensation. L'absorbance de la solution à examiner n'est pas supérieure à celle de la solution de référence.

**Distribution physiologique**. Injectez un volume de la préparation à examiner ne dépassant pas 0,2 mL dans une veine caudale de 3 souris pesant chacune 20-25 g. Euthanasiez les animaux 20 min après l'injection. Prélevez le foie, la rate et les poumons. Mesurez la radioactivité de ces organes à l'aide d'un appareil approprié. Mesurez la radioactivité dans le reste du corps de chaque animal après avoir éliminé la queue. Déterminez le pourcentage de radioactivité dans le foie, la rate et les poumons par rapport à la radioactivité de tous les organes et du reste du corps à l'exclusion de la queue.

Dans chacune des 3 souris, au minimum 80 pour cent de la radioactivité se trouve dans le foie et dans la rate et au maximum 5 pour cent dans les poumons. Si, dans 1 seule souris sur 3, la distribution de la radioactivité n'est pas conforme, répétez l'essai sur 3 autres souris. La préparation à examiner satisfait à l'essai si la distribution de la radioactivité correspond aux proportions prescrites ci-dessus dans 5 des 6 souris utilisées.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{99m}$Tc]Technétium sous forme colloïdale**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* ; utilisez une feuille de fibre de verre recouverte de gel de silice, chauffée à 110 °C pendant 10 min.

*Phase mobile* : une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L préalablement traitée par un courant d'*azote R*.

*Dépôt* : 5-10 µL.

*Développement* : sur un parcours de 10-15 cm en environ 10 min.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteurs de retardement* : [$^{99m}$Tc]technétium sous forme colloïdale = 0,0 à 0,1 ; impureté A = 0,9 à 1,0.

*Limite* :

– *[$^{99m}$Tc]technétium sous forme colloïdale* : au minimum 95 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m.

## RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

## IMPURETÉS

A. ion [$^{99m}$Tc]pertechnétate.

**01/2008:0585**

# TECHNÉTIUM ($^{99m}$Tc) (ÉTIFÉNINE-), SOLUTION INJECTABLE D'

## Technetii ($^{99m}$Tc) et etifenini solutio iniectabilis

### DÉFINITION

La solution injectable d'étifénine-technétium ($^{99m}$Tc) est une solution stérile, qui peut être préparée à partir de solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu ou non par fission et de solutions d'étifénine (acide[(2,6-diéthylphényl)carbamoylméthylimino]diacétique ; $C_{16}H_{22}N_2O_5$) et de chlorure stanneux.

La solution contient une quantité variable d'étain (Sn) ne dépassant pas 0,2 mg/mL. La solution contient au minimum 90,0 pour cent et au maximum 110,0 pour cent de la radioactivité due au technétium ($^{99m}$Tc) indiquée, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette. 95,0 pour cent au minimum de la radioactivité est due au technétium-99m complexé par l'étifénine.

La solution est préparée à partir de la solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium, obtenu ou non par fission, à l'aide de réactifs stériles appropriés et compte tenu des proportions d'impuretés radionucléidiques par rapport à la date et à l'heure de l'administration.

### CARACTÈRES

Solution limpide et incolore.

Le technétium-99m a une période de 6,02 h et émet des rayonnements gamma.

### IDENTIFICATION

A. Enregistrez le spectre des rayonnements gamma à l'aide d'un appareil approprié et comparez avec le spectre d'une préparation étalon de technétium-99m ou à l'aide d'un appareil étalonné au moyen d'une telle solution. Les préparations étalons de technétium-99m et de molybdène-99m peuvent être obtenues auprès des laboratoires officiellement désignés par l'Autorité compétente. Le spectre de la solution à examiner ne diffère pas d'une manière significative de celui de la préparation étalon. L'énergie du photon gamma principal du technétium-99m est de 0,140 MeV.

B. Opérez par chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Diluez la solution à examiner dans du *méthanol R* pour obtenir une concentration d'environ 1 mg d'étifénine par millilitre.

*Solution témoin.* Dissolvez 5,0 mg d'*étifénine SCR* dans du *méthanol R* et complétez à 5,0 mL avec le même solvant.

La chromatographie peut être réalisée en utilisant :

– une colonne d'une longueur de 0,25 m et d'un diamètre intérieur de 4,6 mm remplie de *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm à 10 µm)
– comme phase mobile à un débit de 1 mL/min, un mélange de 20 volumes de *méthanol R* et de 80 volumes d'une solution de *phosphate monopotassique R* à 14 g/L dont le pH a été ajusté à 2,5 à l'aide d'*acide phosphorique R*,
– un spectrophotomètre réglé à 230 nm.

Injectez 20 µL de chaque solution. Le pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente un temps de rétention semblable à celui du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

### ESSAI

**pH** (*2.2.3*). Le pH de la solution à examiner est de 4,0 à 6,0.

**Distribution physiologique**. Injectez dans une veine caudale de 3 souris pesant chacune de 20 g à 25 g, 0,1 mL de la solution à examiner, équivalant à environ 3,7 MBq. Euthanasiez les animaux 1 h après l'injection. Prélevez le foie, la vésicule

biliaire, l'intestin grêle, le gros intestin, et les reins en récoltant l'urine excrétée. Mesurez la radioactivité de ces organes. Mesurez la radioactivité du reste du corps de chaque animal, après avoir prélevé la queue. Déterminez le pourcentage de radioactivité de chaque organe à l'aide de l'expression :

$$\frac{A}{B} \times 100$$

*A* = radioactivité de l'organe considéré,

*B* = radioactivité totale de tous les organes et du reste du corps, à l'exclusion de la queue.

Chez 2 souris au minimum, le pourcentage de radioactivité qui a transité par le système hépatobiliaire (c'est-à-dire la somme des activités de la vésicule biliaire, de l'intestin grêle et du gros intestin) est au moins de 80 pour cent ; 3 pour cent au plus de la radioactivité se trouvent dans le foie et 2 pour cent au plus dans les reins.

**Etain**

*Solution à examiner.* Prélevez 1,0 mL de la solution à examiner et complétez à 5,0 mL avec de l'*acide chlorhydrique 1 M.*

*Solution de référence.* A l'aide d'*acide chlorhydrique 1 M,* préparez une solution de référence contenant 0,075 mg de *chlorure stanneux R* par millilitre d'*acide chlorhydrique 1 M.*

A 1,0 mL de chaque solution, ajoutez successivement 0,4 mL d'une solution de *laurilsulfate de sodium R* à 20 g/L, 0,05 mL d'*acide thioglycolique R,* 0,1 mL de *réactif au dithiol R* et 3,0 mL d'*acide chlorhydrique 0,2 M.* Mélangez énergiquement. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) des solutions à 540 nm, en utilisant comme liquide de compensation de l'*acide chlorhydrique 0,2 M.* L'absorbance de la solution à examiner n'est pas supérieure à celle de la solution de référence (0,2 mg de Sn par millilitre).

**Stérilité**. La solution à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* Elle peut être débitée avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

Opérez par chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) en utilisant une plaque préfabriquée en fibre de verre recouverte d'acide silicique. Chauffez la plaque à 110 °C pendant 10 min. La plaque utilisée doit être telle qu'elle permette à la phase mobile de migrer sur une distance de 10 cm à 15 cm en 15 min environ.

Déposez sur la plaque 5 µL à 10 µL de la solution à examiner. Développez immédiatement sur un parcours de 10 cm à 15 cm avec une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L. Laissez sécher la plaque. Déterminez la répartition de la radioactivité à l'aide d'un détecteur approprié. Le technétium-99m complexé par l'étifénine migre presque jusqu'au milieu de la plaque et l'ion pertechnétate migre vers le front du solvant. Les impuretés sous forme colloïdale demeurent au point de dépôt. La radioactivité due au technétium-99m complexé par l'étifénine représente au minimum 95,0 pour cent de la radioactivité totale du chromatogramme.

RADIOACTIVITÉ

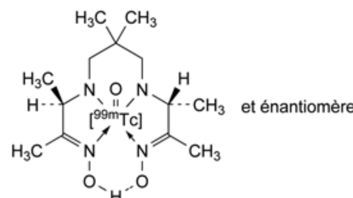
Mesurez la radioactivité de la solution à examiner à l'aide d'un compteur approprié et comparez-la à celle d'une solution étalon de technétium-99m ou à l'aide d'un appareil étalonné au moyen d'une telle solution.



**01/2008:1925**

# TECHNÉTIUM ($^{99m}$Tc) (EXAMÉTAZIME-), SOLUTION INJECTABLE D'

## Technetii ($^{99m}$Tc) exametazimi solutio iniectabilis




DÉFINITION

Solution stérile d'examétazime-technétium-99m lipophile qui peut être préparée par dissolution d'un mélange racémique de (3*RS*,9*RS*)-4,8-diaza-3,6,6,9-tétraméthylundécane-2,10-dione bisoxime en présence d'un sel stanneux dans une *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu par fission (0124)* ou une *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium non obtenu par fission (0283).* Elle peut contenir des stabilisants et des additifs inertes.

*Teneur* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Pureté* : au minimum 80 pour cent de la radioactivité totale correspond à l'examétazime-technétium-99m lipophile et à son isomère *méso.*

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide.

*Période et nature du rayonnement du technétium-99m* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma

*Comparaison* : solution étalon de technétium-99m ou en utilisant un appareil étalonné. Des solutions étalons de technétium-99m et/ou des services d'étalonnage sont disponibles auprès de l'Autorité compétente.

*Résultats* : le spectre obtenu avec la solution à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une solution étalon de technétium-99m. L'énergie du photon gamma principal est de 0,141 MeV.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai Impureté A sous Pureté radiochimique.

*Résultats* : le pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic dû à l'examétazime-technétium-99m lipophile dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 5,0 à 10,0.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* Elle peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**Impureté C**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* ; utilisez une feuille de fibre de verre.

*Phase mobile* : solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L.

*Dépôt* : environ 5 µL.

*Développement* : immédiat, sur les 2/3 de la plaque.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : déterminez la distribution de la radioactivité à l'aide d'un détecteur approprié.

*Facteurs de retardement* : impureté C = 0,8 à 1,0 ; l'examétazime-technétium-99m lipophile et les impuretés A, B, D et E ne migrent pas.

*Limite* :

– *impureté C* : au maximum 10 pour cent de la radioactivité totale.

**Total d'examétazime-technétium-99m lipophile et d'impureté A**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* ; utilisez une feuille de fibre de verre.

*Phase mobile* : *méthyléthylcétone R.*

*Dépôt* : environ 5 µL.

*Développement* : immédiat, sur les 2/3 de la plaque.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : déterminez la distribution de la radioactivité à l'aide d'un détecteur approprié.

*Facteurs de retardement* : examétazime-technétium-99m lipophile = 0,8 à 1,0 ; impureté A = 0,8 à 1,0 ; impureté C = 0,8 à 1,0 ; les impuretés B, D et E ne migrent pas.

*Limites* : calculez le pourcentage de radioactivité due aux impuretés B, D et E à partir de l'essai B (*B*) et le pourcentage de radioactivité due à l'impureté C à partir de l'essai A (*A*). Calculez le pourcentage total d'examétazime-technétium-99m lipophile et d'impureté A à l'aide de l'expression :

$$100 - A - B$$

– *total d'examétazime-technétium-99m lipophile et d'impureté A* : au minimum 80 pour cent de la radioactivité totale.

**Impureté A**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Solution témoin.* Dissolvez le contenu d'un flacon d'*examétazime riche en méso SCR* dans 0,5 mL d'une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, et transférez dans un flacon protégé par une enveloppe extérieure en plomb et rempli d'azote. Ajoutez 6 µL d'une solution récemment préparée de *chlorure stanneux R* à 1 g/L dans l'*acide chlorhydrique 0,05 M*, et 2,5 mL d'une solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium, obtenu ou non par fission, à 370-740 MBq. Mélangez soigneusement et utilisez ce mélange dans les 30 min qui suivent sa préparation.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases, postgreffé R* (5 µm) à particules sphériques présentant un diamètre de pores de 13 nm et un taux de carbone de 11 pour cent.

*Phase mobile* : mélangez 33 volumes d'*acétonitrile R* et 67 volumes de *solution tampon phosphate pH 3,0 (0,1 M) R.*

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : détecteur de radioactivité.

*Injection* : injecteur à boucle.

*Enregistrement* : 20 min.

*Rétention relative* par rapport à l'examétazime-technétium-99m lipophile : impureté A = environ 1,2.

*Conformité du système* : solution témoin :

– chromatogramme semblable au chromatogramme fourni avec l'*examétazime riche en méso SCR,*
– *résolution* : au minimum 2 entre les pics dus à l'examétazime-technétium-99m lipophile et l'impureté A.

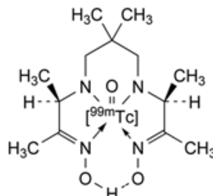
*Limite* :

– *impureté A* : au maximum 5 pour cent de la radioactivité due à l'examétazime-technétium-99m lipophile et à l'impureté A.

RADIOACTIVITÉ

Mesurez la radioactivité à l'aide d'un appareillage approprié en comparant avec une préparation étalon de technétium-99m ou en utilisant un instrument étalonné.

IMPURETÉS




A. isomère *méso* d'examétazime-technétium-99m lipophile,

B. forme colloïdale du technétium-99m,

C. ion [$^{99m}$Tc]pertechnétate,

D. complexe d'examétazime-technétium-99m non lipophile,

E. isomère *méso* du complexe d'examétazime-technétium-99m non lipophile.

**01/2008:1047**
**corrigé 7.0**

# TECHNÉTIUM ($^{99m}$Tc) (GLUCONATE-), SOLUTION INJECTABLE DE

## Technetii ($^{99m}$Tc) gluconatis solutio iniectabilis

DÉFINITION

Solution stérile sous forme d'un complexe de technétium-99m avec du gluconate de calcium. Elle est préparée à partir de *Solution injectable de pertechnétate de sodium ($^{99m}$Tc) obtenu par fission (0124)* ou de *Solution injectable de pertechnétate de sodium ($^{99m}$Tc) non obtenu par fission (0283).*

*Technétium-99m* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution légèrement opalescente.

*Période et nature du rayonnement du technétium-99m* : voir le chapitre *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultat* : l'énergie du photon gamma principal du technétium-99m est de 0,141 MeV.

B. 5 µL de préparation à examiner satisfont à l'essai d'identification A de la monographie *Gluconate de calcium (0172).*

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans les essais A et B de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultats* :

– le facteur de retardement du pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner dans l'essai A est 0,9 à 1,0,
– le facteur de retardement du pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner dans l'essai B est 0,0 à 0,1.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 6,0 à 8,5.

**Distribution physiologique**. Injectez dans la veine caudale de 3 rats pesant chacun 150-250 g, au maximum 0,2 mL de préparation à examiner. Mesurez la radioactivité de la seringue avant et après l'injection. Euthanasiez les rats 30 min après l'injection. Prélevez au minimum 1 g de sang par une technique appropriée, les reins, le foie, la vessie y compris l'urine émise et la queue. Pesez l'échantillon de sang.

A l'aide d'un appareil approprié mesurez la radioactivité des organes, de l'échantillon de sang et de la queue. Déterminez le pourcentage de radioactivité dans les organes prélevés et dans 1 g de sang par rapport à la radioactivité totale calculée par la différence entre les 2 mesures de la seringue, moins l'activité de la queue. Corrigez la concentration sanguine en multipliant par le facteur $m/200$, dans lequel $m$ correspond à la masse corporelle du rat, exprimée en grammes.

Chez au minimum 2 rats sur 3, la radioactivité est :

– *dans les reins* : au minimum 15 pour cent,
– *dans la vessie et l'urine émise* : au minimum 20 pour cent,
– *dans le foie* : au maximum 5 pour cent.
– *dans le sang,* après correction : au maximum 0,50 pour cent.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

A. Impureté A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* ; utilisez une feuille de fibre de verre recouverte de gel de silice, préalablement chauffée à 110 °C pendant 10 min.

*Phase mobile* : solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L.

*Dépôt* : 5-10 µL.

*Développement* : immédiatement sur un parcours de 10-15 cm en environ 10 min.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteurs de retardement* : impureté A = 0,0 à 0,1 ; gluconate [$^{99m}$Tc]technétium et impureté B = 0,9 à 1,0.

B. Impureté B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* ; utilisez une feuille de fibre de verre recouverte de gel de silice, préalablement chauffée à 110 °C pendant 10 min.

*Phase mobile* : *méthyléthylcétone R*.

*Dépôt* : 5-10 µL et laissez sécher.

*Développement* : sur un parcours de 10-15 cm en environ 10 min.

*Séchage* : dans un courant d'air chaud.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteurs de retardement* : gluconate [$^{99m}$Tc]technétium et impureté A = 0,0 à 0,1 ; impureté B = 0,9 à 1,0.

*Limite* :

– *somme des impuretés A et B* : au maximum 10 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m dans les chromatogrammes obtenus dans les essais A et B.

## RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

## IMPURETÉS

A. [$^{99m}$Tc]technétium sous forme colloïdale,

B. ion [$^{99m}$Tc]pertechnétate.

Préparations radiopharmaceutiques

**01/2009:0296**
**corrigé 7.0**

# TECHNÉTIUM ($^{99m}$Tc) (MACROSALB-), SUSPENSION INJECTABLE DE

## Technetii ($^{99m}$Tc) macrosalbi suspensio iniectabilis

## DÉFINITION

Suspension stérile d'albumine d'origine humaine se présentant sous forme d'agrégats irréguliers et insolubles, obtenus par dénaturation d'une solution aqueuse d'albumine humaine. Elle est préparée à partir de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium, obtenu par fission (0124)* ou de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium, non obtenu par fission (0283).* Les particules sont marquées au technétium-99m et ont un diamètre type de 10 µm à 100 µm. La suspension injectable contient des substances réductrices telles que des sels d'étain. La suspension peut contenir un tampon approprié tel qu'un tampon acétate, citrate ou phosphate ainsi que de l'albumine humaine non dénaturée et un conservateur antimicrobien tel que l'alcool benzylique.

L'albumine humaine utilisée est conforme aux exigences de la monographie *Solution d'albumine humaine (0255).*

*Technétium-99m* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Radioactivité spécifique* : au minimum 37 MBq de technétium-99m par milligramme d'agrégats d'albumine à la date et à l'heure de l'administration.

## CARACTÈRES

*Aspect* : suspension blanche qui peut se séparer au repos.

*Période et nature du rayonnement du technétium-99m* :voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

## IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultat* : l'énergie du photon gamma principal du technétium-99m est de 0,141 MeV.

B. L'essai de la radioactivité des particules non filtrables et l'essai de la taille des particules contribuent à l'identification de la préparation (voir Essai).

C. Dans un tube à centrifugation, introduisez 1 mL de préparation à examiner et centrifugez à 2500 *g* pendant 5-10 min. Rejetez le liquide surnageant et ajoutez au culot de centrifugation 5 mL de *solution cupri-tartrique R2*. Mélangez et laissez reposer pendant 10 min. Si nécessaire, chauffez pour dissoudre les particules. Laissez refroidir. Ajoutez rapidement 0,5 mL de *réactif phosphomolybdotungstique dilué R* et mélangez immédiatement. Il se développe une coloration bleue.

## ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 3,8 à 7,5.

**Radioactivité des particules non filtrables** : au minimum 90 pour cent de la radioactivité totale.

Déposez 0,2 mL de préparation à examiner sur une membrane filtrante d'un diamètre de 13-25 mm : cette membrane est constituée par un film de polycarbonate, d'une épaisseur de 10 µm, présentant des pores circulaires de 3 µm et elle est placée dans un support approprié. Filtrez en ajoutant 20 mL d'une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L. Déterminez la proportion d'activité sur le filtre.

**Taille des particules**: au maximum 10 particules ont une dimension supérieure à 100 µm, mais aucune particule ne présente de dimension supérieure à 150 µm.

Examinez au microscope. Diluez si nécessaire la préparation à examiner de façon à obtenir une densité en particules suffisamment faible pour distinguer individuellement les particules. A l'aide d'une seringue munie d'une aiguille d'un diamètre intérieur d'au moins 0,35 mm, déposez un volume approprié de préparation à examiner dans une cellule appropriée telle qu'un hémocytomètre, en prenant soin de ne pas trop remplir la cellule. Laissez reposer pendant 1 min, puis déposez avec précaution une lamelle sans écraser l'échantillon. Examinez par balayage au microscope un champ correspondant au moins à 5000 particules.

**Agrégats d'albumine**

*Solution à examiner.* Dans un tube à centrifugation, introduisez un volume de préparation à examiner correspondant à 1 mg environ d'agrégats d'albumine et centrifugez à 2500 *g* environ pendant 5-10 min. Rejetez le surnageant et remettez le culot en suspension dans 2,0 mL de solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L. Centrifugez à nouveau à 2500 *g* pendant 5-10 min. Rejetez le surnageant et remettez le culot en suspension dans 5,0 mL de *solution de carbonate de sodium R1*. Chauffez dans un bain-marie de 80-90 °C jusqu'à dissolution des agrégats d'albumine. Laissez refroidir, transvasez dans une fiole jaugée et complétez à 10,0 mL avec la *solution de carbonate de sodium R1*.

*Solutions de référence.* Préparez une gamme de solutions contenant, dans la *solution de carbonate de sodium R1*, de 0,05-0,2 mg d'albumine humaine par millilitre.

Introduisez respectivement 3,0 mL de chaque solution dans une fiole de 25 mL. Dans chaque fiole, ajoutez 15,0 mL de *solution cupri-tartrique R2*, mélangez et laissez reposer pendant 10 min. Ajoutez rapidement 1,5 mL de *réactif phosphomolybdotungstique dilué R* et mélangez immédiatement. Laissez reposer pendant 30 min. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 750 nm en utilisant la *solution de carbonate de sodium R1* comme liquide de compensation. A partir des absorbances obtenues avec chaque solution de référence, construisez la courbe d'étalonnage et calculez la concentration en agrégats d'albumine de la préparation à examiner.

**Etain** : au maximum 3 mg/mL.

*Solution à examiner.* A 1,0 mL de préparation à examiner, ajoutez 1,0 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 206 g/L. Chauffez au bain-marie pendant 30 min. Refroidissez et centrifugez à 300 *g* pendant 10 min. Prélevez 1,0 mL du surnageant et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide chlorhydrique R* à 103 g/L.

*Solution témoin.* Dissolvez 0,115 g de *chlorure stanneux R* dans une solution d'*acide chlorhydrique R* à 103 g/L et complétez à 1000,0 mL avec le même acide.

A 1,0 mL de chaque solution, ajoutez 0,05 mL d'*acide thioglycolique R*, 0,1 mL de *réactif au dithiol R*, 0,4 mL d'une solution de *laurilsulfate de sodium R* à 20 g/L et 3,0 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 21 g/L. Mélangez. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 540 nm en utilisant une solution d'*acide chlorhydrique R* à 21 g/L comme liquide de compensation. L'absorbance de la solution à examiner n'est pas supérieure à celle de la solution témoin.

**Distribution physiologique**. Injectez dans une veine caudale de 3 rats, pesant chacun de 150-250 g, au maximum 0,2 mL de préparation à examiner. Euthanasiez les animaux 15 min après l'injection. Prélevez le foie, la rate et les poumons. Mesurez la radioactivité de ces organes à l'aide d'un appareil approprié. Mesurez la radioactivité du reste du corps, y compris le sang, de chaque animal après avoir prélevé la queue. Déterminez le pourcentage de radioactivité dans le foie, la rate et les poumons à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A}{B} \times 100$$

$A$ = radioactivité de l'organe considéré,

$B$ = radioactivité totale du foie, de la rate, des poumons et du reste du corps de l'animal.

Dans au moins 2 des 3 rats, au minimum 80 pour cent de la radioactivité se trouve dans les poumons et au maximum 5 pour cent au total dans le foie et dans la rate. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 175/$V$ UI/mL, $V$ étant la dose maximale recommandée, en millilitres.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

ÉTIQUETAGE

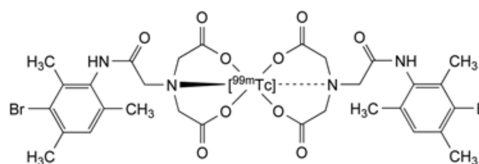
L'étiquette indique :

- la concentration d'étain exprimée en milligrammes par millilitre, si la préparation en contient,
- que la préparation doit être agitée avant l'emploi,
- que la préparation ne doit pas être utilisée si la suspension ne paraît pas homogène après agitation.

**01/2009:2393**
**corrigé 7.0**

# TECHNÉTIUM ($^{99m}$Tc) (MÉBROFÉNINE-), SOLUTION INJECTABLE DE

## Technetii ($^{99m}$Tc) mebrofenini solutio iniectabilis




DÉFINITION

Solution stérile d'un complexe de technétium-99m et de mébrofénine. Elle peut contenir des stabilisants et des additifs inertes.

*Teneur* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

PRODUCTION

La solution injectable de mébrofénine-technétium ($^{99m}$Tc) est préparée en dissolvant, en présence d'un agent réducteur comme un sel stanneux, de l'acide [[[(3-bromo-2,4,6-triméthylphényl)carbamoyl]méthyl]imino]diacétique (mébrofénine) dans de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium, obtenu par fission (0124)* ou dans de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium, non obtenu par fission (0283)*.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du technétium-99m* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultats* : l'énergie du photon gamma principal du technétium-99m est de 0,141 MeV.

B. Examinez le chromatogramme obtenu dans l'essai des autres impuretés radiochimiques (voir Essai).

*Résultats* : le pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic dû à la mébrofénine-technétium-99m dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 4,0 à 7,5.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. Elle peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 175/V UI/mL, V étant la dose maximale recommandée en millilitres.

*PURETE RADIOCHIMIQUE*

**Impureté A**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution témoin (a)*. Dans un flacon fermé, ajoutez 2 mL de solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium (obtenu ou non par fission) à 1 mL d'une solution de *chlorure stanneux R* à 1 g/L dans l'*acide chlorhydrique 0,05 M*. Utilisez cette préparation dans les 30 min qui suivent sa préparation.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 40 mg de *mébrofénine SCR* dans 2 mL d'*eau R* et ajustez à pH 6,5 avec une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 40 g/L. A cette solution, ajoutez 25 μL d'une solution de *chlorure stanneux R* à 20 mg/mL dans l'*acide chlorhydrique 0,05 M* et 400 MBq de solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium (obtenu ou non par fission) dans un volume de 2 mL. Laissez reposer pendant 15 min.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*; utilisez une feuille de fibre de verre.

*Phase mobile* : *, eau R, acétonitrile R* (40:60 *V/V*).

*Dépôt* : environ 5 μL.

*Développement* : immédiatement, sur les 4/5 de la plaque.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : déterminez la distribution de la radioactivité à l'aide d'un détecteur approprié.

*Facteur de retardement* : impureté A = 0-0,1.

*Conformité du système* : le facteur de retardement du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) n'excède pas 0,1. Le facteur de rétention du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) est supérieur à 0,7.

**Autres impuretés radiochimiques**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution témoin*. Utilisez la solution témoin (b) de l'essai de l'impureté A.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie, à groupements polaires incorporés, postgreffé R* (5 μm).

*Phase mobile A* : solution d'*acétate d'ammonium R* à 3,85 g/L.

*Phase mobile B* : *acétonitrile R*.

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 20 | 70 | 30 |
| 20 - 25 | 70 → 0 | 30 → 100 |
| 25 - 30 | 0 | 100 |

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : détecteur de radioactivité.

*Injection* : 20 μL.

*Rétention relative* par rapport à la mébrofénine-technétium-99m (temps de rétention = environ 20 min) : impureté B = environ 0,17.

*Limites* :

– *mébrofénine-technétium-99m* : au minimum 94 pour cent de la radioactivité totale.

Calculez le pourcentage de radioactivité due à la mébrofénine-technétium-99m à l'aide de l'expression suivante :

$$(100 - A) \times T$$

*A* = pourcentage de radioactivité due à l'impureté A déterminé dans l'essai de l'impureté A sous Pureté radiochimique,

*T* = proportion de la radioactivité du pic dû à la mébrofénine-technétium-99m par rapport à la surface totale des pics dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

IMPURETÉS

A. technétium-99m sous forme colloïdale,

B. ion [$^{99m}$Tc]pertechnétate.

**01/2008:0641**
**corrigé 7.0**

# TECHNÉTIUM ($^{99m}$Tc) (MÉDRONATE-), SOLUTION INJECTABLE DE

## Technetii ($^{99m}$Tc) medronati solutio iniectabilis

DÉFINITION

Solution stérile sous forme d'un complexe de technetium-99m et de médronate de sodium. La solution est préparée à partir de *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu par fission (0124)* ou de *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium non obtenu par fission (0283)*. La solution injectable peut contenir des conservateurs antimicrobiens, des antioxydants, des stabilisants ou des tampons.

*Technétium-99m* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du technétium-99m* : voir le chaptitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultat* : l'énergie du photon gamma principal du technétium-99m est de 0,141 MeV.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans les essais A et B de pureté radiochimique (voir Essai).

Préparations radiopharmaceutiques

*Résultats* :

– le facteur de retardement du pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner dans l'essai A est 0,9 à 1,0,
– le facteur de retardement du pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner dans l'essai B est 0,0 à 0,1.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Diluez la préparation à examiner avec de l'*eau R* pour obtenir une concentration en médronate de sodium d'environ 0,1-0,5 mg/mL.

*Solution témoin*. Dissolvez une quantité appropriée (1-5 mg) d'*acide médronique SCR* dans un mélange approprié de solution de *chlorure de sodium R* à 9,0 g/L et d'*eau R* puis complétez à 10 mL avec le même mélange de solvant, de façon à obtenir une solution de même concentration en médronate de sodium et en chlorure de sodium que la solution à examiner.

*Plaque* : plaque recouverte de *cellulose pour chromatographie R*.

*Phase mobile* : *2-propanol R, acide chlorhydrique 1 M, méthyléthylcétone R* (20:30:60 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL.

*Développement* : sur un parcours de 12-14 cm en environ 4 h.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution de molybdate d'ammonium R4*, puis exposez en lumière ultraviolette à 254 nm pendant environ 10 min.

*Résultats* : la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à sa position et sa coloration à la tache du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

## ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 3,5 à 7,5.

**Etain** : au maximum 3 mg/mL.

*Solution à examiner*. Prélevez 1,0 mL de la préparation à examiner et complétez à 50,0 mL avec une solution d'*acide chlorhydrique R* à 103 g/L.

*Solution témoin*. Dissolvez 0,115 g de *chlorure stanneux R* dans une solution d'*acide chlorhydrique R* à 103 g/L et complétez à 1000,0 mL avec le même acide.

A 1,0 mL de chacune des 2 solutions, ajoutez 0,05 mL d'*acide thioglycolique R*, 0,1 mL de *réactif au dithiol R*, 0,4 mL d'une solution de *laurilsulfate de sodium R* à 20 g/L et 3,0 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 21 g/L. Mélangez. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 540 nm en utilisant une solution d'*acide chlorhydrique R* à 21 g/L comme liquide de compensation. L'absorbance de la solution à examiner est au maximum celle de la solution témoin.

**Distribution physiologique**. Injectez un volume de préparation à examiner d'au maximum 0,2 mL, correspondant à une teneur en médronate sodique ne dépassant pas 0,05 mg, dans une veine appropriée telle qu'une veine caudale ou une veine saphène de 3 rats pesant chacun 150-250 g. Mesurez la radioactivité dans la seringue avant et après l'injection. Euthanasiez les rats 2 h après l'injection. Prélevez l'un des fémurs, le foie, et des échantillons de sang. Pesez les échantillons de sang. Sectionnez la queue si l'injection a été effectuée dans une veine caudale. En utilisant un appareil approprié mesurez la radioactivité dans le fémur, le foie et les échantillons de sang ainsi que dans la queue si l'injection a été effectuée dans une veine caudale. Déterminez le pourcentage de radioactivité dans chaque échantillon à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A}{B} \times 100$$

$A$ = radioactivité de l'échantillon concerné,

$B$ = radioactivité totale, égale à la différence entre les 2 mesures dans la seringue, moins la radioactivité mesurée dans la queue si l'injection a été effectuée dans une veine caudale.

Calculez la radioactivité par unité de masse dans le sang. Corrigez la concentration sanguine en multipliant par le facteur $m/200$, dans lequel $m$ correspond à la masse corporelle du rat, exprimée en grammes.

Chez au moins 2 des 3 rats utilisés la radioactivité est :

– *dans le foie* : au maximum 1,0 pour cent,
– *dans le fémur* : au minimum 1,5 pour cent,
– *dans le sang après correction* : au maximum 0,05 pour cent par gramme.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

A. Impureté A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* ; utilisez une feuille de fibre de verre recouverte de gel de silice.

*Phase mobile* : solution d'*acétate de sodium R* à 136 g/L.

*Dépôt* : 5-10 µL.

*Développement* : immédiatement, sur un parcours de 10-15 cm en environ 10 min.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : détecteur approprié pour déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteurs de retardement* : impureté A = 0,0 à 0,1 ; médronate [$^{99m}$Tc]technétium et impureté B = 0,9 à 1,0.

B. Impureté B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* ; utilisez une feuille de fibre de verre recouverte de gel de silice.

*Phase mobile* : *méthyléthylcétone R*.

*Dépôt* : 5-10 µL ; séchez rapidement.

*Développement* : sur un parcours de 10-15 cm en environ 10 min.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : détecteur approprié pour déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteurs de retardement* : médronate [$^{99m}$Tc]technétium et impureté A = 0,0 à 0,1 ; impureté B = 0,9 à 1,0.

*Limites* :

– *impureté B* : au maximum 2,0 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m dans le chromatogramme obtenu dans l'essai B,
– *somme des impuretés A et B* : au maximum 5,0 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m dans les chromatogrammes obtenus dans les essais A et B.

## RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

## IMPURETÉS

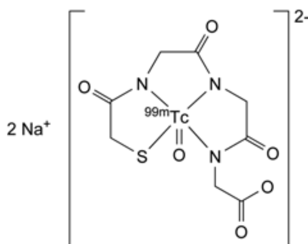
A. [$^{99m}$Tc]technétium sous forme colloïdale,

B. ion [$^{99m}$Tc]pertechnétate.

**01/2008:1372**
**corrigé 7.0**

# TECHNÉTIUM ($^{99m}$Tc) (MERTIATIDE-), SOLUTION INJECTABLE DE

## Technetii ($^{99m}$Tc) mertiatidi solutio iniectabilis




DÉFINITION

Solution stérile de oxo[*N*-[*N*-[*N*-(sulfanylacétyl)glycyl]glycyl]glycynato(5-)-κ$^4$*N,N′,N″S*][$^{99m}$Tc]technétate(V) de disodium. Elle peut être préparée soit par chauffage d'un mélange contenant de la *S*-benzoylmercaptoacétyltriglycine (bétiatide), un agent chélateur faible tel que le tartrate, un sel stanneux et de *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu par fission (0124)* ou de *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium non obtenu par fission (0283)*, soit par mélange de solutions de mercaptoacétyltriglycine (mertiatide), d'un sel stanneux et de *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu par fission (0124)* ou de *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium non obtenu par fission (0283)*, à pH alcalin. Elle peut contenir des agents stabilisants et un tampon.

*Technétium-99m* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du technétium-99m* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultat* : l'énergie du photon gamma principal du technétium-99m est de 0,141 MeV.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai des autres impuretés radiochimiques de la section Pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultat* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 5,0 à 7,5.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**Impureté A**. Chromatographie ascendante sur papier (*2.2.26*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Papier* : *papier pour chromatographie R*.

*Phase mobile* : *eau R, acétonitrile R* (40:60 *V/V*).

*Dépôt* : 2 µL.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteur de retardement* : impureté A = 0,0 à 0,1.

*Limite* :

– *impureté A* : au maximum 2,0 pour cent de la radioactivité totale.

**Autres impuretés radiochimiques**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution témoin*. Dissolvez, en chauffant dans un bain-marie, 5 mg de *S-benzylmercaptoacétyltriglycine SCR* dans 5 mL d'*eau R*. Introduisez 1 mL de cette solution dans un flacon fermé rempli d'*azote R*, puis ajoutez 0,5 mL d'une solution de *tartrate de sodium et de potassium R* à 40 g/L, 25 µL d'une solution de *chlorure stanneux R* à 4 g/L dans une solution d'*acide chlorhydrique R* à 5 g/L et 370-740 MBq de solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium (obtenu ou non par fission) dans un volume ne dépassant pas 3 mL. Chauffez le mélange dans un bain-marie pendant 10 min, puis laissez refroidir à température ambiante.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,

– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile A* : mélangez 7 volumes d'*éthanol anhydre R* et 93 volumes d'une solution de *phosphate monopotassique R* à 1,36 g/L, ajustée à pH 6,0 avec une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 4 g/L.

*Phase mobile B* : *eau R, méthanol R* (10:90 *V/V*).

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 10 | 100 | 0 |
| 10 - 25 | 0 | 100 |

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Equilibrage* :avec la phase mobile A pendant 20 min.

*Injection* : 20 µL.

*Limites* :

– *somme de la surface des pics élués avant le pic principal (impuretés hydrophiles, dont l'impureté B)* : au maximum 3,0 pour cent de la surface totale des pics dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

– *somme de la surface des pics élués après le pic principal (impuretés lipophiles)* : au maximum 4,0 pour cent de la surface totale des pics dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

– *mertiatide [$^{99m}$Tc]technétium* : au minimum 94 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

IMPURETÉS

A. [$^{99m}$Tc]technétium sous forme colloïdale,

B. ion [$^{99m}$Tc]pertechnétate.

Préparations radiopharmaceutiques

**01/2009:0570**
**corrigé 7.0**

# TECHNÉTIUM ($^{99m}$Tc) (MICROSPHÈRES-), SUSPENSION INJECTABLE DE

## Technetii ($^{99m}$Tc) microsphaerarum suspensio iniectabilis

DÉFINITION

Suspension stérile d'albumine d'origine humaine qui a été dénaturée de façon à former des particules sphériques insolubles. Les particules sont marquées au technétium-99m et ont un diamètre type de 10-50 µm. Elle est préparée à partir de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu par fission (0124)* ou de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium non obtenu par fission (0283)*. La suspension injectable contient des substances réductrices telles que des sels d'étain. Elle peut contenir un tampon approprié tel qu'un tampon acétate, citrate ou phosphate et des additifs tels que des agents mouillants.

L'albumine humaine utilisée est conforme aux exigences de la monographie *Solution d'albumine humaine (0255)*.

*Technétium-99m* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Radioactivité* : au minimum 185 MBq de technétium-99m par million de particules à la date et à l'heure de l'administration.

CARACTÈRES

*Aspect* : suspension de particules blanches, jaunes ou artificiellement colorées, qui peut se séparer au repos.

*Période et nature du rayonnement du technétium-99m* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides*.

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultat* : l'énergie du photon gamma principal du technétium-99m est de 0,141 MeV.

B. L'essai de la radioactivité des particules non filtrables et l'essai de la taille des particules (voir Essai) contribuent à l'identification de la préparation.

C. Dans un tube à centrifugation, introduisez 1 mL de préparation à examiner et centrifugez à 2500 *g* pendant 5-10 min. Décantez le surnageant et ajoutez au culot de centrifugation 5 mL de *solution cupri-tartrique R2*. Mélangez et laissez reposer pendant 10 min. Si nécessaire, chauffez pour dissoudre les particules. Laissez refroidir. Ajoutez rapidement 0,5 mL de *réactif phosphomolybdotungstique dilué R* ; mélangez immédiatement. Il se développe une coloration bleue.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 4,0 à 9,0.

**Radioactivité des particules non filtrables** : au minimum 95 pour cent de la radioactivité totale.

Déposez 0,2 mL de préparation à examiner sur une membrane filtrante d'un diamètre de 13-25 mm : cette membrane est constituée par un film de polycarbonate, d'une épaisseur de 10 µm, présentant des pores circulaires de 3 µm et elle est placée dans un support approprié. Filtrez en ajoutant 20 mL d'une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L. Déterminez la proportion de radioactivité sur la membrane.

**Taille des particules** : au maximum 10 particules ont une dimension maximale supérieure à 75 µm, mais aucune d'elles ne présente de dimension maximale supérieure à 100 µm.

Examinez au microscope. Diluez si nécessaire la préparation à examiner de façon à obtenir une densité en particules suffisamment faible pour distinguer individuellement les particules. A l'aide d'une seringue munie d'une aiguille d'un diamètre intérieur d'au moins 0,35 mm, déposez un volume approprié de préparation à examiner dans une cellule appropriée telle qu'un hémocytomètre, en prenant soin de ne pas trop remplir la cellule. Laissez reposer pendant 1 min, puis déposez avec précaution une lamelle sans écraser l'échantillon. Examinez par balayage au microscope un champ correspondant au minimum à 5000 particules. Les particules ont un aspect sphérique uniforme.

**Nombre de particules**. Examinez au microscope. Remplissez une cellule appropriée telle qu'un hémocytomètre d'une dilution appropriée de la préparation à examiner en veillant à ce que les particules ne se déposent pas pendant le transfert. Dénombrez les particules dans la cellule. Répétez 2 fois cette opération et calculez le nombre de particules par millilitre de préparation à examiner.

**Etain** : au maximum 3 mg/mL.

*Solution à examiner*. A 1,0 mL de préparation à examiner, ajoutez 0,5 mL d'*acide sulfurique R* et 1,5 mL d'*acide nitrique R*. Chauffez et évaporez jusqu'à obtention d'un volume d'environ 1 mL. Ajoutez 2 mL d'*eau R* et évaporez à nouveau jusqu'à obtention d'un volume d'environ 1 mL. Répétez 2 fois cette opération, refroidissez et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide chlorhydrique R* à 103 g/L.

*Solution témoin*. Dissolvez 0,115 g de *chlorure stanneux R* dans une solution d'*acide chlorhydrique R* à 103 g/L et complétez à 1000,0 mL avec le même acide.

A 1,0 mL de chaque solution, ajoutez 0,4 mL d'une solution de *laurilsulfate de sodium R* à 20 g/L, 0,05 mL d'*acide thioglycolique R*, 0,1 mL de *réactif au dithiol R* et 3,0 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 21 g/L. Mélangez. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 540 nm en utilisant une solution d'*acide chlorhydrique R* à 21 g/L comme liquide de compensation. L'absorbance de la solution à examiner est au maximum celle de la solution témoin.

**Distribution physiologique**. Injectez dans une veine caudale de 3 rats pesant chacun 150-250 g, au maximum 0,2 mL de préparation à examiner. Euthanasiez les animaux 15 min après l'injection. Prélevez le foie, la rate et les poumons. Mesurez la radioactivité de ces organes à l'aide d'un appareil approprié. Mesurez la radioactivité du reste du corps, y compris le sang, de chaque animal, et l'urine excrétée, après avoir prélevé la queue. Déterminez le pourcentage de la radioactivité dans le foie, la rate et les poumons à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A}{B} \times 100$$

$A$ = radioactivité de l'organe considéré,

$B$ = radioactivité totale du foie, de la rate, des poumons et du reste du corps de l'animal, y compris l'urine excrétée.

Dans au moins 2 des 3 rats, au minimum 80 pour cent de la radioactivité se trouve dans les poumons et au maximum 5 pour cent au total dans le foie et la rate. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de $175/V$ UI/mL, $V$ étant la dose maximale recommandée en millilitres.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– la concentration d'étain exprimée en milligrammes par millilitre, si la préparation en contient,
– que la préparation doit être agitée avant l'emploi.

**01/2008:0642**
**corrigé 7.0**

# TECHNÉTIUM ($^{99m}$Tc) (PENTÉTATE-), SOLUTION INJECTABLE DE

## Technetii ($^{99m}$Tc) pentetatis solutio iniectabilis

DÉFINITION

Solution stérile sous forme d'un complexe de technétium-99m et de pentétate de sodium ou de pentétate de calcium et de trisodium. La solution est préparée à partir de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu par fission (0124)* ou de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium non obtenu par fission (0283).* Elle peut contenir des conservateurs antimicrobiens, des antioxydants, des stabilisants et des tampons appropriés.

*Technétium-99m* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore ou légèrement jaune.

*Période et nature du rayonnement du technétium-99m* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultat* : l'énergie du photon gamma principal du technétium-99m est de 0,141 MeV.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans les essais A et B de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultats* :

– le facteur de retardement du pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner dans l'essai A est 0,9 à 1,0,
– le facteur de retardement du pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner dans l'essai B est 0,0 à 0,1.

C. *Solution à examiner.* Dans un tube de verre propre et sec de 10 mL, placez un volume de préparation à examiner correspondant à 2 mg de pentétate. Complétez si nécessaire à 1 mL avec de l'*eau R.*

*Solution témoin.* Dans un tube de verre propre et sec de 10 mL, placez 1 mL d'*eau R.*

A chaque tube, ajoutez 0,1 mL d'une solution de *sulfate de nickel R* à 1 g/L, puis 0,5 mL d'une solution d'*acide acétique glacial R* à 50 pour cent *V/V* et 0,75 mL d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 50 g/L. Mélangez et vérifiez que le pH est au maximum à 5. A chaque tube, ajoutez 0,1 mL d'une solution de *diméthylglyoxime R* à 10 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R.* Mélangez et laissez reposer pendant 2 min. Dans chaque tube, ajustez au minimum à pH 12 à l'aide d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 100 g/L. Mélangez et vérifiez que le pH est au minimum à 12. Laissez reposer pendant 2 min. Chauffez les tubes avec précaution au bain-marie pendant 2 min.

*Résultats* :

– la solution à examiner reste limpide et incolore pendant toute l'opération,
– la solution témoin se colore en rouge par addition de la solution de diméthylglyoxime et un précipité rouge se forme lorsque le tube est chauffé au bain-marie.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 4,0 à 7,5.

**Etain** : au maximum 1 mg/mL.

*Solution à examiner.* Prélevez 1,5 mL de la préparation à examiner et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide chlorhydrique R* à 103 g/L.

*Solution témoin.* Dissolvez 0,115 g de *chlorure stanneux R* dans une solution d'*acide chlorhydrique R* à 103 g/L et complétez à 1000,0 mL avec le même acide.

A 1,0 mL de chaque solution, ajoutez 0,05 mL d'*acide thioglycolique R,* 0,1 mL de *réactif au dithiol R,* 0,4 mL d'une solution de *laurilsulfate de sodium R* à 20 g/L et 3,0 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 21 g/L. Mélangez. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 540 nm en utilisant une solution d'*acide chlorhydrique R* à 21 g/L comme liquide de compensation. L'absorbance de la solution à examiner n'est pas supérieure à celle de la solution témoin.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**A. Impureté A**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* ; utilisez une feuille de fibre de verre recouverte de gel de silice et préalablement chauffée à 110 °C pendant 10 min.

*Phase mobile* : solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L.

*Dépôt* : 5-10 μL.

*Développement* : immédiatement, sur un parcours de 10-15 cm en environ 10 min.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteurs de retardement* : impureté A = 0,0 à 0,1 ; pentétate [$^{99m}$Tc]technétium et impureté B = 0,9 à 1,0.

**B. Impureté B**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* ; utilisez une feuille de fibre de verre recouverte de gel de silice et préalablement chauffée à 110 °C pendant 10 min.

*Phase mobile* : *méthyléthylcétone R.*

*Dépôt* : 5-10 μL ; laissez sécher.

*Développement* : sur un parcours de 10-15 cm en environ 10 min.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteurs de retardement* : pentétate [$^{99m}$Tc]technétium et impureté A = 0,0 à 0,1 ; impureté B = 0,9 à 1,0.

*Limite* :

– *somme des impuretés A et B* : au maximum 5,0 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m dans les chromatogrammes obtenus dans les essais A et B.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

IMPURETÉS

A. [$^{99m}$Tc]technétium sous forme colloïdale,

B. ion [$^{99m}$Tc]pertechnétate.

**01/2009:0129**
**corrigé 7.0**

# TECHNÉTIUM ($^{99m}$Tc) (PYROPHOSPHATE D'ÉTAIN ET DE), SOLUTION INJECTABLE DE

## Stanni pyrophosphatis et technetii ($^{99m}$Tc) solutio iniectabilis

DÉFINITION

Solution stérile qui peut être préparée à partir de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu par fission (0124)* ou de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium non obtenu par fission (0283)* et de solutions de pyrophosphate de sodium et de chlorure d'étain.

*Technétium-99m* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Pyrophosphate de sodium* ($Na_4P_2O_7,10H_2O$) : 1 mg/mL à 50 mg/mL.

*Etain* : au maximum 3,0 mg/mL.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du technétium-99m* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides*.

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultat* : l'énergie du photon gamma principal du technétium-99m est de 0,141 MeV.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai A et B de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultats* :

– le facteur de retardement du pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner dans l'essai A est 0,9 à 1,0,
– le facteur de retardement du pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner dans l'essai B est 0,0 à 0,1.

C. A 1 mL de la préparation à examiner, ajoutez 1 mL d'*acide acétique R*. Chauffez au bain-marie pendant 1 h. Après refroidissement, ajoutez 10 mL du *réactif nitro-molybdovanadique R*. Laissez reposer pendant 30 min. Il se développe une coloration jaune.

D. A 1 mL de la préparation à examiner, ajoutez 0,05 mL d'*acide thioglycolique R*, 0,1 mL du *réactif au dithiol R*, 0,4 mL d'une solution de *laurilsulfate de sodium R* à 20 g/L, 1 mL d'*acide chlorhydrique R* et 2 mL d'une solution d'*acide sulfurique R* à 30 pour cent *V/V*. Laissez reposer pendant 30 min. Il se développe une coloration rose.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 6,0 à 7,0.

**Pyrophosphate de sodium** : 1 mg/mL à 50 mg/mL.

*Solution à examiner.* Utilisez 1 mL de la préparation à examiner ou d'une dilution appropriée de celle-ci.

*Solutions de référence.* A partir d'une solution contenant du *pyrophosphate de sodium R* et du *chlorure stanneux R* dans les mêmes proportions que la solution à examiner, préparez une gamme de dilutions et complétez au même volume final avec de l'*eau R*.

A la solution à examiner et à 1 mL de chaque solution de référence, ajoutez successivement 10 mL d'une solution de *phosphate disodique R* à 1 g/L, 10 mL de *solution à 8 ppm de fer (Fe) R*, 5 mL d'*acide acétique glacial R* et 5 mL d'une solution de *chlorhydrate d'hydroxylamine R* à 1 g/L. Complétez chaque solution à 40 mL avec de l'*eau R*. Chauffez au bain-marie à 40 °C pendant 1 h. A chaque solution, ajoutez 4 mL d'une solution de *chlorhydrate de phénanthroline R* à 1 g/L et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 515 nm en utilisant comme liquide de compensation un blanc réactif contenant, au lieu de la *solution à 8 ppm de fer (Fe) R*, de l'acide chlorhydrique à 1,1 g/L en HCl. A partir des absorbances obtenues avec chaque solution de référence, construisez la courbe d'étalonnage et calculez la concentration en pyrophosphate de sodium de la préparation à examiner.

**Etain** : au maximum 3,0 mg/mL.

*Solution à examiner.* Utilisez 1 mL de la préparation à examiner ou d'une dilution appropriée de celle-ci.

*Solutions de référence.* A partir d'une solution d'acide chlorhydrique à 6,2 g/L en HCl contenant du *pyrophosphate de sodium R* et du *chlorure stanneux R* dans les mêmes proportions que la solution à examiner, préparez une gamme de dilutions et complétez au même volume final avec de l'acide chlorhydrique à 6,2 g/L en HCl.

A la solution à examiner et à 1 mL de chaque solution de référence, ajoutez 0,05 mL d'*acide thioglycolique R*, 0,1 mL de *réactif au dithiol R*, 0,4 mL d'une solution de *laurilsulfate de sodium R* à 20 g/L, 1 mL d'*acide chlorhydrique R*, 2 mL d'une solution d'*acide sulfurique R* à 300 g/L et complétez à 15 mL avec de l'acide chlorhydrique à 6,2 g/L en HCl. Laissez reposer les solutions pendant 30 min. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 530 nm en utilisant comme liquide de compensation un blanc réactif contenant la même proportion de *pyrophosphate de sodium R* que la solution à examiner. A partir des absorbances obtenues avec chaque solution de référence, construisez la courbe d'étalonnage et calculez la concentration en étain de la préparation à examiner.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 175/*V* UI/mL, *V* étant la dose maximale recommandée, en millilitres.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**A. Impureté A**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* ; utilisez une feuille de fibre de verre recouverte d'une couche de gel de silice et préalablement chauffée à 110 °C pendant 10 min.

*Phase mobile* : solution d'*acétate de sodium R* à 136 g/L.

*Dépôt* : 5-10 µL.

*Développement* : immédiatement, sur un parcours de 10-15 cm en environ 10 min.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteurs de retardement* : impureté A = 0,0 à 0,1 ; pyrophosphate d'étain et de [$^{99m}$Tc]technétium et impureté B = 0,9 à 1,0.

**B. Impureté B**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* La préparation à examiner.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* ; utilisez une feuille de fibre de verre recouverte d'une couche de gel de silice et préalablement chauffée à 110 °C pendant 10 min.

*Phase mobile* : *méthyléthylcétone R*. Immédiatement avant l'utilisation de ce réactif, faites passer dans la méthyléthylcétone placée dans la cuve à chromatographie un courant d'azote pendant 10 min.

*Dépôt* : 5-10 µL et faites sécher dans un courant d'azote.

*Développement* : sur un parcours de 10-15 cm en environ 10 min.

Préparations radiopharmaceutiques

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteurs de retardement* : pyrophosphate d'étain et de [$^{99m}$Tc]technétium = 0,0 à 0,1 ; impureté B = 0,95 à 1,0.

*Limite* :

– *somme des impuretés A et B* : au maximum 10 pour cent de la radioactivité totale due au technétium-99m dans les chromatogrammes obtenus dans les essais A et B.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– la concentration de pyrophosphate de sodium exprimée en milligrammes par millilitre,
– la concentration d'étain exprimée en milligrammes par millilitre.

IMPURETÉS

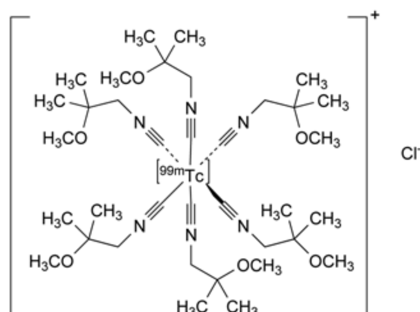
A. [$^{99m}$Tc]technétium sous forme colloïdale,

B. ion [$^{99m}$Tc]pertechnétate.

**01/2008:1926**

# TECHNÉTIUM ($^{99m}$Tc) (SESTAMIBI-), SOLUTION INJECTABLE DE

## Technetii ($^{99m}$Tc) sestamibi solutio iniectabilis




DÉFINITION

Solution stérile de chlorure de (*OC*-6-11)-hexakis[1-(isocyano-κ*C*)-2-méthoxy-2-méthylpropane][$^{99m}$Tc]technétium(I), qui peut être préparée par chauffage d'un mélange contenant du [tétrakis(2-méthoxy-2-méthylpropyl-1-isocyanure)cuivre (1+)] tétrafluoroborate, un agent chélateur faible, un sel stanneux et de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu par fission (0124)* ou de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium non obtenu par fission (0283).*

*Teneur* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du technétium-99m* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultats* : le spectre obtenu avec la solution à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une solution étalon de technétium-99m. L'énergie du photon gamma principal est de 0,141 MeV.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de l'impureté C sous Pureté radiochimique.

*Résultats* : le pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 5,0 à 6,0.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**Impureté A et autres impuretés polaires**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Plaque* : *plaque au gel de silice octadécylsilylé pour CCM R.*

*Phase mobile* : mélangez 10 volumes de *tétrahydrofurane R*, 20 volumes de solution d'*acétate d'ammonium R* à 38,5 g/L, 30 volumes de *méthanol R* et 40 volumes d'*acétonitrile R.*

*Dépôt* : environ 5 µL.

*Développement* : immédiat, sur un parcours de 6 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : déterminez la répartition de la radioactivité au moyen d'un détecteur de radioactivité.

*Facteurs de retardement* : impureté B et impuretés apolaires = 0 à 0,1 ; impureté C et sestamibi-technétium-99m = 0,3 à 0,6 ; impureté A et autres impuretés polaires = 0,9 à 1,0.

*Limite* : voir essai Impureté B.

**Impureté B**. Chromatographie sur papier (*2.2.26*). *Si aucune activité n'est décelée avec un facteur de retardement de 0 à 0,1 dans l'essai de l'impureté A et autres impuretés polaires, l'impureté B est absente et l'essai de l'impureté B peut être omis.*

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Papier* : *papier pour chromatographie R.*

*Phase mobile* : mélangez des volumes égaux d'*acétonitrile R*, d'*acide acétique 0,5 M* et de solution de *chlorure de sodium R* à 20 g/L.

*Dépôt* : environ 5 µL.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : déterminez la répartition de la radioactivité au moyen d'un détecteur de radioactivité.

*Facteurs de retardement* : impureté B = 0 à 0,1 ; impureté A, impureté C et sestamibi-technétium-99m = 0,8 à 1,0.

*Limite* :

– *somme de l'impureté A et autres impuretés polaires et de l'impureté B* : au maximum 5 pour cent de la radioactivité totale.

**Impureté C**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solution témoin*. Dans un flacon de la *trousse pour radiomarquage de sestamibi SCR*, ajoutez 3 mL de solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L contenant 700 MBq à 900 MBq de solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium (obtenu ou non par fission). Chauffez le mélange au bain-marie pendant 10 min et laissez refroidir à température ambiante.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases, postgreffé R* (5 µm) à particules sphériques.

*Phase mobile* : mélangez 20 volumes d'*acétonitrile R*, 35 volumes de solution de *sulfate d'ammonium R* à 6,6 g/L et 45 volumes de *méthanol R.*

*Débit* : 1,5 mL/min.

Préparations radiopharmaceutiques

*Détection* : détecteur de radioactivité.

*Injection* : 25 µL.

*Enregistrement* : 25 min.

*Rétention relative* par rapport au sestamibi-technétium-99m : impureté C = environ 1,3.

*Conformité du système* : solution témoin :

- le chromatogramme est semblable au chromatogramme fourni avec la *trousse pour radiomarquage de sestamibi SCR*,
- *rétention relative* par rapport au sestamibi-technétium-99m : impureté C = au minimum 1,2.

*Limites* :

- *impureté C* : au maximum 3 pour cent de la radioactivité totale,
- *sestamibi-technétium-99m* : au minimum 94 pour cent de la radioactivité totale.

Calculez le pourcentage de radioactivité due au sestamibi-technétium-99m à l'aide de l'expression :

$$\frac{(100 - B) \times T}{100}$$

*B* = pourcentage de radioactivité due à l'impureté B déterminé dans l'essai de l'impureté B sous Pureté radiochimique,

*T* = surface du pic dû au sestamibi-technétium-99m dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

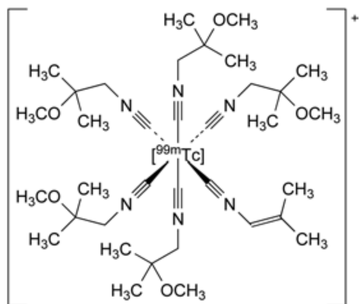
RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

IMPURETÉS

A. $[^{99m}Tc]O_4^-$ : ion ($^{99m}$Tc)pertechnétate,

B. technétium-99m sous forme colloïdale,




C. (*OC*-6-22)-pentakis[1-(isocyano-κ*C*)-2-méthoxy-2-méthylpropane][1-(isocyano-κ*C*)-2-méthylprop-1-ène][$^{99m}$Tc]technétium(1+).

**01/2008:0131**
**corrigé 7.0**

# TECHNÉTIUM ($^{99m}$Tc) (SOUFRE COLLOÏDAL ET DE), SOLUTION INJECTABLE DE

## Sulfuris colloidalis et technetii ($^{99m}$Tc) solutio iniectabilis

DÉFINITION

Dispersion colloïdale stérile et apyrogène de soufre dont les micelles sont marquées au technétium-99m. La solution est préparée à partir de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu par fission (0124)* ou de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium non obtenu par fission (0283)*. Il peut être stabilisé par un agent protecteur des colloïdes à base de gélatine. Le pH de la solution peut être ajusté par addition d'un tampon approprié tel que des solutions tampons acétate, citrate ou phosphate. La solution contient une quantité variable de soufre colloïdal suivant le procédé de fabrication.

*Technétium-99m* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide ou opalescent, incolore ou jaunâtre.

*Période et nature du rayonnement du technétium-99m* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides*.

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultat* : l'énergie du photon gamma principal du technétium-99m est de 0,141 MeV.

B. Examinez le chromatogramme obtenu dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultat* : le facteur de retardement du pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est 0,0 à 0,1.

C. Dans un tube à essai d'une longueur de 100 mm et d'un diamètre intérieur de 16 mm, évaporez à siccité 0,2 mL de la préparation à examiner. Dissolvez le soufre en agitant le résidu avec 0,2 mL de *pyridine R* et ajoutez environ 20 mg de *benzoïne R*. Obturez l'orifice du tube avec un papier filtre imbibé de *solution d'acétate de plomb R*. Chauffez le tube à essai dans un bain de glycérol à 150 °C. Le papier brunit peu à peu.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 4,0 à 7,0.

**Distribution physiologique**. Injectez dans la veine caudale de 3 souris, pesant chacune 20-25 g, au maximum 0,2 mL de la préparation à examiner. Euthanasiez les animaux 20 min après l'injection. Prélevez le foie, la rate et les poumons. Mesurez la radioactivité de ces organes à l'aide d'un appareil approprié. Mesurez la radioactivité du reste du corps de chaque animal après avoir prélevé la queue. Déterminez le pourcentage de radioactivité dans le foie, la rate et les poumons à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A}{B} \times 100$$

*A* = la radioactivité de l'organe considéré,

*B* = la radioactivité du foie, de la rate, des poumons et du reste du corps de l'animal.

Dans chacune des 3 souris, au minimum 80 pour cent de la radioactivité se trouvent dans le foie et dans la rate et au maximum 5 pour cent dans les poumons. Si, dans 1 seule des 3 souris, la distribution de la radioactivité n'est pas conforme aux proportions prescrites, répétez l'essai sur 3 autres souris. La préparation à examiner satisfait à l'essai si la distribution de la radioactivité correspond aux proportions prescrites dans 5 des 6 souris utilisées. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Pyrogènes**. La préparation à examiner satisfait à l'essai des pyrogènes prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. Injectez à chaque lapin, par kilogramme de masse corporelle, au minimum 0,1 mL de la préparation à examiner. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{99m}$Tc]Technétium sous forme colloïdale**. Chromatographie ascendante sur papier (*2.2.26*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Papier* : *papier pour chromatographie R*.

*Phase mobile* : solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L.

*Dépôt* : 10 μL.

*Développement* : immédiatement, sur un parcours de 10-15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteurs de retardement* : [$^{99m}$Tc]technétium sous forme colloïdale = 0,0 à 0,1 ; impureté A = environ 0,6 ; autres impuretés = 0,8 à 0,9.

*Limite* :

– *[$^{99m}$Tc]technétium sous forme colloïdale* : au minimum 92 pour cent de la radioactivité totale due au technétium-99m.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

IMPURETÉS

A. ion [$^{99m}$Tc]pertechnétate.

**01/2008:0643**
**corrigé 7.0**

# TECHNÉTIUM ($^{99m}$Tc) (SUCCIMÈRE-), SOLUTION INJECTABLE DE

## Technetii ($^{99m}$Tc) succimeri solutio iniectabilis

DÉFINITION

Solution stérile sous forme d'un complexe de technétium-99m et d'acide *meso*-2,3-dimercaptosuccinique. Elle est préparée à partir de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium obtenu par fission (0124)* ou de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium non obtenu par fission (0283)*. La solution injectable contient une substance réductrice telle qu'un sel d'étain et peut contenir des stabilisants, des antioxydants tels que l'acide ascorbique et des additifs inertes.

*Technétium-99m* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité dûe au technétium-99m, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du technétium-99m* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides*.

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultat* : l'énergie du photon gamma principal du technétium-99m est de 0,141 MeV.

B. Examinez le chromatogramme obtenu dans l'essai de la pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultat* : le facteur de retardement du pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est 0,0 à 0,1.

C. Dans un tube à essai, ajoutez à 1 mL de la préparation à examiner, 0,1 mL d'*acide acétique glacial R* et 1 mL d'une solution de *nitroprussiate de sodium R* à 20 g/L. Mélangez et superposez avec précaution une couche d'*ammoniaque concentrée R* sur la solution. Il se développe un anneau violet entre les 2 couches.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 2,3 à 3,5.

**Etain** : au maximum 1 mg/mL.

*Solution à examiner*. Prélevez 1,5 mL de la préparation à examiner et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide chlorhydrique R* à 103 g/L.

*Solution témoin*. Dissolvez 0,115 g de *chlorure stanneux R* dans une solution d'*acide chlorhydrique R* à 103 g/L et complétez à 1000,0 mL avec la même solution.

A 1,0 mL de chaque solution, ajoutez 0,05 mL d'*acide thioglycolique R*, 0,1 mL de *réactif au dithiol R*, 0,4 mL d'une solution de *laurilsulfate de sodium R* à 20 g/L, et 3,0 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 21 g/L. Mélangez. Laissez reposer pendant 60 min. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 540 nm en utilisant une solution d'*acide chlorhydrique R* à 21 g/L comme liquide de compensation. L'absorbance de la solution à examiner n'est pas supérieure à celle de la solution témoin.

**Distribution physiologique**. Injectez un volume de préparation à examiner ne dépassant pas 0,2 mL et contenant au maximum 0,1 mg d'acide dimercaptosuccinique, dans une veine appropriée, telle qu'une veine caudale ou une veine saphène de 3 rats, pesant chacun 150-250 g. Mesurez la radioactivité dans la seringue avant et après l'injection. Euthanasiez les rats 1 h après l'injection. Prélevez les reins, le foie, l'estomac, les poumons et, si l'injection a été effectuée dans une veine caudale, la queue. Mesurez la radioactivité de ces organes à l'aide d'un appareil approprié. Déterminez le pourcentage de radioactivité dans chaque organe par rapport à la radioactivité totale calculée comme étant la différence entre les 2 mesures de la seringue, moins l'activité dans la queue si l'injection a été effectuée dans une veine caudale.

Dans au moins 2 des 3 rats, la radioactivité est :

– dans les reins : au minimum 40 pour cent,
– dans le foie : au maximum 10,0 pour cent,
– dans les poumons : au maximum 5,0 pour cent,
– dans l'estomac : au maximum 2,0 pour cent.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**Impureté A**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* ; utilisez une feuille de fibre de verre recouverte de gel de silice et préalablement chauffée à 110 °C pendant 10 min.

*Phase mobile* : *méthyléthylcétone R*.

*Dépôt* : 5-10 μL.

*Développement* : immédiatement, sur un parcours de 10-15 cm en environ 10 min.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteurs de retardement* : succimer [$^{99m}$Tc]technétium = 0,0 à 0,1 ; impureté A = 0,9 à 1,0.

*Limites* :

– *succimer [$^{99m}$Tc]technétium* : au minimum 95,0 pour cent de la radioactivité totale due au technétium-99m,
– *impureté A* : au maximum 2,0 pour cent de la radioactivité totale due au technétium-99m.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

IMPURETÉS

A. ion [$^{99m}$Tc]pertechnétate.

**01/2009:0126**
**corrigé 7.0**

# TECHNÉTIUM ($^{99m}$Tc) (SULFURE DE RHÉNIUM COLLOÏDAL ET DE), SOLUTION INJECTABLE DE

## Rhenii sulfidi colloidalis et technetii ($^{99m}$Tc) solutio iniectabilis

DÉFINITION

Dispersion colloïdale stérile de sulfure de rhénium dont les micelles sont marquées au technétium-99m. Elle est préparée à partir de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium (obtenu par fission) (0124)* ou de la *Solution injectable de pertechnétate ($^{99m}$Tc) de sodium (non obtenu par fission) (0283)*. Elle est stabilisée par addition de gélatine. Le pH de la solution peut être ajusté par addition d'un tampon approprié tel que le tampon citrate.

*Technétium-99m* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au technétium-99m, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Rhénium* : au maximum 0,22 mg/mL.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide brun clair.

*Période et nature du rayonnement du technétium-99m* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides*.

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma.

*Résultat* : l'énergie du photon gamma principal du technétium-99m est de 0,141 MeV.

B. Examinez le chromatogramme obtenu dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai).

*Résultat* : le facteur de retardement du pic principal du radiochromatogramme obtenu avec la solution à examiner est 0,0 à 0,1.

C. A 1 mL de la préparation à examiner, ajoutez 1 mL d'une solution de *chlorure stanneux R* à 200 g/L dans l'*acide chlorhydrique R*, 5 mL d'*acide chlorhydrique R* et 5 mL d'une solution de *thiourée R* à 50 g/L. Il se développe une coloration jaune.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 4,0 à 7,0.

**Rhénium** : au maximum 0,22 mg/mL.

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Solutions de référence*. A partir d'une solution contenant 100 µg de *perrhénate de potassium R* correspondant à 60 ppm de rhénium (Re) et 240 µg de *thiosulfate de sodium R* par millilitre, préparez une gamme de dilutions et complétez au même volume final avec de l'*eau R*.

A 1 ml de la solution à examiner et à 1 mL de chaque solution de référence, ajoutez 1 mL d'une solution de *chlorure stanneux R* à 200 g/L dans l'*acide chlorhydrique R*, 5 mL d'*acide chlorhydrique R* et 5 mL d'une solution de *thiourée R* à 50 g/L, puis complétez à 25,0 mL avec de l'*eau R*. Laissez reposer pendant 40 min. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de chaque solution à 400 nm en utilisant un blanc réactif comme liquide de compensation. A partir des absorbances obtenues avec chaque solution de référence, construisez la courbe d'étalonnage et calculez la concentration en rhénium de la préparation à examiner.

**Distribution physiologique**. Injectez dans une veine caudale de 3 souris, pesant chacune 20-25 g, au maximum 0,2 mL de la préparation à examiner. Euthanasiez les animaux 20 min après l'injection. Prélevez le foie, la rate et les poumons. Mesurez la radioactivité de ces organes à l'aide d'un appareil approprié. Mesurez la radioactivité du reste du corps de chaque animal après avoir prélevé la queue. Déterminez le pourcentage de radioactivité dans le foie, la rate et les poumons à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A}{B} \times 100$$

$A$ = radioactivité de l'organe considéré,

$B$ = radioactivité totale du foie, de la rate, des poumons et du reste du corps de l'animal.

Dans chacune des 3 souris, au minimum 80 pour cent de la radioactivité se trouvent dans le foie et dans la rate et au maximum 5 pour cent dans les poumons. Si, dans une seule souris, la distribution de la radioactivité n'est pas conforme, répétez l'essai sur 3 autres souris. La préparation à examiner satisfait à l'essai si la distribution de la radioactivité correspond aux proportions prescrites ci-dessus dans 5 des 6 souris utilisées. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*. La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

**Endotoxines bactériennes** (*2.6.14*) : moins de 175/$V$ UI/mL, $V$ étant la dose maximale recommandée en millilitres.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**[$^{99m}$Tc]Technétium sous forme colloïdale**. Chromatographie ascendante sur papier (*2.2.26*).

*Solution à examiner*. La préparation à examiner.

*Papier* : *papier pour chromatographie R*.

*Phase mobile* : solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L.

*Dépôt* : 10 µL.

*Développement* : immédiatement sur un parcours de 10-15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : détecteur approprié permettant de déterminer la distribution de la radioactivité.

*Facteurs de retardement* : [$^{99m}$Tc]technétium sous forme colloïdale = 0,0 à 0,1 ; impureté A = environ 0,6 ; autres impuretés = 0,8 à 0,9.

*Limite* :

– *[$^{99m}$Tc]technétium sous forme colloïdale* : au minimum 92 pour cent de la radioactivité totale due au technétium-99m.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique la concentration de rhénium exprimée en milligrammes par millilitre.

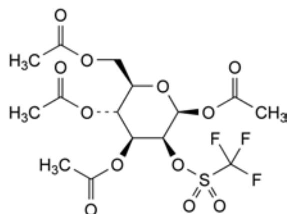
IMPURETÉS

A. ion [$^{99m}$Tc]pertechnétate.

01/2011:2294

# TÉTRA-*O*-ACÉTYL-MANNOSE (TRIFLATE DE) POUR PRÉPARATIONS RADIOPHARMACEUTIQUES

## Tetra-*O*-acetylmannosi triflas ad radiopharmaceutica



$C_{15}H_{19}F_3O_{12}S$ $M_r$ 480,4

DÉFINITION

1,3,4,6-Tétra-*O*-acétyl-2-*O*-trifluorométhanesulfonyl-β-D-mannopyranose.

*Teneur* : 97,0 pour cent à 102,0 pour cent (substance desséchée).

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique.

*Solubilité* : pratiquement insoluble dans l'eau, très soluble dans l'acétonitrile, facilement soluble dans le chlorure de méthylène, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

IDENTIFICATION

Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*).

*Comparaison* : *triflate de tétra-O-acétyl-mannose SCR*.

ESSAI

**Pouvoir rotatoire spécifique** (*2.2.7*) : – 18,0 à – 22,0 (substance desséchée), mesuré à 25 °C .

Dissolvez 40,0 mg de substance à examiner dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

**Point de fusion** (*2.2.14*) : 117 °C à 122 °C.

**Substances apparentées**. Chromatographie liquide (*2.2.29*). *Préparez les solutions extemporanément.*

*Solution à examiner (a).* Dissolvez 100 mg de substance à examiner dans de l'*acétonitrile R* et complétez à 1,0 mL avec le même solvant.

*Solution à examiner (b).* Dissolvez 10,0 mg de substance à examiner dans de l'*acétonitrile R* et complétez à 5,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 10,0 mg de *triflate de tétra-O-acétyl-mannose SCR* dans de l'*acétonitrile R* et complétez à 5,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (b).* Prélevez 1,0 mL de solution à examiner (a) et complétez à 10,0 mL avec de l'*acétonitrile R*. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec de l'*acétonitrile R*.

*Solution témoin (c).* Dissolvez 10 mg de *1,3,4,6-tétra-O-acétyl-β-D-mannopyranose R* (impureté A) dans 5 mL d'*acétonitrile R*. Mélangez 1 mL de solution et 1 mL de solution témoin (a).

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
– *température* : 25 °C.

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *eau R*,
– *phase mobile B* : *acétonitrile R1*,

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 1 | 80 | 20 |
| 1 - 20 | 80 → 55 | 20 → 45 |
| 20 - 35 | 55 | 45 |
| 35 - 45 | 55 → 0 | 45 → 100 |
| 45 - 50 | 0 | 100 |

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 220 nm.

*Injection* : 20 µL de solution à examiner (a) et des solutions témoins (b) et (c).

*Rétention relative* par rapport au triflate de tétra-*O*-acétyl-mannose (temps de rétention = environ 29 min) : impureté A = environ 0,2.

*Conformité du système* : solution témoin (c) :

– *résolution* : au minimum 5,0 entre les pics dus au triflate de tétra-*O*-acétyl-mannose et à l'impureté A.

*Limites* :

– *impureté A* : au maximum 2 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,2 pour cent),
– *toute autre impureté* : pour chaque impureté, au maximum la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,10 pour cent),
– *total* : au maximum 5 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,5 pour cent),
– *limite d'exclusion* : 0,5 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,05 pour cent).

**Impureté B**. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (*2.2.33*), en utilisant la RMN $^{19}$F. *Préparez les solutions extemporanément.*

*Solution à examiner.* Dissolvez 10,0 mg de substance à examiner dans de l'*acétonitrile deutérié R* et complétez à 5,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 10,0 mg de *triflate de tétra-O-acétyl-mannose SCR* dans de l'*acétonitrile deutérié R* et complétez à 5,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 2,0 mg de *trifluorométhanesulfonate de lithium R* (sel de lithium de l'impureté B) dans de l'*acétonitrile deutérié R* et complétez à 5,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (c).* Mélangez 1,0 mL de solution témoin (a) et 10 µL de solution témoin (b).

*Limite* : la surface du pic identifié dans le spectre obtenu avec la solution à examiner à – 78 ppm est inférieure à celle du pic identifié dans le spectre obtenu avec la solution témoin (c) pour un même déplacement chimique (0,2 pour cent).

**Perte à la dessiccation** : au maximum 0,6 pour cent, déterminé par thermogravimétrie (*2.2.34*) sur 25 mg de substance à examiner. Chauffez jusqu'à 80 °C, en élevant la température de 2,5 °C/min.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai des substances apparentées, avec la modification suivante.

*Injection* : solution à examiner (b) et solution témoin (a).

Calculez la teneur pour cent en $C_{15}H_{19}F_3O_{12}S$ en tenant compte de la teneur déclarée du *triflate de tétra-O-acétyl-mannose SCR*.

CONSERVATION

A une température de 2 °C à 8 °C, en récipient étanche, à l'abri de la lumière.

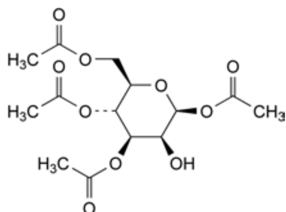
Préparations radiopharmaceutiques

ÉTIQUETAGE

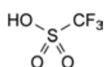
L'étiquette recommande de contrôler la substance dans un essai de production avant de l'utiliser pour la fabrication de préparations radiopharmaceutiques. Ceci permet de s'assurer que, dans des conditions de production spécifiées, la substance permet de produire une préparation radiopharmaceutique de qualité spécifiée et en quantité souhaitée.

IMPURETÉS

*Impuretés spécifiées* : *A, B.*



A. 1,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-β-D-mannopyranose,



B. acide trifluorométhanesulfonique.

**01/2008:0571**
**corrigé 7.0**

# THALLIUM ($^{201}$Tl) (CHLORURE DE), SOLUTION INJECTABLE DE

## Thallosi ($^{201}$Tl) chloridi solutio iniectabilis

DÉFINITION

Solution stérile de thallium-201 sous forme de chlorure thalleux. Elle peut être rendue isotonique par addition de *Chlorure de sodium (0193)* et peut contenir un conservateur antimicrobien approprié tel que l'*Alcool benzylique (0256)*.

*Thallium-201* : 90 pour cent à 110 pour cent de la radioactivité due au thallium-201, indiquée à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

*Radioactivité spécifique* : au minimum 3,7 GBq par milligramme de thallium.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du thallium-201* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

A. Spectrométrie gamma et X.

*Résultats* : les énergies des photons gamma principaux du thallium-201 sont de 0,135 MeV, de 0,166 MeV et de 0,167 MeV ; les énergies des rayonnements X sont de 0,069 MeV à 0,083 MeV.

B. Examinez l'électrophorégramme obtenu dans l'essai de pureté radiochimique (voir Essai). La répartition de la radioactivité contribue à l'identification de la préparation.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 4,0 à 7,0.

**Thallium**.

*Solution à examiner.* A 0,5 mL de la préparation à examiner, ajoutez 0,5 mL d'une solution d'acide chlorhydrique à 220 g/L de HCl et 0,05 mL d'*eau de brome R,* et mélangez. Ajoutez 0,1 mL d'une solution d'*acide sulfosalicylique R* à 30 g/L. Après décoloration, ajoutez 1,0 mL d'une solution de *rhodamine B R* à 1 g/L. Ajoutez 4 mL de *toluène R* et agitez pendant 60 s. Séparez la couche de toluène.

*Solution témoin.* Préparez simultanément et dans les mêmes conditions que la solution à examiner, à partir de 0,5 mL de *solution à 10 ppm de thallium (Tl) R.*

La couche de toluène obtenue à partir de la solution à examiner n'est pas plus fortement colorée que la couche de toluène obtenue à partir de la solution témoin.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

**Thallium-201** : au minimum 97,0 pour cent de la radioactivité totale.

Spectrométrie gamma et X.

Déterminez les quantités relatives de thallium-200, thallium-201, thallium-202, plomb-201, plomb-203 et des autres impuretés radionucléidiques.

*Résultat* : la radioactivité totale due au thallium-202 est au maximum de 2,0 pour cent.

*PURETÉ RADIOCHIMIQUE*

**Ions [$^{201}$Tl]thalleux**. Electrophorèse de zone (*2.2.31*).

Utilisez une bande appropriée d'acétate de cellulose comme support et une solution d'*édétate de sodium R* à 18,6 g/L comme solution d'électrolyte. Trempez la bande dans la solution d'électrolyte pendant 45-60 min. En ayant soin de ne saisir que les bords extérieurs de la bande, sortez-la à l'aide d'une pince et placez-la entre 2 tampons absorbants afin d'éliminer l'excès de solution.

*Solution à examiner.* Mélangez des volumes égaux de la préparation à examiner et de la solution d'électrolyte.

Déposez au moins 5 µL de solution à examiner au centre de la bande et repérez le point d'application. Appliquez un champ électrique de 17 V/cm pendant au moins 10 min. Laissez la bande sécher à l'air. Déterminez la répartition de la radioactivité à l'aide d'un détecteur approprié.

*Résultat* : au minimum 95,0 pour cent de la radioactivité migre vers la cathode.

RADIOACTIVITÉ

Déterminez la radioactivité à l'aide d'un appareil étalonné.

IMPURETÉS

A. plomb-201,

B. plomb-203,

C. thallium-200,

D. thallium-202,

E. ion [$^{201}$Tl]thallique(III).

**01/2008:0133**
**corrigé 7.0**

# XÉNON ($^{133}$Xe) (SOLUTION INJECTABLE DE)

## Xenoni ($^{133}$Xe) solutio iniectabilis

DÉFINITION

Solution stérile de xénon-133 qui peut être rendue isotonique par addition du chlorure de sodium.

*Xénon-133* : 80 pour cent à 130 pour cent de la radioactivité due au xénon-133, à la date et à l'heure figurant sur l'étiquette.

La solution injectable de xénon ($^{133}$Xe) est contenue dans un récipient conçu de façon à permettre le prélèvement de solution sans introduction de bulles d'air. Ce récipient doit être rempli aussi complètement que possible. En présence d'une phase

gazeuse, le volume de celle-ci, évalué visuellement par rapport à un témoin approprié, ne dépasse pas 1 pour cent du volume de la solution.

CARACTÈRES

*Aspect* : solution limpide, incolore.

*Période et nature du rayonnement du xénon-133* : voir le chapitre général *5.7. Tableau des caractéristiques des radionucléides.*

IDENTIFICATION

Spectrométrie gamma et X.

*Comparaison* : préparation étalon de xénon-133 dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L.

*Résultats* : l'énergie du photon gamma principal du xénon-133 est de 0,081 MeV et l'énergie du rayonnement X provenant de la conversion interne est de 0,030 MeV à 0,035 MeV.

ESSAI

**pH** (*2.2.3*) : 5,0 à 8,0.

**Stérilité**. La préparation à examiner satisfait à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie *Préparations radiopharmaceutiques (0125).* La préparation peut être libérée pour emploi avant la fin de l'essai.

*PURETÉ RADIONUCLÉIDIQUE*

A. Spectrométrie gamma et X.

*Comparaison* : préparation étalon de xénon-133 dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L.

*Résultat* : le spectre obtenu avec la préparation à examiner ne diffère pas significativement du spectre obtenu avec une préparation étalon de xénon-133 dans une solution de *chlorure de sodium R* à 9 g/L, mises à part les différences éventuelles attribuables à la présence du xénon-131m et du xénon-133m.

B. Dans un récipient ouvert, introduisez 2 mL de la préparation à examiner. Faites passer un courant d'air dans le soluté pendant 30 min en prenant toutes les précautions qui s'imposent en raison de la dispersion de la radioactivité. Mesurez la radioactivité bêta et gamma résiduelle de la solution. Celle-ci ne diffère pas de manière significative de l'activité environnante détectée par l'appareillage.

RADIOACTIVITÉ

Pesez le récipient et son contenu. Déterminez-en la radioactivité totale à l'aide d'un appareil approprié par rapport à une préparation étalon de xénon-133 ou à l'aide d'un appareil approprié, étalonné au moyen d'une telle solution, dans des conditions rigoureusement identiques. Lors de l'emploi d'une chambre d'ionisation, les parois internes de celle-ci ne doivent pas atténuer le rayonnement de façon appréciable. Videz le récipient d'au minimum la moitié de son contenu et pesez-le à nouveau. Déterminez-en la radioactivité totale résiduelle comme décrit précédemment. A partir de ces mesures, calculez la concentration radioactive en xénon-133 dans la préparation à examiner.

*AVERTISSEMENT*

*En plus de la radioactivité contenue dans la solution, une quantité importante de xénon-133 peut être présente dans le dispositif d'obturation ou dans les parois du récipient. Ce phénomène doit être pris en considération dans l'application des réglementations en vigueur relatives au transport et à la conservation des substances radioactives et lors de la mise au rebut des récipients vides.*

IMPURETÉS

A. xénon-131m.

# FILS CHIRURGICAUX POUR USAGE HUMAIN

**01/2008:90004**

# INTRODUCTION

*Les monographies suivantes s'appliquent aux fils chirurgicaux pour usage humain : Fils chirurgicaux, catgut stérile (0317), Fils chirurgicaux, fils non résorbables stériles (0324), Fils chirurgicaux, fils résorbables synthétiques monofilaments stériles (0666) et Fils chirurgicaux, fils résorbables synthétiques tressés stériles (0667). Elles spécifient les caractéristiques et performances des fils et peuvent spécifier leurs méthodes d'identification. Les fils chirurgicaux constituent un dispositif médical au sens défini dans la Directive 93/42/CEE.*

*Les essais des monographies peuvent servir à établir la conformité à certaines des exigences essentielles définies dans l'Article 3 de la Directive 93/42/CEE :*

*Propriétés physiques : diamètre, charge admissible, résistance du sertissage, conditionnement, stérilité, informations fournies par le fabricant (voir section 13 de l'Annexe 1 de la Directive 93/42/CEE), étiquetage.*

*Pour établir la conformité aux autres exigences essentielles, on peut se référer aux normes harmonisées, définies dans l'Article 5 de la Directive 93/42/CEE, appropriées.*

**01/2008:0317**

# FILS CHIRURGICAUX, CATGUT STÉRILE

## Chorda resorbilis sterilis

DÉFINITION

Le catgut stérile est constitué par des fils de collagène provenant des tissus intestinaux de mammifères. Après nettoyage, les membranes sont découpées dans le sens de la longueur en bandes de largeur variable qui, lorsqu'elles sont assemblées en petit nombre, suivant les diamètres désirés, sont tordues sous tension, séchées, polies, sélectionnées et stérilisées. Les fils peuvent être traités par des substances chimiques telles que les sels de chrome pour ralentir leur résorption et le glycérol pour les rendre souples, à condition que ces agents ne diminuent pas la tolérance tissulaire.

Pour évaluer la conformité du produit quant à l'origine et au traitement des matières premières, ainsi qu'à la biocompatibilité, on peut se référer aux normes harmonisées appropriées.

Le catgut stérile est un dispositif employé en chirurgie pour la suture des plaies. Étant résorbable, il sert à rapprocher les tissus pendant le temps de la cicatrisation, puis est dégradé par protéolyse.

PRODUCTION

La production satisfait aux prescriptions en vigueur, relatives à l'utilisation de tissus animaux dans les dispositifs médicaux, notamment en ce qui concerne le risque de transmission d'agents d'encéphalopathies spongiformes animales.

Les normes harmonisées appropriées relatives aux méthodes appropriées et validées de stérilisation, au contrôle de l'environnement en cours de fabrication, à l'étiquetage et au conditionnement s'appliquent au catgut stérile.

Les propriétés physiques suivantes sont essentielles à l'efficacité et aux performances du catgut au moment de l'emploi et pendant toute la durée de vie fonctionnelle : diamètre constant, résistance initiale suffisante, sertissage solide.

Les spécifications ci-après ont été établies par rapport aux contraintes s'exerçant dans les conditions normales d'utilisation. Ces spécifications peuvent servir à démontrer, pour chaque lot de production, l'aptitude à l'emploi du catgut stérile pour la suture des plaies par les techniques chirurgicales habituelles.

ESSAI

*Pour le catgut conditionné dans un liquide conservateur, prélevez les fils hors de leur protecteur individuel de stérilité et procédez sans délai et successivement à la mesure de la longueur, du diamètre et de la charge minimale de rupture. Pour le catgut conditionné à l'état sec, immergez les fils dans de l'alcool R ou dans une solution de 2-propanol R à 90 pour cent V/V pendant 24 h, puis procédez sans délai aux mesures indiquées.*

**Longueur**. Mesurez la longueur de chaque fil sans le soumettre à une tension supérieure à celle que nécessite son maintien en position rectiligne. La longueur n'est pas inférieure à 90 pour cent de celle qui est indiquée sur l'étiquette et ne dépasse pas 350 cm.

**Diamètre**. Effectuez les mesures sur 5 fils à l'aide d'un instrument approprié muni d'un disque presseur, d'un diamètre de 10 mm à 15 mm, permettant d'atteindre une précision d'au moins 0,002 mm. Ajustez la masse du disque presseur et les dispositifs mobiles s'y rattachant de façon que la charge totale appliquée sur le fil à examiner soit de 100 ± 10 g. Au cours de l'opération, abaissez lentement le disque presseur sur le fil en évitant d'écraser ce dernier. Mesurez le diamètre tous les 30 cm sur toute la longueur du fil. Pour un fil d'une longueur inférieure à 90 cm, mesurez le diamètre en 3 points situés approximativement à distance égale sans soumettre le fil à une tension supérieure à celle que nécessite son maintien en position rectiligne. La moyenne des mesures effectuées sur les fils à examiner et deux tiers au moins des mesures effectuées sur chaque fil sont comprises dans les limites indiquées dans la colonne A du tableau 0317.-1 pour le numéro de diamètre correspondant. En aucun cas une mesure d'un des fils n'est située hors des limites données dans la colonne B du tableau 0317.-1 pour le numéro de diamètre correspondant.

Tableau 0317.-1. – *Diamètres et charges minimales de rupture*

| Numéro de diamètre | Diamètre (millimètres) | | | | Charge de rupture (newtons) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | | B | | C | D |
| | min. | max. | min. | max. | | |
| 0,1 | 0,010 | 0,019 | 0,005 | 0,025 | - | - |
| 0,2 | 0,020 | 0,029 | 0,015 | 0,035 | - | - |
| 0,3 | 0,030 | 0,039 | 0,025 | 0,045 | 0,20 | 0,05 |
| 0,4 | 0,040 | 0,049 | 0,035 | 0,060 | 0,30 | 0,10 |
| 0,5 | 0,050 | 0,069 | 0,045 | 0,085 | 0,40 | 0,20 |
| 0,7 | 0,070 | 0,099 | 0,060 | 0,125 | 0,70 | 0,30 |
| 1 | 0,100 | 0,149 | 0,085 | 0,175 | 1,8 | 0,40 |
| 1,5 | 0,150 | 0,199 | 0,125 | 0,225 | 3,8 | 0,70 |
| 2 | 0,200 | 0,249 | 0,175 | 0,275 | 7,5 | 1,8 |
| 2,5 | 0,250 | 0,299 | 0,225 | 0,325 | 10 | 3,8 |
| 3 | 0,300 | 0,349 | 0,275 | 0,375 | 12,5 | 7,5 |
| 3,5 | 0,350 | 0,399 | 0,325 | 0,450 | 20 | 10 |
| 4 | 0,400 | 0,499 | 0,375 | 0,550 | 27,5 | 12,5 |
| 5 | 0,500 | 0,599 | 0,450 | 0,650 | 38,0 | 20,0 |
| 6 | 0,600 | 0,699 | 0,550 | 0,750 | 45,0 | 27,5 |
| 7 | 0,700 | 0,799 | 0,650 | 0,850 | 60,0 | 38,0 |
| 8 | 0,800 | 0,899 | 0,750 | 0,950 | 70,0 | 45,0 |

**Charge minimale de rupture**. Déterminez la charge minimale de rupture sur un noeud simple obtenu comme suit : passez l'extrémité tenue dans la main droite par-dessus celle tenue dans la main gauche et tirez une des extrémités à travers la boucle ainsi formée (voir figure 0317.-1), puis tirez sur les extrémités pour serrer le noeud. Effectuez l'essai sur 5 fils à raison de 2 essais sur les fils dont la longueur dépasse 75 cm et d'un seul essai sur les fils plus courts. Déterminez la charge de rupture à l'aide d'un dynamomètre approprié. L'appareil est muni de 2 attaches servant à fixer le fil, dont l'une est mobile et se déplace à une vitesse de course constante de 30 cm/min. Les dispositifs d'attache permettent la fixation des fils à examiner sans glissement possible. Au début de l'essai, la longueur du fil entre les serre-fils est de 12,5 cm à 20 cm. Le noeud se trouve à égale distance entre les points de fixation. Déclenchez le mouvement du serre-fils et notez la force requise pour rompre le fil. Lorsque le fil se rompt dans ses attaches ou à moins de 1 cm de celles-ci, répétez l'essai sur un nouveau fil, le résultat d'un essai défectueux ne devant pas être pris en considération dans le calcul final. La moyenne de toutes les lectures prises en compte est égale ou supérieure à la valeur indiquée dans la colonne C du tableau 0317.-1, et aucune valeur n'est inférieure à la valeur indiquée dans la colonne D pour le numéro de diamètre correspondant.

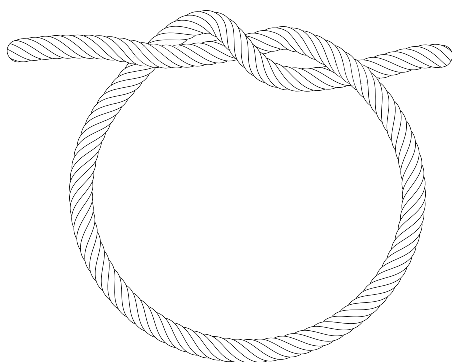


Figure 0317.-1. – *Noeud simple*

**Composés solubles du chrome**. Introduisez 0,25 g de fil dans une fiole conique contenant 1 mL d'*eau R* pour 10 mg d'échantillon. Fermez la fiole et laissez reposer à 37 ± 0,5 °C pendant 24 h. Refroidissez et décantez la solution. Introduisez 5 mL de cette solution dans un tube à essai de petite taille et ajoutez 2 mL d'une solution de *diphénylcarbazide R* à 10 g/L dans l'*alcool R* et 2 mL d'*acide sulfurique dilué R*. La solution n'est pas plus fortement colorée qu'une solution témoin préparée simultanément avec 5 mL d'une solution contenant 2,83 μg de *dichromate de potassium R* par millilitre, 2 mL d'*acide sulfurique dilué R* et 2 mL d'une solution de *diphénylcarbazide R* à 10 g/L dans l'*alcool R* (1 ppm Cr).

**Résistance du sertissage**. Si le catgut est muni d'une aiguille sertie qui n'est pas déclarée détachable, il satisfait à l'essai de résistance du sertissage. Utilisez un dynamomètre approprié tel que celui qui est décrit pour la mesure de la charge minimale de rupture. Effectuez l'essai sur 5 fils. Fixez l'aiguille sertie sur le fil (sans noeud) dans la mâchoire de l'appareil, de façon que la partie sertie de l'aiguille soit complètement en dehors de la mâchoire et dirigée dans la direction de la tension exercée sur le fil. Déclenchez le mouvement du serre-fils et notez la force requise pour rompre le fil ou pour séparer le fil de l'aiguille. La moyenne des 5 déterminations et toutes les valeurs individuelles correspondent aux valeurs indiquées dans le tableau 0317.-2 pour le numéro de diamètre correspondant. Si une valeur ne satisfait pas à la norme individuelle, répétez l'essai sur 10 autres fils. Le fil à examiner satisfait à l'essai si ces 10 valeurs ne sont pas inférieures à la limite fixée pour la valeur individuelle (tableau 0317.-2) correspondant au numéro indiqué.

Tableau 0317.-2. – *Charges minimales de rupture pour les aiguilles serties sur fil*

| Numéro de diamètre | Valeur moyenne (newtons) | Valeur individuelle (newtons) |
|---|---|---|
| 0,5 | 0,50 | 0,25 |
| 0,7 | 0,80 | 0,40 |
| 1 | 1,7 | 0,80 |
| 1,5 | 2,3 | 1,1 |
| 2 | 4,5 | 2,3 |
| 2,5 | 5,6 | 2,8 |
| 3 | 6,8 | 3,4 |
| 3,5 | 11,0 | 4,5 |
| 4 | 15,0 | 4,5 |
| 5 | 18,0 | 6,0 |

CONSERVATION (CONDITIONNEMENT)

Les fils de catgut stérile sont conditionnés sous un protecteur individuel de stérilité qui permet le retrait et l'utilisation du fil dans des conditions aseptiques. Le catgut stérile peut être maintenu à l'état sec ou dans un liquide qui peut contenir un conservateur antimicrobien, à l'exclusion de tout antibiotique.

Les protecteurs individuels de stérilité contenant les fils (emballage primaire) sont placés dans un emballage protecteur (boîte) qui assure le maintien des propriétés physiques et mécaniques jusqu'au moment de l'emploi.

Il convient de se référer également aux normes harmonisées relatives au conditionnement des dispositifs médicaux.

ÉTIQUETAGE

Il est possible de se référer aux normes relatives à l'étiquetage des dispositifs médicaux.

Les informations indispensables à l'identification du produit sont indiquées sur ou dans chaque protecteur individuel de stérilité (emballage primaire) et sur l'emballage protecteur (boîte). Ces informations comprennent au minimum :

- le diamètre nominal,
- la longueur, en centimètres ou en mètres,
- le cas échéant, que l'aiguille est détachable,
- la désignation du produit,
- la destination (fil chirurgical, résorbable).

**01/2008:0324**

# FILS CHIRURGICAUX, FILS NON RÉSORBABLES STÉRILES

## Fila non resorbilia sterilia

DÉFINITION

Les fils non résorbables stériles sont des fils qui, introduits dans un organisme vivant, n'y sont pas métabolisés. Ils ont des origines diverses : animale, végétale, métallique ou synthétique. Ils se présentent en monofilaments cylindriques ou multifils eux-mêmes constitués de fibres élémentaires qui, une fois assemblées, peuvent être retordues, câblées ou tressées, et éventuellement gainées et peuvent être traitées de façon à les rendre non capillaires. Les fils peuvent être teints.

Pour évaluer la conformité du produit quant à l'origine et au traitement des matières premières ainsi qu'à la biocompatibilité, il convient de se référer aux normes harmonisées appropriées.

Les fils non résorbables stériles sont employés en chirurgie pour la suture des plaies. Ils servent à rapprocher les tissus pendant le temps de la cicatrisation.

Les matières premières généralement utilisées sont les suivantes.

**Soies (Filum bombycis)**

Les soies tressées et stériles sont obtenues par tressage d'un nombre variable, suivant le diamètre désiré, de fils de soie décreusée provenant du dévidage des cocons du ver à soie, *Bombyx mori* L.

**Lin (Filum lini)**

Le fil de lin stérile est constituée par les fibres péricycliques de la tige de *Linum usitatissimum* L. Ces fibres élémentaires, d'une longueur de 2,5 cm à 5 cm, sont assemblées en faisceaux de 30 cm à 80 cm, puis en fils continus de diamètre approprié.

**Poly(téréphtalate d'éthylène) (Filum ethyleni polyterephthalici)**

Le fil en poly(téréphtalate d'éthylène) stérile est obtenu par passage à la filière de poly(téréphtalate d'éthylène). Le fil est préparé par tressage de fils très fins, assemblés en nombre variable suivant le diamètre désiré.

**Polyamide-6 (Filum polyamidicum-6)**

Le fil en polyamide-6 stérile est obtenu par passage à la filière d'une matière plastique synthétisée par polymérisation d'ε-caprolactame. Le fil en polyamide-6 se présente en monofilaments cylindriques lisses ou en fils tressés, ou en fils légèrement tordus et gainés à l'aide d'une couche de la même substance.

**Polyamide-6/6 (Filum polyamidicum-6/6)**

Le fil en polyamide-6/6 stérile est obtenu par passage à la filière d'une matière plastique synthétisée par polycondensation d'hexaméthylènediamine et d'acide adipique. Le fil en polyamide 6/6 se présente en monofilaments cylindriques lisses ou en fils tressés, ou en fils légèrement tordus et gainés à l'aide d'une couche de la même substance.

**Polypropylène (Filum polypropylenicum)**

Le fil en polypropylène est obtenu par passage à la filière. Il se présente en monofilaments cylindriques lisses.

**Acier inoxydable, fil monofilament et multifilament (Filum aciei irrubiginibilis monofilamentum/multifilamentum)**

Le fil en acier inoxydable stérile a une composition chimique telle que spécifiée dans la norme ISO 5832-1 - Implants chirurgicaux - Produits à base de métaux - Partie 1 : Acier corroyé inoxydable, et il est conforme à l'ISO 10334 - Implants chirurgicaux - Fils malléables pour sutures et autres applications chirurgicales.

Le fil en acier inoxydable se présente en monofilaments cylindriques lisses ou en fils tordus ou tressés.

**Poly(difluorure de vinylidène) (PVDF) (Filum poly(vinylideni difluoridum))**

Le fil en PVDF stérile est obtenu par passage à la filière d'une matière plastique synthétisée par polymérisation de 1,1-difluoroéthylène. Il se présente en monofilaments cylindriques lisses.

IDENTIFICATION

Les fils non résorbables peuvent être identifiés par des essais chimiques. Les produits d'origine naturelle peuvent également être identifiés par examen microscopique de la morphologie des fibres. Une identification par spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*) ou par calorimétrie différentielle à balayage convient pour les produits synthétiques.

**Identification de la soie**

A. Effilochez l'extrémité d'un fil de soie tressée, à l'aide d'une aiguille ou d'une pince, afin d'en isoler quelques fibres. Certaines fibres présentent parfois de très fines stries longitudinales, parallèles à l'axe de la fibre. Examinée au microscope, la coupe transversale est plus ou moins triangulaire ou semi-circulaire, à bords arrondis, sans lumen.

B. Imprégnées de *solution d'iodure de potassium iodée R*, les fibres isolées prennent une teinte jaune clair.

**Identification du lin**

A. Effilochez l'extrémité d'un fil de lin à l'aide d'une aiguille ou d'une pince, afin d'en isoler les fibres individuelles. Examinées au microscope, les fibres ont une largeur de 12 µm à 31 µm et présentent dans la majeure partie de leur longueur des parois épaisses, parfois finement striées longitudinalement et un lumen mince. Les fibres se rétrécissent lentement et se terminent par une pointe longue et fine. Par endroit, la fibre présente des renflements unilatéraux avec des lignes transversales.

B. Imprégnées de *solution de chlorure de zinc iodée R*, les fibres isolées prennent une teinte bleu-violet.

**Identification du poly(téréphtalate d'éthylène)**

Il est pratiquement insoluble dans la plupart des solvants organiques usuels mais il est attaqué par les solutions fortement alcalines. Il n'est pas compatible avec les phénols.

A. Chauffés dans 50 mL de *diméthylformamide R*, 50 mg de fil se dissolvent difficilement.

B. Dans 10 mL d'*acide chlorhydrique R1*, introduisez environ 50 mg de fil. Il reste intact, même après environ 6 h.

**Identification du fil en polyamide-6**

Il est pratiquement insoluble dans les solvants organiques usuels et n'est pas attaqué par les solutions alcalines diluées, telles qu'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 100 g/L, mais l'est par les acides minéraux dilués, par exemple une solution d'*acide sulfurique R* à 20 g/L, et à chaud par l'*acide acétique glacial R* et par une solution d'*acide formique anhydre R* à 70 pour cent *m/m*.

A. Dans un tube de verre scellé, chauffez à 110 °C, environ 50 mg de fil en polyamide-6 stérile, en présence de 0,5 mL d'*acide chlorhydrique R1* pendant 18 h. Laissez reposer pendant 6 h. Il ne se forme pas de cristaux.

B. 50 mg de fil en polyamide-6 stérile se dissolvent dans 20 mL d'une solution d'*acide formique anhydre R* à 70 pour cent *m/m*.

**Identification du fil en polyamide-6/6**

Il est pratiquement insoluble dans les solvants organiques usuels et n'est pas attaqué par les solutions alcalines diluées, telles qu'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 100 g/L, mais l'est par les acides minéraux dilués, par exemple une solution d'*acide sulfurique R* à 20 g/L, et à chaud par l'*acide acétique glacial R*, et par une solution d'*acide formique anhydre R* à 80 pour cent *m/m*.

A. Mis au contact d'une flamme, le fil en polyamide-6/6 fond et brûle en formant une perle dure et en dégageant une odeur caractéristique rappelant celle du céleri.

B. Dans un tube à calcination maintenu en position verticale, introduisez environ 50 mg de fil en polyamide-6/6 stérile. Chauffez doucement jusqu'à dégagement de vapeurs épaisses. Dès que celles-ci ont envahi le tube, retirez-le de la flamme et placez à l'intérieur et au contact des vapeurs une bande de *papier au nitrobenzaldéhyde R*. Il se développe lentement une coloration brun-violet qui pâlit lentement à l'air et disparaît presque instantanément par lavage à l'*acide sulfurique dilué R*.

C. Dans 10 mL d'*acide chlorhydrique R1*, introduisez environ 50 mg de fil en polyamide-6/6 stérile. Il se désintègre à froid et se dissout en quelques minutes.

D. 50 mg de fil en polyamide-6/6 stérile ne se dissolvent pas dans 20 mL d'une solution d'*acide formique anhydre R* à 70 pour cent *m/m* mais se dissolvent dans 20 mL d'une solution d'*acide formique anhydre R* à 80 pour cent *m/m*.

**Identification du polypropylène**

Le polypropylène est soluble dans le décahydronaphtalène, le 1-chloronaphtalène et le trichloréthylène. Il n'est pas soluble dans l'alcool, l'éther et la cyclohexanone.

A. Il se ramollit entre 160 °C et 170 °C. Il brûle avec une flamme bleue en dégageant une odeur de paraffine solide brûlée et d'alcool octylique.

B. A 0,25 g de polypropylène, ajoutez 10 mL de *toluène R* et chauffez à reflux pendant environ 15 min. Disposez quelques gouttes de solution sur une pastille de *chlorure de sodium R* et évaporez le solvant dans une étuve à 80 °C. Examinez par spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*), en comparant avec le spectre obtenu avec le *polypropylène SCR*.

C. A 2 g de polypropylène, ajoutez 100 mL d'*eau R* et chauffez à reflux pendant 2 h. Laissez refroidir. Déterminée sur une balance hydrostatique, la densité (*2.2.5*) de la substance est de 0,89 g/mL à 0,91 g/mL.

**Identification de l'acier inoxydable**

Les fils en acier inoxydable sont identifiés en confirmant que la composition satisfait à la norme ISO 5832 Partie 1.

**Identification du poly(difluorure de vinylidène)**

Il est soluble dans le diméthylformamide chaud. Il est insoluble dans l'éthanol, l'alcool isopropylique chaud et froid, l'acétate d'éthyle, le tétrachloréthylène.

A. Son point de fusion se situe entre 170 °C et 180 °C, il fond dans une flamme et ne brûle pas après retrait de la flamme. Placez un petit morceau de fil sur un fil ou une plaque de cuivre recuit. Chauffez dans une flamme oxydante. Il ne se produit pas de coloration verte.

B. Dissolvez 0,25 g de fil dans 10 mL de *diméthylformamide R* et chauffez à reflux pendant environ 15 min. Disposez quelques gouttes de solution sur une pastille de *chlorure de sodium R* et évaporez le solvant dans une étuve à 80 °C pendant 1 h. Examinez par spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*). Le spectre présente des maximums d'absorption aux nombres d'onde suivants : 838,3 ± 0,5 $cm^{-1}$, 873,3 ± 1 $cm^{-1}$, 1070,0 ± 2 $cm^{-1}$, 1165,0 ± 10 $cm^{-1}$, 1275 ± 0,5 $cm^{-1}$, 1399 ± 5 $cm^{-1}$.

C. A 2 g de fil, ajoutez 100 mL d'*eau R* et chauffez à reflux pendant 2 h. Laissez refroidir. La densité (*2.2.5*) de la substance est de 1,71 à 1,78.

PRODUCTION

Les normes harmonisées appropriées relatives aux méthodes appropriées et validées de stérilisation, au contrôle de l'environnement en cours de fabrication, à l'étiquetage et au conditionnement peuvent s'appliquer aux fils non résorbables stériles.

Les propriétés physiques suivantes sont essentielles à l'efficacité et aux performances des fils au moment de l'emploi et pendant toute la durée de vie fonctionnelle : diamètre constant, résistance initiale suffisante, sertissage solide.

Les spécifications ci-après ont été établies par rapport aux contraintes s'exerçant dans les conditions normales d'utilisation. Ces spécifications peuvent servir à démontrer, pour chaque lot de production, l'aptitude à l'emploi de fils non résorbables stériles pour la suture des plaies par les techniques chirurgicales habituelles.

ESSAI

*Procédez sans délai et successivement à la mesure de la longueur, du diamètre et de la charge minimale de rupture, après avoir prélevé les fils hors de leur protecteur individuel de stérilité.*

Pour l'essai du lin, préparez les fils comme suit : s'ils ont été entreposés à sec, placez-les dans une atmosphère présentant une humidité relative de 65 ± 5 pour cent et une température de 20 ± 2 °C pendant les 4 h précédant la mesure du diamètre.

Tableau 0324.-1. – *Diamètres et charges minimales de rupture*

| Numéro de diamètre | Diamètre (millimètres) | | | | Charge minimale de rupture (newtons) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | | B | | Lin | | Fils d'autres matériaux | | Acier inoxydable | |
| | min. | max. | min. | max. | C | D | C | D | C | D |
| 0,05 | 0,005 | 0,009 | 0,003 | 0,012 | - | - | 0,01 | - | | |
| 0,1 | 0,010 | 0,019 | 0,005 | 0,025 | - | - | 0,03 | - | | |
| 0,15 | 0,015 | 0,019 | 0,012 | 0,025 | - | - | 0,06 | 0,01 | | |
| 0,2 | 0,020 | 0,029 | 0,015 | 0,035 | - | - | 0,1 | - | | |
| 0,3 | 0,030 | 0,039 | 0,025 | 0,045 | - | - | 0,35 | 0,06 | | |
| 0,4 | 0,040 | 0,049 | 0,035 | 0,060 | - | - | 0,60 | 0,15 | 1,1 | |
| 0,5 | 0,050 | 0,069 | 0,045 | 0,085 | - | - | 1,0 | 0,35 | 1,6 | |
| 0,7 | 0,070 | 0,099 | 0,060 | 0,125 | 1,0 | 0,3 | 1,5 | 0,60 | 2,7 | |
| 1 | 0,100 | 0,149 | 0,085 | 0,175 | 2,5 | 0,6 | 3,0 | 1,0 | 5,3 | 4,0 |
| 1,5 | 0,150 | 0,199 | 0,125 | 0,225 | 5,0 | 1,0 | 5,0 | 1,5 | 8,0 | 6,0 |
| 2 | 0,200 | 0,249 | 0,175 | 0,275 | 8,0 | 2,5 | 9,0 | 3,0 | 13,3 | 10,0 |
| 2,5 | 0,250 | 0,299 | 0,225 | 0,325 | 9,0 | 5,0 | 13,0 | 5,0 | 15,5 | 11,6 |
| 3 | 0,300 | 0,349 | 0,275 | 0,375 | 11,0 | 8,0 | 15,0 | 9,0 | 17,7 | 13,3 |
| 3,5 | 0,350 | 0,399 | 0,325 | 0,450 | 15,0 | 9,0 | 22,0 | 13,0 | 33,4 | 25,0 |
| 4 | 0,400 | 0,499 | 0,375 | 0,550 | 18,0 | 11,0 | 27,0 | 15,0 | 46,7 | 35,0 |
| 5 | 0,500 | 0,599 | 0,450 | 0,650 | 26,0 | 15,0 | 35,0 | 22,0 | 57,9 | 43,4 |
| 6 | 0,600 | 0,699 | 0,550 | 0,750 | 37,0 | 18,0 | 50,0 | 27,0 | 89,4 | 67,0 |
| 7 | 0,700 | 0,799 | 0,650 | 0,850 | 50,0 | 26,0 | 62,0 | 35,0 | 111,8 | 83,9 |
| 8 | 0,800 | 0,899 | 0,750 | 0,950 | 65,0 | 37,0 | 73,0 | 50,0 | 133,4 | 100,1 |
| 9 | 0,900 | 0,999 | 0,850 | 1,050 | | | | | 156,0 | 117,0 |
| 10 | 1,000 | 1,099 | 0,950 | 1,150 | | | | | 178,5 | 133,9 |

Pour déterminer la charge admissible, immergez les fils dans de l'*eau R* à température ambiante pendant 30 min avant de procéder à l'essai.

**Longueur**. Mesurez la longueur de chaque fil sans le soumettre à une tension supérieure à celle que nécessite son maintien en position rectiligne. La longueur n'est pas inférieure à 95 pour cent de celle qui est indiquée sur l'étiquette et ne dépasse pas 400 cm.

**Diamètre**. Effectuez les mesures sur 5 fils à l'aide d'un instrument approprié muni d'un disque presseur, d'un diamètre de 10-15 mm, permettant d'atteindre une précision d'au moins 0,002 mm. Ajustez la masse du disque presseur et les dispositifs mobiles s'y rattachant de façon que la charge totale appliquée sur le fil à examiner soit de 100 ± 10 g. Au cours de l'opération, abaissez lentement le disque presseur sur le fil en évitant d'écraser ce dernier. Mesurez le diamètre tous les 30 cm sur toute la longueur du fil. Pour un fil d'une longueur inférieure à 90 cm, mesurez le diamètre en 3 points situés approximativement à distance égale. Pendant la mesure, appliquez aux fils monofilaments, une tension qui ne dépasse pas celle que nécessite son maintien en position rectiligne. Appliquez aux fils multifilaments une tension inférieure ou égale au cinquième de la charge de rupture figurant à la colonne C du tableau 0324.-1 en fonction du numéro de diamètre et du type de matériau du fil à examiner, en n'appliquant dans aucun cas une tension supérieure à 10 N. L'application d'une tension n'est pas nécessaire pour la mesure du diamètre des fils en acier inoxydable. Pour les fils multifilaments d'un numéro de diamètre supérieur à 1,5, effectuez 2 mesures du diamètre en chaque point, la deuxième mesure étant faite après rotation de l'axe du fil de 90°. Le diamètre du fil en ce point est donné par la moyenne des 2 mesures. La moyenne des mesures effectuées sur les fils à examiner et deux tiers au moins des mesures effectuées sur chaque fil sont comprises dans les limites figurant dans la colonne A du tableau 0324.-1 pour le numéro de diamètre correspondant. Aucune des mesures n'est située hors des limites données dans la colonne B du tableau 0324.-1 pour le numéro de diamètre correspondant.

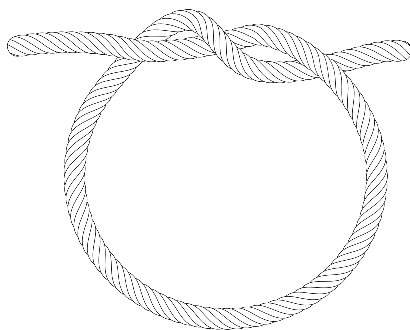


Figure 0324.-1. – *Noeud simple*

**Charge minimale de rupture**. Sauf indication contraire, déterminez, sur le fil tel qu'il est présenté, la charge minimale de rupture sur un noeud simple obtenu comme suit : passez l'extrémité tenue dans la main droite par-dessus celle tenue dans la main gauche et tirez une des extrémités à travers la boucle ainsi formée (voir figure 0324.-1), puis tirez sur les extrémités pour serrer le noeud. Pour les fils en acier inoxydable de diamètre égal ou supérieur à 3,5, la charge minimale de rupture est déterminée en traction rectiligne (sans noeud). Effectuez l'essai sur 5 fils à raison de 2 essais sur les fils dont la longueur dépasse 75 cm et de 1 seul essai sur les fils plus courts. Déterminez la charge de rupture à l'aide d'un dynamomètre approprié. L'appareil est muni de 2 attaches servant à fixer le fil, dont l'une est mobile et se déplace à une vitesse de course constante de 30 cm/min. Les dispositifs d'attache permettent la fixation des fils à examiner sans glissement possible. Au début de l'essai, la longueur du fil entre les serre-fils est de 12,5 cm à 20 cm. Le noeud se trouve à égale distance entre les points de fixation. Déclenchez le mouvement du serre-fils et notez la force requise pour rompre le fil. Lorsque le fil se rompt dans ses attaches ou à moins de 1 cm de celles-ci, répétez l'essai sur un nouveau fil, le résultat d'un essai défectueux ne devant pas être pris en considération dans le calcul final. La moyenne de toutes les lectures prises en compte est égale ou supérieure à la valeur indiquée dans la colonne C du tableau 0324.-1 et aucune valeur n'est inférieure à la valeur indiquée dans la colonne D pour le numéro de diamètre correspondant.

**Résistance du sertissage**. Si le fil non résorbable stérile est muni d'une aiguille sertie qui n'est pas déclarée détachable, il satisfait à l'essai de résistance du sertissage. Utilisez un dynamomètre approprié tel que celui qui est décrit pour la mesure de la charge minimale de rupture. Effectuez l'essai sur 5 fils. Fixez l'aiguille sertie sur le fil (sans noeud) dans la mâchoire de l'appareil, de façon que la partie sertie de l'aiguille soit complètement en dehors de la mâchoire et dirigée dans la direction de la tension exercée sur le fil. Déclenchez le mouvement du serre-fils et notez la force requise pour rompre le fil ou pour séparer le fil de l'aiguille. La moyenne des 5 déterminations et toutes les valeurs individuelles correspondent aux valeurs respectives indiquées au tableau 0324.-2 pour le numéro de diamètre correspondant. Si une seule valeur ne satisfait pas à la norme individuelle, répétez l'essai sur 10 autres fils. Le fil à examiner satisfait à l'essai si ces 10 valeurs ne sont pas inférieures à la limite fixée pour la valeur individuelle du tableau 0324.-2 correspondant au numéro indiqué.

Tableau 0324.-2. – *Charges minimales de rupture pour les aiguilles serties sur fil*

| Numéro de diamètre | Valeur moyenne (newtons) | Valeur individuelle (newtons) |
|---|---|---|
| 0,4 | 0,50 | 0,25 |
| 0,5 | 0,80 | 0,40 |
| 0,7 | 1,7 | 0,80 |
| 1 | 2,3 | 1,1 |
| 1,5 | 4,5 | 2,3 |
| 2 | 6,8 | 3,4 |
| 2,5 | 9,0 | 4,5 |
| 3 | 11,0 | 4,5 |
| 3,5 | 15,0 | 4,5 |
| 4 | 18,0 | 6,0 |
| 5 | 18,0 | 7,0 |
| 6 | 25,0 | 12,5 |
| 7 | 25,0 | 12,5 |
| 8 | 50,0 | 25 |
| 9 | 50,0 | 25 |
| 10 | 75,0 | 37,5 |

**Colorants extractibles**. Lorsque le fil est coloré et destiné à le rester au cours de son emploi, il satisfait en plus à l'essai des colorants extractibles. Dans une fiole conique, introduisez 0,25 g du fil à examiner. Ajoutez 25,0 mL d'*eau R* et obturez l'orifice de la fiole en y plaçant un entonnoir à courte tige. Chauffez à ébullition pendant 15 min, refroidissez et ajustez au volume initial avec de l'*eau R*. Suivant la coloration du fil, préparez la solution témoin appropriée comme indiqué au tableau 0324.-3 en utilisant les solutions primaires de coloration (*2.2.2*).

La solution à examiner n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin appropriée.

**Monomère et oligomères**. Le fil en polyamide-6 stérile satisfait à l'essai des monomère et oligomères. Dans un appareil à épuisement continu, traitez 1,00 g de fil par 30 mL de *méthanol R*. Epuisez au bain-marie pendant 7 h, à raison

d'au moins 3 extractions par heure. Faites évaporer l'extrait méthanolique à siccité. Desséchez le résidu à 110 °C pendant 10 min. Laissez refroidir dans un dessiccateur et pesez. La masse du résidu n'est pas supérieure à 20 mg (2 pour cent).

Tableau 0324.-3. – *Solutions témoins de coloration*

| Coloration du fil | Composition de la solution témoin en parties par volume | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Solution primaire rouge | Solution primaire jaune | Solution primaire bleue | *Eau R* |
| Brun-jaune | 0,2 | 1,2 | - | 8,6 |
| Rouge-rose | 1,0 | - | - | 9,0 |
| Bleu-vert | - | - | 2,0 | 8,0 |
| Violet | 1,6 | - | 8,4 | - |

CONSERVATION (CONDITIONNEMENT)

Les fils non résorbables stériles sont conditionnés sous un protecteur individuel de stérilité qui permet le retrait et l'utilisation du fil dans des conditions aseptiques. Les fils peuvent être maintenus à l'état sec ou dans un liquide qui peut contenir un conservateur antimicrobien, à l'exclusion de tout antibiotique.

Les fils non résorbables stériles sont destinés à être utilisés en une fois lorsque le protecteur individuel de stérilité vient d'être ouvert.

Les protecteurs individuels de stérilité contenant les fils (emballage primaire) sont placés dans un emballage protecteur (boîte) qui assure le maintien des propriétés physiques et mécaniques jusqu'au moment de l'emploi.

On peut se référer également aux normes harmonisées relatives au conditionnement des dispositifs médicaux.

ÉTIQUETAGE

Il est possible de se référer aux normes relatives à l'étiquetage des dispositifs médicaux.

Les informations indispensables à l'identification du produit sont indiquées sur ou dans chaque protecteur individuel de stérilité (emballage primaire) et sur l'emballage protecteur (boîte). Ces informations comprennent au minimum :

– le diamètre nominal,
– la longueur, en centimètres ou en mètres,
– le cas échéant, l'indication que l'aiguille est détachable,
– la désignation du produit,
– la destination (fil chirurgical, non résorbable),
– le cas échéant, la couleur du fil,
– sa structure (tressée, monofilament, gainée).

**01/2008:0666**

# FILS CHIRURGICAUX, FILS RÉSORBABLES SYNTHÉTIQUES MONOFILAMENTS STÉRILES

## Fila resorbilia synthetica monofilamenta sterilia

DÉFINITION

Les fils résorbables synthétiques monofilaments sont des fils préparés à partir d'un ou de plusieurs polymères ou copolymères synthétiques et qui, introduits dans un organisme vivant, sont résorbés par cet organisme sans provoquer d'irritation tissulaire indésirable. Ils sont constitués de matériaux complètement polymérisés se présentant en monofilaments. Ils peuvent être traités pour faciliter leur manipulation et peuvent être teints.

Pour évaluer la conformité du produit quant à l'origine et au traitement des matières premières ainsi qu'à la biocompatibilité, il convient de se référer aux normes harmonisées appropriées.

Le fil résorbable synthétique monofilament est un dispositif employé en chirurgie pour la suture des plaies. Etant résorbable, il sert à rapprocher les tissus pendant le temps de la cicatrisation, puis perd sa résistance par hydrolyse.

PRODUCTION

Les normes harmonisées appropriées relatives aux méthodes de stérilisation, au contrôle de l'environnement en cours de fabrication, à l'étiquetage et au conditionnement peuvent s'appliquer aux fils résorbables synthétiques monofilaments stériles.

Les propriétés physiques suivantes sont essentielles à l'efficacité et aux performances des fils résorbables synthétiques monofilaments stériles au moment de l'emploi et pendant toute la durée de vie fonctionnelle : diamètre constant, résistance initiale suffisante, sertissage solide.

Les spécifications ci-après ont été établies par rapport aux contraintes s'exerçant dans les conditions normales d'utilisation. Ces spécifications peuvent servir à démontrer, pour chaque lot de production, l'aptitude à l'emploi de fils résorbables synthétiques monofilaments stériles pour la suture des plaies par les techniques chirurgicales habituelles.

ESSAI

*Effectuez les essais suivants sur les fils tels qu'ils se présentent, après les avoir prélevés hors de leur protecteur de stérilité.*

**Longueur**. Mesurez la longueur de chaque fil sans le soumettre à une tension supérieure à celle que nécessite son maintien en position rectiligne. La longueur de chaque fil n'est pas inférieure à 95 pour cent de celle qui est indiquée sur l'étiquette et ne dépasse pas 400 cm.

**Diamètre**. Sauf mention contraire, effectuez les mesures sur 5 fils, tels qu'ils se présentent, à l'aide d'un instrument approprié muni d'un disque presseur, d'un diamètre de 10 mm à 15 mm, permettant d'atteindre une précision d'au moins 0,002 mm. Ajustez la masse du disque presseur et les dispositifs mobiles s'y rattachant de façon que la charge totale appliquée sur le fil à examiner soit de 100 ± 10 g. Au cours de l'opération, abaissez lentement le disque presseur sur le fil en évitant d'écraser ce dernier. Mesurez le diamètre tous les 30 cm environ sur toute la longueur du fil. Pour un fil d'une longueur inférieure à 90 cm, mesurez le diamètre en 3 points situés approximativement à égale distance. Pendant la mesure, soumettez le fil à une tension qui n'est pas supérieure à celle que nécessite son maintien en position rectiligne. La moyenne de toutes les mesures effectuées sur les fils à examiner et deux tiers au minimum des mesures effectuées sur chaque suture sont comprises dans les limites figurant dans la colonne A du tableau 0666.-1 pour le numéro de diamètre correspondant. Aucune des mesures ne se situe en dehors des limites données dans la colonne B du tableau 0666.-1 pour le numéro de diamètre correspondant.

Tableau 0666.-1. – *Diamètre et charges minimales de rupture*

| Numéro de diamètre | Diamètre (millimètres) | | | | Charge de rupture (newtons) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | | B | | C | D |
| | min. | max. | min. | max. | | |
| 0,5 | 0,050 | 0,094 | 0,045 | 0,125 | 1,4 | 0,7 |
| 0,7 | 0,095 | 0,149 | 0,075 | 0,175 | 2,5 | 1,3 |
| 1 | 0,150 | 0,199 | 0,125 | 0,225 | 6,8 | 3,4 |
| 1,5 | 0,200 | 0,249 | 0,175 | 0,275 | 9,5 | 4,7 |
| 2 | 0,250 | 0,339 | 0,225 | 0,375 | 17,5 | 8,9 |
| 3 | 0,340 | 0,399 | 0,325 | 0,450 | 26,8 | 13,4 |
| 3,5 | 0,400 | 0,499 | 0,375 | 0,550 | 39,0 | 18,5 |
| 4 | 0,500 | 0,570 | 0,450 | 0,600 | 50,8 | 25,4 |
| 5 | 0,571 | 0,610 | 0,500 | 0,700 | 63,5 | 31,8 |

**Charge minimale de rupture**. Déterminez la charge minimale de rupture sur un noeud simple obtenu comme suit : passez l'extrémité tenue dans la main droite par dessus celle tenue dans la main gauche et tirez une des extrémités à travers la boucle ainsi formée (voir figure 0666.-1), puis tirez sur les extrémités pour serrer le noeud.

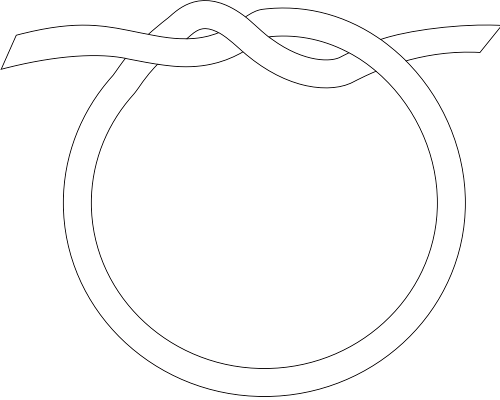


Figure 0666.-1. – *Noeud simple*

Effectuez l'essai sur 5 fils à raison de 2 essais sur les fils dont la longueur dépasse 75 cm et d'un seul essai sur les fils plus courts. Déterminez la charge de rupture à l'aide d'un dynamomètre approprié. L'appareil est muni de 2 attaches servant à fixer le fil, et dont l'une est mobile et se déplace à une vitesse constante de 25 cm/min à 30 cm/min. Les dispositifs d'attache permettent la fixation des fils à examiner sans glissement possible. Au début de l'essai, la longueur du fil entre les serre-fils est de 12,5 cm à 20 cm. Le noeud se trouve à égale distance entre les points de fixation. Déclenchez le mouvement du serre-fils et notez la force requise pour rompre le fil. Lorsque le fil se rompt dans ses attaches ou à moins de 1 cm de celles-ci, répétez l'essai sur un nouveau fil, le résultat de l'essai défectueux ne devant pas être pris en considération dans le calcul final. La moyenne de toutes les lectures prises en compte est égale ou supérieure à la valeur indiquée dans la colonne C du tableau 0666.-1 et aucune des lectures n'est inférieure à la valeur indiquée dans la colonne D, pour le numéro de diamètre du fil examiné.

**Résistance du sertissage**. Si le fil résorbable synthétique monofilament stérile est muni d'une aiguille sertie qui n'est pas dite détachable, il satisfait à l'essai de résistance du sertissage. Utilisez un dynamomètre approprié tel que celui décrit pour la mesure de la charge minimale de rupture. Effectuez l'essai sur 5 fils. Fixez l'aiguille sertie sur le fil (sans noeud) dans la mâchoire de l'appareil, de façon que la partie sertie de l'aiguille soit complètement en dehors de la mâchoire et dirigée dans la direction de la tension exercée sur le fil. Déclenchez le mouvement du serre-fils et notez la force requise pour rompre le fil ou pour séparer le fil de l'aiguille. La moyenne des 5 déterminations et toutes les valeurs individuelles correspondent aux valeurs respectives indiquées au tableau 0666.-2 pour le numéro de diamètre correspondant. Si une seule valeur ne satisfait pas à la norme individuelle, répétez l'essai sur 10 autres fils. Le fil à examiner satisfait à l'essai si ces 10 valeurs ne sont pas inférieures à la limite fixée pour la valeur individuelle correspondant au numéro indiqué.

CONSERVATION (CONDITIONNEMENT)

Les fils résorbables synthétiques monofilaments stériles sont conditionnés sous un protecteur individuel de stérilité qui permet le retrait et l'utilisation du fil dans des conditions aseptiques. Les fils doivent être maintenus à l'état sec.

Les fils résorbables synthétiques monofilaments stériles sont destinés à être utilisés en une fois lorsque le protecteur individuel de stérilité vient d'être ouvert.

Les protecteurs individuels de stérilité contenant les fils (emballage primaire) sont placés dans un emballage protecteur (boîte) qui assure le maintien des propriétés physiques et mécaniques jusqu'au moment de l'emploi.

On peut se référer également aux normes harmonisées relatives au conditionnement des dispositifs médicaux.

Tableau 0666.-2. – *Charges minimales de rupture pour les aiguilles serties sur fil*

| Numéro de diamètre | Valeur moyenne (newtons) | Valeur individuelle (newtons) |
|---|---|---|
| 0,5 | 0,80 | 0,40 |
| 0,7 | 1,7 | 0,80 |
| 1 | 2,3 | 1,1 |
| 1,5 | 4,5 | 2,3 |
| 2 | 6,8 | 3,4 |
| 2,5 | 9,0 | 4,5 |
| 3 | 11,0 | 4,5 |
| 3,5 | 15,0 | 4,5 |
| 4 | 18,0 | 6,0 |
| 5 | 18,0 | 7,0 |

ÉTIQUETAGE

Il est possible de se référer aux normes harmonisées appropriées relatives à l'étiquetage des dispositifs médicaux.

Les informations indispensables à l'identification du produit sont indiquées sur ou dans chaque protecteur individuel de stérilité (emballage primaire) et sur l'emballage protecteur (boîte). Ces informations comprennent au minimum :

- le diamètre nominal,
- la longueur, en centimètres ou en mètres,
- le cas échéant, l'indication que l'aiguille est détachable,
- la désignation du produit,
- la destination (fil chirurgical, résorbable),
- le cas échéant, la couleur du fil,
- sa structure (monofilament).

**01/2008:0667**

# FILS CHIRURGICAUX, FILS RÉSORBABLES SYNTHÉTIQUES TRESSÉS STÉRILES

## Fila resorbilia synthetica torta sterilia

DÉFINITION

Les fils résorbables synthétiques tressés stériles sont des fils préparés à partir d'un ou de plusieurs polymères ou copolymères synthétiques et qui, introduits dans un organisme vivant, sont résorbés par cet organisme sans provoquer d'irritation tissulaire indésirable. Ils sont constitués de matériaux complètement polymérisés se présentant en fibres assemblées par tressage. Ils peuvent être traités pour faciliter leur manipulation et peuvent être teints.

Pour évaluer la conformité du produit quant à l'origine et au traitement des matières premières ainsi qu'à la biocompatibilité, il convient de se référer aux normes harmonisées appropriées.

Le fil résorbable synthétique tressé stérile est un dispositif employé en chirurgie pour la suture des plaies. Etant résorbable, il sert à rapprocher les tissus pendant le temps de la cicatrisation, puis perd sa résistance par hydrolyse.

PRODUCTION

Les normes harmonisées appropriées relatives aux méthodes de stérilisation, au contrôle de l'environnement en cours de fabrication, à l'étiquetage et au conditionnement peuvent s'appliquer aux fils résorbables synthétiques tressés stériles.

Les propriétés physiques suivantes sont essentielles à l'efficacité et aux performances des fils résorbables synthétiques tressés stériles au moment de l'emploi et pendant toute la durée de vie fonctionnelle : diamètre constant, résistance initiale suffisante, sertissage solide.

Les spécifications ci-après ont été établies par rapport aux contraintes s'exerçant dans les conditions normales d'utilisation. Ces spécifications peuvent servir à démontrer, pour chaque lot de production, l'aptitude à l'emploi des fils résorbables synthétiques tressés stériles pour la suture des plaies par les techniques chirurgicales habituelles.

## ESSAI

*Effectuez les essais suivants sur les fils tels qu'ils se présentent, après les avoir prélevés hors de leur protecteur de stérilité.*

**Longueur**. Mesurez la longueur de chaque fil sans le soumettre à une tension supérieure à celle que nécessite son maintien en position rectiligne. La longueur de chaque fil n'est pas inférieure à 95 pour cent de celle qui est indiquée sur l'étiquette et ne dépasse pas 400 cm.

Tableau 0667.-1. – *Diamètres et charges minimales de rupture*

| Numéro de diamètre | Diamètre (millimètres) | | | | Charge de rupture (newtons) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | | B | | C | D |
| | min. | max. | min. | max. | | |
| 0,01 | 0,001 | 0,004 | 0,0008 | 0,005 | - | - |
| 0,05 | 0,005 | 0,009 | 0,003 | 0,012 | - | - |
| 0,1 | 0,010 | 0,019 | 0,005 | 0,025 | - | - |
| 0,2 | 0,020 | 0,029 | 0,015 | 0,035 | - | - |
| 0,3 | 0,030 | 0,039 | 0,025 | 0,045 | 0,45 | 0,23 |
| 0,4 | 0,040 | 0,049 | 0,035 | 0,060 | 0,70 | 0,35 |
| 0,5 | 0,050 | 0,069 | 0,045 | 0,085 | 1,4 | 0,7 |
| 0,7 | 0,070 | 0,099 | 0,060 | 0,125 | 2,5 | 1,3 |
| 1 | 0,100 | 0,149 | 0,085 | 0,175 | 6,8 | 3,4 |
| 1,5 | 0,150 | 0,199 | 0,125 | 0,225 | 9,5 | 4,8 |
| 2 | 0,200 | 0,249 | 0,175 | 0,275 | 17,7 | 8,9 |
| 2,5 | 0,250 | 0,299 | 0,225 | 0,325 | 21,0 | 10,5 |
| 3 | 0,300 | 0,349 | 0,275 | 0,375 | 26,8 | 13,4 |
| 3,5 | 0,350 | 0,399 | 0,325 | 0,450 | 39,0 | 18,5 |
| 4 | 0,400 | 0,499 | 0,375 | 0,550 | 50,8 | 25,4 |
| 5 | 0,500 | 0,599 | 0,450 | 0,650 | 63,5 | 31,8 |
| 6 | 0,600 | 0,699 | 0,550 | 0,750 | - | - |
| 7 | 0,700 | 0,799 | 0,650 | 0,850 | - | - |

**Diamètre**. Sauf mention contraire, effectuez les mesures sur 5 fils, tels qu'ils se présentent, à l'aide d'un instrument approprié muni d'un disque presseur, d'un diamètre de 10 mm à 15 mm, permettant d'atteindre une précision d'au moins 0,002 mm. Ajustez la masse du disque presseur et les dispositifs mobiles s'y rattachant de façon que la charge totale appliquée sur le fil à examiner soit de 100 ± 10 g. Au cours de l'opération, abaissez lentement le disque presseur sur le fil en évitant d'écraser ce dernier. Mesurez le diamètre tous les 30 cm environ sur toute la longueur du fil. Pour un fil d'une longueur inférieure à 90 cm, mesurez le diamètre en 3 points situés approximativement à égale distance. Soumettez les fils à une tension égale ou inférieure à un cinquième de la charge minimale de rupture présentée dans la colonne C du tableau 0667.-1 correspondant au numéro de diamètre et au type du fil concerné ou 10 N si cette valeur est moindre. Pour les fils dont le numéro de diamètre est supérieur à 1,5, effectuez 2 mesures en chaque point, la seconde après avoir soumis le fil à une torsion de 90°. Le diamètre en ce point est la moyenne des 2 mesures. La moyenne de toutes les mesures effectuées sur les fils à examiner et deux tiers au minimum des mesures effectuées sur chaque fil sont comprises dans les limites figurant dans la colonne A du tableau 0667.-1 pour le numéro de diamètre correspondant. Aucune des mesures ne se situe en dehors des limites données dans la colonne B du tableau 0667.-1 pour le numéro de diamètre correspondant.

**Charge minimale de rupture**. Déterminez la charge minimale de rupture sur un noeud simple obtenu comme suit : passez l'extrémité tenue dans la main droite par dessus celle tenue dans la main gauche et tirez une des extrémités à travers la boucle ainsi formée (voir figure 0667.-1), puis tirez sur les extrémités pour serrer le noeud.

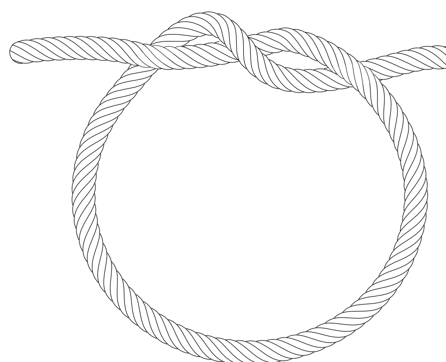


Figure 0667.-1. – *Noeud simple*

Effectuez l'essai sur 5 fils à raison de 2 essais sur les fils dont la longueur dépasse 75 cm et d'un seul essai sur les fils plus courts. Déterminez la charge de rupture à l'aide d'un dynamomètre approprié. L'appareil est muni de 2 attaches servant à fixer le fil, et dont l'une est mobile et se déplace à une vitesse constante de 25 cm/min à 30 cm/min. Les dispositifs d'attache permettent la fixation des fils à examiner sans glissement possible. Au début de l'essai, la longueur du fil entre les serre-fils est de 12,5 cm à 20 cm. Le noeud se trouve à égale distance entre les points de fixation. Déclenchez le mouvement du serre-fils et notez la force requise pour rompre le fil. Lorsque le fil se rompt dans ses attaches ou à moins de 1 cm de celles-ci, répétez l'essai sur un nouveau fil, le résultat de l'essai défectueux ne devant pas être pris en considération dans le calcul final. La moyenne de toutes les lectures prises en compte est égale ou supérieure à la valeur indiquée dans la colonne C du tableau 0667.-1 et aucune des lectures n'est inférieure à la valeur indiquée dans la colonne D, pour le numéro de diamètre du fil examiné.

**Résistance du sertissage**. Si le fil résorbable synthétique tressé stérile est muni d'une aiguille sertie qui n'est pas dite détachable, il satisfait à l'essai de résistance du sertissage. Utilisez un dynamomètre approprié tel que celui décrit pour la mesure de la charge minimale de rupture. Effectuez l'essai sur 5 fils. Fixez l'aiguille sertie sur le fil (sans noeud) dans la mâchoire de l'appareil, de façon que la partie sertie de l'aiguille soit complètement en dehors de la mâchoire et dirigée dans la direction de la tension exercée sur le fil. Déclenchez le mouvement du serre-fils et notez la force requise pour rompre le fil ou pour séparer le fil de l'aiguille. La moyenne des 5 déterminations et toutes les valeurs individuelles correspondent aux valeurs respectives indiquées au tableau 0667.-2 pour le numéro de diamètre correspondant. Si une seule valeur ne satisfait pas à la norme individuelle, répétez l'essai sur 10 autres

fils. Le fil à examiner satisfait à l'essai si ces 10 valeurs ne sont pas inférieures à la limite fixée pour la valeur individuelle correspondant au numéro de diamètre indiqué (tableau 0667.-2).

Tableau 0667.-2. – *Charges minimales de rupture pour les aiguilles serties sur fil*

| Numéro de diamètre | Valeur moyenne (newtons) | Valeur individuelle (newtons) |
|---|---|---|
| 0,4 | 0,50 | 0,25 |
| 0,5 | 0,80 | 0,40 |
| 0,7 | 1,7 | 0,80 |
| 1 | 2,3 | 1,1 |
| 1,5 | 4,5 | 2,3 |
| 2 | 6,8 | 3,4 |
| 2,5 | 9,0 | 4,5 |
| 3 | 11,0 | 4,5 |
| 3,5 | 15,0 | 4,5 |
| 4 | 18,0 | 6,0 |
| 5 | 18,0 | 7,0 |

## CONSERVATION (CONDITIONNEMENT)

Les fils résorbables synthétiques tressés stériles sont conditionnés sous un protecteur individuel de stérilité qui permet le retrait et l'utilisation du fil dans des conditions aseptiques. Les fils résorbables synthétiques tressés stériles doivent être maintenus à l'état sec.

Les fils résorbables synthétiques tressés stériles sont destinés à être utilisés en une fois lorsque le protecteur individuel de stérilité vient d'être ouvert.

Les protecteurs individuels de stérilité contenant les fils (emballage primaire) sont placés dans un emballage protecteur (boîte) qui assure le maintien des propriétés physiques et mécaniques jusqu'au moment de l'emploi.

On peut se référer également aux normes harmonisées relatives au conditionnement des dispositifs médicaux.

## ÉTIQUETAGE

Il est possible de se référer aux normes harmonisées appropriées relatives à l'étiquetage des dispositifs médicaux.

Les informations indispensables à l'identification du produit sont indiquées sur ou dans chaque protecteur individuel de stérilité (emballage primaire) et sur l'emballage protecteur (boîte). Ces informations comprennent au minimum :

– le diamètre nominal,
– la longueur, en centimètres ou en mètres,
– le cas échéant, l'indication que l'aiguille est détachable,
– la désignation du produit,
– la destination (fil chirurgical, résorbable),
– le cas échéant, la couleur du fil,
– sa structure (tressée).

Fils chirurgicaux

# FILS CHIRURGICAUX POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

**01/2008:0660**

# FILS CHIRURGICAUX, CATGUT STÉRILE EN DISTRIBUTEUR POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Chorda resorbilis sterilis in fuso ad usum veterinarium

DÉFINITION

Le catgut stérile en distributeur pour usage vétérinaire est constitué par des fils de collagène provenant des tissus intestinaux de mammifères. Après nettoyage, les membranes sont découpées dans le sens de la longueur en bandes de largeur variable qui, lorsqu'elles sont assemblées en petit nombre, suivant les diamètres désirés, sont tordues sous tension, séchées, polies, sélectionnées et stérilisées. Les fils peuvent être traités par des substances chimiques telles que les sels de chrome pour ralentir leur résorption et le glycérol pour les rendre souples, à condition que ces agents ne diminuent pas la tolérance tissulaire.

Le fil est conditionné dans un distributeur qui permet le retrait et l'utilisation de tout ou partie du fil dans des conditions aseptiques. Le distributeur est conçu de façon que, sous réserve d'une manipulation adéquate, le contenu conserve sa stérilité même quand une partie du fil a été prélevée. Le fil peut être maintenu à l'état sec ou dans un liquide qui peut contenir un conservateur antimicrobien, à l'exclusion de tout antibiotique.

ESSAI

*Pour le catgut conditionné dans un liquide conservateur, prélevez le fil hors du distributeur et procédez sans délai et successivement à la mesure de la longueur, du diamètre et de la charge minimale de rupture. Pour le catgut conditionné à l'état sec, immergez le fil dans l'alcool R ou dans une solution de 2-propanol R à 90 pour cent V/V pendant 24 h, puis procédez sans délai aux mesures indiquées.*

**Longueur**. Mesurez la longueur du fil sans le soumettre à une tension supérieure à celle que nécessite son maintien en position rectiligne. La longueur n'est pas inférieure à 95 pour cent de celle qui est indiquée sur l'étiquette. Si le fil est constitué de plusieurs sections assemblées par des noeuds, la longueur de chaque section n'est pas inférieure à 2,5 m.

**Diamètre**. Effectuez les mesures à l'aide d'un instrument approprié muni d'un disque presseur, d'un diamètre de 10 mm à 15 mm, permettant d'atteindre une précision d'au moins 0,002 mm. Ajustez la masse du disque presseur et les dispositifs mobiles s'y rattachant de façon que la charge totale appliquée sur le fil à examiner soit de 100 ± 10 g. Au cours de l'opération, abaissez lentement le disque presseur sur le fil en évitant d'écraser ce dernier. Effectuez au moins 1 mesure tous les 2 m. Si le fil est constitué de plusieurs sections assemblées par des noeuds, effectuez au moins 3 mesures sur chaque section. Dans tous les cas, effectuez 12 mesures au moins, en des points situés à peu près à égale distance les uns des autres sur le fil ou sur chaque section du fil. Ne soumettez pas le fil à une tension supérieure à celle que nécessite son maintien en position rectiligne. La moyenne des mesures effectuées sur le fil à examiner et deux tiers au moins des mesures individuelles sont comprises dans les limites figurant dans les colonnes A du tableau 0660.-1 pour le numéro de diamètre correspondant. En aucun cas, une mesure n'est située hors des limites données dans les colonnes B du tableau 0660.-1 pour le numéro de diamètre correspondant.

Tableau 0660.-1. – *Diamètre et charges minimales de rupture*

| Numéro de diamètre | Diamètre (millimètres) | | | | Charge de rupture (newtons) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | | B | | C | D |
| | min. | max. | min. | max. | | |
| 1 | 0,100 | 0,149 | 0,085 | 0,175 | 1,8 | 0,4 |
| 1,5 | 0,150 | 0,199 | 0,125 | 0,225 | 3,8 | 0,7 |
| 2 | 0,200 | 0,249 | 0,175 | 0,275 | 7,5 | 1,8 |
| 2,5 | 0,250 | 0,299 | 0,225 | 0,325 | 10 | 3,8 |
| 3 | 0,300 | 0,349 | 0,275 | 0,375 | 12,5 | 7,5 |
| 3,5 | 0,350 | 0,399 | 0,325 | 0,450 | 20 | 10 |
| 4 | 0,400 | 0,499 | 0,375 | 0,550 | 27,5 | 12,5 |
| 5 | 0,500 | 0,599 | 0,450 | 0,650 | 38,4 | 20,0 |
| 6 | 0,600 | 0,699 | 0,550 | 0,750 | 45,0 | 27,5 |
| 7 | 0,700 | 0,799 | 0,650 | 0,850 | 60,0 | 38,0 |
| 8 | 0,800 | 0,899 | 0,750 | 0,950 | 70,0 | 45,0 |

**Charge minimale de rupture**. Déterminez la charge minimale de rupture sur un noeud simple obtenu comme suit : passez l'extrémité tenue dans la main droite par-dessus celle tenue dans la main gauche et tirez une des extrémités à travers la boucle ainsi formée (voir figure 0660.-1), puis tirez sur les extrémités pour serrer le noeud.

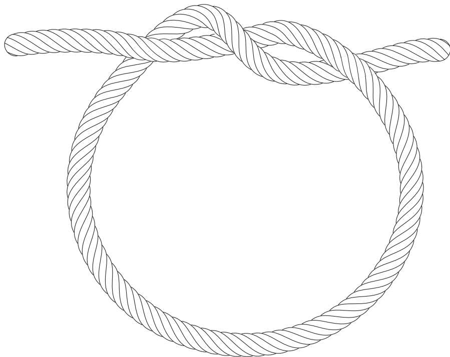


Figure 0660.-1. – *Noeud simple*

Effectuez l'essai sur le fil à raison d'une mesure tous les 2 m. Si le fil est constitué de plusieurs sections assemblées par des noeuds, effectuez au moins 3 mesures sur chaque section et, en tout cas, 1 mesure au moins tous les 2 m. Déterminez la charge de rupture en des points situés à peu près à égale distance les uns des autres à l'aide d'un dynamomètre approprié. L'appareil est muni de deux attaches servant à fixer le fil, dont l'une est mobile et se déplace à une vitesse de course constante de 30 cm par minute. Les dispositifs d'attache permettent la fixation des fils à examiner sans glissement possible. Au début de l'essai, la longueur du fil entre les serre-fils est de 12,5 cm à 20 cm. Le noeud se trouve à égale distance entre les points de fixation. Déclenchez le mouvement du serre-fils et notez la force requise pour rompre le fil. Lorsque le fil se rompt dans ses attaches ou à moins de 1 cm de celles-ci, répétez l'essai sur une autre partie du fil, le résultat d'un essai défectueux ne devant pas être pris en considération dans le calcul final. La moyenne de toutes les lectures prises en compte est égale ou supérieure à la valeur indiquée dans la colonne C du tableau 0660.-1, et aucune valeur n'est inférieure à la valeur indiquée dans la colonne D pour le numéro de diamètre correspondant.

**Composés solubles du chrome**. Introduisez 0,25 g de fil dans une fiole conique contenant 1 mL d'*eau R* pour 10 mg d'échantillon. Fermez la fiole et laissez reposer à 37 ± 0,5 °C pendant 24 h. Refroidissez et décantez la solution. Introduisez 5 mL de cette solution dans un tube à essai de petite taille et ajoutez 2 mL d'une solution de *diphénylcarbazide R* à 10 g/L dans l'*alcool R* et 2 mL d'*acide sulfurique dilué R*. La solution n'est pas plus fortement colorée qu'une solution témoin préparée simultanément avec 5 mL d'une solution contenant 2,83 µg de *dichromate de potassium R* par millilitre, 2 mL d'*acide sulfurique dilué R* et 2 mL d'une solution de *diphénylcarbazide R* à 10 g/L dans l'*alcool R* (1 ppm Cr).

**Stérilité** (*2.6.1*). Le fil satisfait à l'essai de stérilité prescrit pour le catgut et autres fils chirurgicaux. Effectuez l'essai sur 3 sections de 30 cm de longueur, prélevées respectivement au début, au centre et à la fin du fil.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière et de la chaleur.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le numéro de diamètre,
– la longueur en centimètres ou en mètres.

**01/2008:0608**

## FILS CHIRURGICAUX, FIL DE LIN STÉRILE EN DISTRIBUTEUR POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

### Filum lini sterile in fuso ad usum veterinarium

DÉFINITION

Le fil de lin stérile en distributeur pour usage vétérinaire est constitué par les fibres péricycliques de la tige de *Linum usitatissimum* L. Ces fibres élémentaires, d'une longueur de 2,5 cm à 5 cm, sont assemblées en faisceaux de 30 cm à 80 cm, puis en fils continus de diamètre approprié. Le fil est généralement blanc crème. Il peut être teint par des colorants autorisés par l'Autorité compétente. Il est ensuite stérilisé.

IDENTIFICATION

A. Effilochez l'extrémité d'un fil à l'aide d'une aiguille ou d'une pince, afin d'en isoler les fibres individuelles. Examinées au microscope, les fibres ont une largeur de 12 µm à 31 µm et présentent dans la majeure partie de leur longueur des parois épaisses, parfois finement striées longitudinalement et un lumen mince. Les fibres se rétrécissent lentement et se terminent par une pointe longue et fine. Par endroit, la fibre présente des renflements unilatéraux avec des lignes transversales.

B. Imprégnées de *solution de chlorure de zinc iodée R*, les fibres isolées prennent une teinte bleu-violet.

ESSAI

Le fil de lin stérile en distributeur pour usage vétérinaire satisfait aux essais prescrits dans la monographie *Fils non résorbables stériles en distributeur pour usage vétérinaire (0605)*.

*S'il est conservé à l'état sec, laissez séjourner le fil dans une atmosphère d'humidité relative de 65 ± 5 pour cent à 20 ± 2 °C pendant 4 h avant de mesurer le diamètre. Pour déterminer la charge minimale de rupture, immergez le fil dans l'eau R à température ambiante pendant 30 min immédiatement avant l'essai.*

CONSERVATION

Voir *Fils non résorbables stériles en distributeur pour usage vétérinaire (0605)*.

ÉTIQUETAGE

Voir *Fils non résorbables stériles en distributeur pour usage vétérinaire (0605)*.

**01/2008:0609**

## FILS CHIRURGICAUX, FIL DE POLYAMIDE-6 STÉRILE EN DISTRIBUTEUR POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

### Filum polyamidicum-6 sterile in fuso ad usum veterinarium

DÉFINITION

Le fil de polyamide-6 stérile en distributeur pour usage vétérinaire est obtenu par passage à la filière d'une matière plastique synthétisée par polymérisation d'ε-caprolactame. Le fil se présente en monofilaments cylindriques lisses ou en fils tressés, ou en fils légèrement tordus et gainés à l'aide d'une couche de la même substance. Il peut être teint par des colorants ou des pigments autorisés par l'Autorité compétente. Il est ensuite stérilisé.

CARACTÈRES

Il est pratiquement insoluble dans les solvants organiques usuels et n'est pas attaqué par les solutions alcalines diluées, telles qu'une solution d'hydroxyde de sodium à 100 g/L, mais l'est par les acides minéraux dilués, par exemple une solution d'acide sulfurique à 20 g/L, et, à chaud, par l'acide acétique glacial, et par l'acide formique à 70 pour cent *m/m*.

IDENTIFICATION

A. Dans un tube de verre scellé, chauffez 50 mg environ de fil à 110 °C, en présence de 0,5 mL d'*acide chlorhydrique R1* pendant 18 h. Laissez reposer pendant 6 h. Il ne se forme pas de cristaux.

B. Plongez 50 mg environ de fil dans 10 mL d'*acide chlorhydrique R1*. Il se désintègre à froid et se dissout complètement en quelques minutes.

C. Le fil se dissout dans une solution d'*acide formique anhydre R* à 70 pour cent *m/m*.

ESSAI

Le fil de polyamide-6 stérile en distributeur pour usage vétérinaire satisfait aux essais prescrits dans la monographie *Fils non résorbables stériles en distributeur pour usage vétérinaire (0605)* et à l'essai suivant :

**Monomère et oligomères**. Dans un appareil à épuisement continu, traitez 1,00 g de fil par 30 mL de *méthanol R*. Epuisez au bain-marie pendant 7 h, à raison de 3 extractions au moins par heure. Faites évaporer l'extrait méthanolique à siccité. Desséchez le résidu à 110 °C pendant 10 min. Laissez refroidir dans un dessiccateur et pesez. La masse du résidu n'est pas supérieure à 20 mg (2 pour cent).

CONSERVATION

Voir *Fils non résorbables stériles en distributeur pour usage vétérinaire (0605)*.

ÉTIQUETAGE

Voir *Fils non résorbables stériles en distributeur pour usage vétérinaire (0605)*.

L'étiquette indique la forme sous laquelle le fil se présente : monofilaments, fils tressés ou fils gainés.

**01/2008:0610**

# FILS CHIRURGICAUX, FIL DE POLYAMIDE 6/6 STÉRILE EN DISTRIBUTEUR POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Filum polyamidicum-6/6 sterile in fuso ad usum veterinarium

DÉFINITION

Le fil de polyamide 6/6 stérile en distributeur pour usage vétérinaire est obtenu par passage à la filière d'une matière plastique synthétisée par polycondensation d'hexaméthylène diamine et d'acide adipique. Le fil se présente en monofilaments cylindriques lisses ou en fils tressés, ou en fils légèrement tordus et gainés à l'aide d'une couche de la même substance. Il peut être teint par des colorants ou des pigments autorisés par l'Autorité compétente. Il est ensuite stérilisé.

CARACTÈRES

Il est pratiquement insoluble dans les solvants organiques usuels et n'est pas attaqué par les solutions alcalines diluées, telles qu'une solution d'hydroxyde de sodium à 100 g/L, mais l'est par les acides minéraux dilués, par exemple une solution d'acide sulfurique à 20 g/L, et, à chaud, par l'acide acétique glacial, et par l'acide formique à 80 pour cent *m/m*.

IDENTIFICATION

A. Mis au contact d'une flamme, le fil fond et brûle en formant une perle dure et en dégageant une odeur caractéristique rappelant celle du céléri.

B. Dans un tube à calcination maintenu en position verticale, introduisez 50 mg environ de fil. Chauffez doucement jusqu'à dégagement de vapeurs épaisses. Dès que celles-ci ont envahi le tube, retirez-le de la flamme et placez à l'intérieur et au contact des vapeurs une bande de *papier au nitrobenzaldéhyde R*. Il se développe lentement une coloration violet-brun qui pâlit lentement à l'air et disparaît presque instantanément par lavage à l'*acide sulfurique dilué R*.

C. Dans 10 mL d'*acide chlorhydrique R1*, introduisez 50 mg environ de fil. Il se désintègre à froid et se dissout en quelques minutes.

D. Le fil ne se dissout pas dans une solution d'*acide formique anhydre R* à 70 pour cent *m/m* mais se dissout dans une solution d'*acide formique anhydre R* à 80 pour cent *m/m*.

ESSAI

Le fil de polyamide 6/6 stérile en distributeur pour usage vétérinaire satisfait aux essais prescrits dans la monographie *Fils non résorbables stériles en distributeur pour usage vétérinaire (0605)*.

CONSERVATION

Voir *Fils non résorbables stériles en distributeur pour usage vétérinaire (0605)*.

ÉTIQUETAGE

Voir *Fils non résorbables stériles en distributeur pour usage vétérinaire (0605)*.

L'étiquette indique la forme sous laquelle le fil se présente : monofilaments, fils tressés ou fils gainés.

**01/2008:0607**

# FILS CHIRURGICAUX, FIL DE POLY(TÉRÉPHTALATE D'ÉTHYLÈNE) STÉRILE EN DISTRIBUTEUR POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Filum ethyleni polyterephthalici sterile in fuso ad usum veterinarium

DÉFINITION

Le fil de poly(téréphtalate d'éthylène) stérile en distributeur pour usage vétérinaire est obtenu par passage à la filière de poly(téréphtalate d'éthylène). Le fil est préparé par tressage de fils très fins, assemblés en nombre variable suivant le diamètre désiré. Le fil en poly(téréphtalate d'éthylène) est blanchâtre et peut être teint par des colorants ou des pigments autorisés par l'Autorité compétente. Il est ensuite stérilisé.

CARACTÈRES

Il est pratiquement insoluble dans la plupart des solvants organiques usuels. Il est attaqué par les solutions alcalines concentrées et est incompatible avec les phénols.

IDENTIFICATION

A. Le fil est difficilement soluble à chaud dans le *diméthylformamide R* et dans le *dichlorobenzène R*.

B. Dans 10 mL d'*acide chlorhydrique R1*, introduisez 50 mg environ de fil. Il reste intact, même après 6 h.

ESSAI

Le fil de poly(téréphtalate d'éthylène) stérile en distributeur pour usage vétérinaire satisfait aux essais prescrits dans la monographie *Fils non résorbables stériles en distributeur pour usage vétérinaire (0605)*.

CONSERVATION

Voir *Fils non résorbables stériles en distributeur pour usage vétérinaire (0605)*.

ÉTIQUETAGE

Voir *Fils non résorbables stériles en distributeur pour usage vétérinaire (0605)*.

**01/2008:0605**

# FILS CHIRURGICAUX, FILS NON RÉSORBABLES STÉRILES EN DISTRIBUTEUR POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Fila non resorbilia sterilia in fuso ad usum veterinarium

DÉFINITION

*Les indications figurant dans cette monographie s'appliquent aux monographies individuelles de la Pharmacopée sur les fils non résorbables stériles en distributeur pour usage vétérinaire et ne concernent pas nécessairement les fils non résorbables stériles en distributeur pour usage vétérinaire qui ne font pas l'objet d'une monographie dans le présent ouvrage.*

Les fils non résorbables stériles en distributeur pour usage vétérinaire sont des fils qui, introduits dans un organisme vivant, n'y sont pas métabolisés. Ils ont des origines diverses : animale, végétale ou synthétique. Ils se présentent en monofilaments cylindriques ou multifils eux-mêmes constitués de fibres élémentaires qui, une fois assemblées, peuvent être retordues, cablées ou tressées, et éventuellement gainées et peuvent être

traitées de façon à les rendre non capillaires. Les fils peuvent être teints par des colorants ou des pigments autorisés par l'Autorité compétente. Ils sont ensuite stérilisés.

Les fils sont conditionnés dans un distributeur qui permet le retrait et l'utilisation du fil dans des conditions aseptiques. Le distributeur est conçu de façon que, sous réserve d'une manipulation adéquate, le contenu conserve sa stérilité même quand une partie du fil a été prélevée. Les fils peuvent être maintenus à l'état sec ou dans un liquide qui peut contenir un conservateur antimicrobien, à l'exclusion de tout antibiotique.

ESSAI

*Procédez sans délai et successivement à la mesure de la longueur, du diamètre et de la charge minimale de rupture, après avoir prélevé le fil hors de son distributeur.*

**Longueur**. Mesurez la longueur du fil, tel qu'il est présenté, sans le soumettre à une tension supérieure à celle que nécessite son maintien en position rectiligne. La longueur de chaque fil n'est pas inférieure à 95 pour cent de celle qui est indiquée sur l'étiquette.

**Diamètre**. Sauf indication contraire, effectuez les mesures sur le fil tel qu'il est présenté, à l'aide d'un instrument approprié muni d'un disque presseur, d'un diamètre de 10 mm à 15 mm, permettant d'atteindre une précision d'au moins 0,002 mm. Ajustez la masse du disque presseur et les dispositifs mobiles s'y rattachant de façon que la charge totale appliquée sur le fil à examiner soit de 100 ± 10 g. Au cours de l'opération, abaissez lentement le disque presseur sur le fil en évitant d'écraser ce dernier. Effectuez au moins 1 mesure tous les 2 mètres et, en tous cas, 12 mesures au moins, en des points situés approximativement à égale distance. Ne soumettez pas le fil monofilament à une tension supérieure à celle que nécessite son maintien en position rectiligne. Appliquez aux fils multifilaments une tension inférieure ou égale au cinquième de la charge de rupture figurant à la colonne C du tableau 0605.-1 en fonction du numéro de diamètre et du type de matériau du fil à examiner en n'appliquant dans aucun cas une tension supérieure à 10 N. Pour les fils multifilaments d'un numéro de diamètre supérieur à 1,5, effectuez 2 mesures du diamètre en chaque point, la deuxième mesure étant faite après rotation de l'axe du fil à 90°. Le diamètre du fil en ce point est donné par la moyenne des 2 mesures. La moyenne des mesures effectuées sur le fil à examiner et deux tiers au moins des mesures individuelles sont compris dans les limites figurant dans les colonnes A du tableau 0605.-1 pour le numéro de diamètre correspondant. Aucune des mesures n'est située hors des limites données dans les colonnes B du tableau 0605.-1 pour le numéro de diamètre correspondant.

**Charge minimale de rupture**. Sauf indication contraire, déterminez, sur le fil tel qu'il est présenté, la charge minimale de rupture sur un noeud simple obtenu comme suit : passez l'extrémité tenue dans la main droite par-dessus celle tenue dans la main gauche et tirez une des extrémités à travers la boucle ainsi formée (voir figure 0605.-1), puis tirez sur les extrémités pour serrer le noeud.

Effectuez au moins 1 mesure tous les 2 m en des points situés approximativement à égale distance. Déterminez la charge de rupture à l'aide d'un dynamomètre approprié. L'appareil est muni de deux attaches servant à fixer le fil, dont l'une est mobile et se déplace à une vitesse de course constante de 30 cm par minute. Les dispositifs d'attache permettent la fixation des fils à examiner sans glissement possible. Au début de l'essai, la longueur du fil entre les serre-fils est de 12,5 cm à 20 cm. Le noeud se trouve à égale distance entre les points de fixation. Déclenchez le mouvement du serre-fils et notez la force requise pour rompre le fil. Lorsque le fil se rompt dans ses attaches ou à moins de 1 cm de celles-ci, répétez l'essai sur un nouveau fil, le résultat d'un essai défectueux ne devant pas être pris en considération dans le calcul final. La moyenne de toutes les lectures prises en compte est égale ou supérieure à la valeur indiquée dans la colonne C du tableau 0605.-1, et aucune valeur n'est inférieure à la valeur indiquée dans la colonne D pour le numéro de diamètre et le matériau du fil examiné.

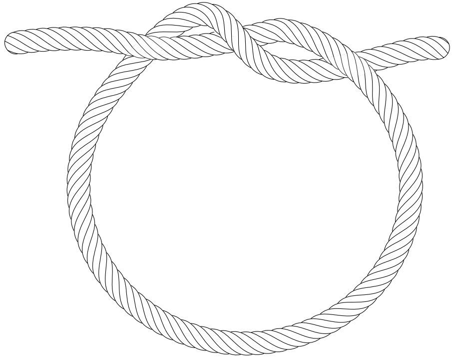


Figure 0605.-1. – *Noeud simple*

Tableau 0605.-1. – *Diamètres et charges minimales de rupture*

| Numéro de diamètre | Diamètre (millimètres) | | | | Charge minimale de rupture (newtons) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | | B | | Lin | | Fils d'autres matériaux | |
| | min. | max. | min. | max. | C | D | C | D |
| 0,5 | 0,050 | 0,069 | 0,045 | 0,085 | - | - | 1,0 | 0,35 |
| 0,7 | 0,070 | 0,099 | 0,060 | 0,125 | 1,0 | 0,3 | 1,5 | 0,60 |
| 1 | 0,100 | 0,149 | 0,085 | 0,175 | 2,5 | 0,6 | 3,0 | 1,0 |
| 1,5 | 0,150 | 0,199 | 0,125 | 0,225 | 5,0 | 1,0 | 5,0 | 1,5 |
| 2 | 0,200 | 0,249 | 0,175 | 0,275 | 8,0 | 2,5 | 9,0 | 3,0 |
| 2,5 | 0,250 | 0,299 | 0,225 | 0,325 | 9,0 | 5,0 | 13,0 | 5,0 |
| 3 | 0,300 | 0,349 | 0,275 | 0,375 | 11,0 | 8,0 | 15,0 | 9,0 |
| 3,5 | 0,350 | 0,399 | 0,325 | 0,450 | 15,0 | 9,0 | 22,0 | 13,0 |
| 4 | 0,400 | 0,499 | 0,375 | 0,550 | 18,0 | 11,0 | 27,0 | 15,0 |
| 5 | 0,500 | 0,599 | 0,450 | 0,650 | 26,0 | 15,0 | 35,0 | 22,0 |
| 6 | 0,600 | 0,699 | 0,550 | 0,750 | 37,0 | 18,0 | 50,0 | 27,0 |
| 7 | 0,700 | 0,799 | 0,650 | 0,850 | 50,0 | 26,0 | 62,0 | 35,0 |
| 8 | 0,800 | 0,899 | 0,750 | 0,950 | 65,0 | 37,0 | 73,0 | 50,0 |

**Stérilité** (*2.6.1*). Les fils non résorbables stériles en distributeur pour usage vétérinaire satisfont à l'essai de stérilité prescrit pour le catgut et autres fils chirurgicaux. Effectuez l'essai sur 3 sections de 30 cm de longueur, prélevées respectivement au début, au centre et à la fin du fil.

**Colorants extractibles**. Lorsque le fil est coloré et destiné à le rester au cours de son emploi, il satisfait en plus à l'essai des colorants extractibles. Dans une fiole conique, introduisez 0,25 g du fil à examiner. Ajoutez 25,0 mL d'*eau R* et obturez l'orifice de la fiole en y plaçant un entonnoir à courte tige. Chauffez à ébullition pendant 15 min, refroidissez et ajustez au volume initial avec de l'*eau R*. Suivant la coloration du fil, préparez la solution témoin appropriée comme indiqué au tableau 0605.-2, en utilisant les solutions primaires de coloration (*2.2.2*).

Tableau 0605.-2. – *Solutions témoins de coloration*

| Coloration du fil | Composition de la solution témoin en parties par volume | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Solution primaire rouge | Solution primaire jaune | Solution primaire bleue | Eau R |
| Brun - jaune | 0,2 | 1,2 | – | 8,6 |
| Rouge - rose | 1,0 | – | – | 9,0 |
| Bleu - vert | – | – | 2,0 | 8,0 |
| Violet | 1,6 | – | 8,4 | – |

La solution à examiner n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin appropriée.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière et de la chaleur.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– le numéro de diamètre,
– la longueur en centimètres ou en mètres,
– si nécessaire que le fil est coloré et destiné à le rester au cours de son emploi.

**01/2008:0606**

# FILS CHIRURGICAUX, SOIES TRESSÉES ET STÉRILES EN DISTRIBUTEUR POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

## Filum bombycis tortum sterile in fuso ad usum veterinarium

DÉFINITION

Les soies tressées et stériles en distributeur pour usage vétérinaire sont obtenues par tressage d'un nombre variable, suivant le diamètre désiré, de fils de soie décreusée provenant du dévidage des cocons du ver à soie, *Bombyx mori* L. Les soies tressées peuvent être teintes par des colorants autorisés par l'Autorité compétente. Elles sont ensuite stérilisées.

IDENTIFICATION

A. Effilochez l'extrémité d'un fil à l'aide d'une aiguille ou d'une pince afin d'en isoler quelques fibres. Certaines fibres présentent parfois de très fines stries longitudinales, parallèles à l'axe de la fibre. Examinée au microscope, la coupe transversale est plus ou moins triangulaire ou semi-circulaire, à bords arrondis, sans lumen.

B. Imprégnées de *solution d'iodure de potassium iodée R*, les fibres isolées prennent une teinte jaune clair.

ESSAI

Les soies tressées et stériles en distributeur pour usage vétérinaire satisfont aux essais prescrits dans la monographie *Fils non résorbables stériles en distributeur pour usage vétérinaire (0605)*.

CONSERVATION

Voir *Fils non résorbables stériles en distributeur pour usage vétérinaire (0605)*.

ÉTIQUETAGE

Voir *Fils non résorbables stériles en distributeur pour usage vétérinaire (0605)*.

Fils chirurgicaux

# DROGUES VÉGÉTALES ET PRÉPARATIONS À BASE DE DROGUES VÉGÉTALES



Drogues végétales

**01/2011:90029**

## INTRODUCTION

*Pour des raisons pratiques, et pour une plus grande facilité d'utilisation de la Pharmacopée Européenne, les monographies traitant de drogues végétales et de préparations à base de drogues végétales ont été regroupées dans la section suivante.*

*La liste de ces monographies n'est pas exhaustive et n'a pas vocation à constituer une définition réglementaire des produits végétaux. Elle repose sur les définitions figurant dans les monographies générales Drogues végétales (1433) et Préparations à base de drogues végétales (1434) et n'a d'autre but que de faciliter la tâche aux utilisateurs.*

**01/2008:1380**
**corrigé 6.0**

## ABSINTHE

### Absinthii herba

DÉFINITION

Feuille basilaire ou sommité fleurie, légèrement feuillée, ou mélange de ces organes entiers ou contusés, séchés, d'*Artemisia absinthium* L.

*Teneur* : au minimum 2 mL/kg d'huile essentielle (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La feuille d'absinthe est grisâtre ou verdâtre, fortement tomenteuse sur les 2 faces. La feuille basilaire, longuement pétiolée, présente un limbe triangulaire ou ovale bipennatiséqué ou tripennatiséqué, à segments arrondis ou lancéolés. La feuille caulinaire est moins segmentée et la feuille apicale a une forme lancéolée. La tige de la région florifère est gris-vert, tomenteuse, d'un diamètre pouvant atteindre 2,5 mm, et présente le plus souvent 5 rainures longitudinales aplaties. Les capitules sont disposés en panicules lâches, axillaires, insérées au niveau des feuilles lancéolées ou faiblement pennatiséquées ; ils sont sphériques à hémisphériques aplatis, ont un diamètre de 2-4 mm, et se composent d'un involucre gris, tomenteux, formé de bractées externes linéaires et de bractées internes ovales, à pointe émoussée et marge scarieuse, et d'un réceptacle comportant de très longues paillettes, pouvant atteindre ou même dépasser 1 mm, ainsi que de nombreuses fleurs tubulées jaunes, hermaphrodites, d'une longueur d'environ 2 mm, entourées de quelques fleurs ligulées jaunes.

B. Réduisez l'absinthe en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est gris-vert. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : de nombreux poils tecteurs en forme de T, à court pédicelle unisérié formé de 1-5 cellules de petite taille coiffées perpendiculairement par une très longue cellule terminale, onduleuse et à extrémités fuselées ; des fragments de tissu épidermique comportant des cellules à paroi sinueuse ou ondulée, des stomates de type anomocytique (*2.8.3*) et des poils sécréteurs composés d'un court pédicelle bicellulaire bisérié et d'une tête bisériée formée de 2-4 cellules ; des fragments des fleurs tubulées et ligulées, dont certains contiennent de petites macles d'oxalate de calcium ; de nombreuses paillettes composées d'une petite cellule formant un pédicelle et d'une très longue cellule terminale cylindrique, à paroi mince, d'une longueur d'environ 1-1,5 mm ; des grains de pollen sphéroïdes, d'un diamètre d'environ 30 µm, à 3 pores et à exine finement verruqueuse ; des faisceaux de fibres, des petits vaisseaux à épaississement spiralé et annulaire, des vaisseaux plus grands à ponctuations aréolées et des cellules parenchymateuses à paroi ponctuée et modérément épaissie, provenant de la tige.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Placez 2 g d'absinthe pulvérisée (355) (*2.9.12*) dans 50 mL d'*eau R* bouillante et laissez reposer pendant 5 min en agitant le ballon à plusieurs reprises. Après refroidissement, ajoutez 5 mL d'une solution d'*acétate de plomb R* à 100 g/L. Mélangez et filtrez. Rincez le ballon et le résidu du filtre avec 20 mL d'*eau R*. Agitez le filtrat avec 50 mL de *chlorure de méthylène R*. Séparez la couche organique, séchez-la sur du *sulfate de sodium anhydre R*, filtrez et évaporez le filtrat à siccité au bain-marie. Dissolvez le résidu dans 0,5 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 2 mg de *rouge de méthyle R* et 2 mg de *résorcinol R* dans 10,0 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétone R, acide acétique glacial R, toluène R, chlorure de méthylène R* (10:10:30:50 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : pulvérisez de la *solution d'anhydride acétique-acide sulfurique R* et examinez à la lumière du jour.

*Résultats A* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande bleue due à l'artabsine un peu au-dessus de la bande rouge due au rouge de méthyle dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

*Détection B* : examinez à la lumière du jour en chauffant à 100-105 °C pendant 5 min.

*Résultats B* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente dans son tiers médian une bande rouge due au rouge de méthyle et, au-dessous, une bande rose clair due au résorcinol. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une intense bande rouge ou rouge-brun due à l'absinthine, à un $R_F$ voisin de celui de la bande due au résorcinol dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. D'autres bandes sont visibles, mais sont moins intenses que celle due à l'absinthine.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent de tiges de diamètre supérieur à 4 mm et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Indice d'amertume** (*2.8.15*) : au minimum 10 000.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g d'absinthe pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum12,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 1,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez 50,0 g d'absinthe contusée, un ballon à fond rond de 1000 mL et 500 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Ajoutez 0,5 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant au minimum 3 h.

**07/2010:1382**

## ACHILLÉE MILLEFEUILLE

### Millefolii herba

DÉFINITION

Sommité fleurie séchée, entière ou fragmentée, d'*Achillea millefolium* L.

*Teneur* :

– *huile essentielle* : au minimum 2 mL/kg (drogue desséchée),

– *proazulènes, exprimés en chamazulène* ($C_{14}H_{16}$ ; $M_r$ 184,3) : au minimum 0,02 pour cent (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La feuille, verte ou vert-gris, présente une face supérieure légèrement pubescente et une face inférieure plus fortement pubescente ; elle est pennée, à 2-3 niveaux de subdivision, avec des lobes linéaires et une extrémité en pointe assez aiguë, blanchâtre. Les capitules sont disposés en corymbe à l'extrémité de la tige. Chaque capitule, d'un diamètre de 3-5 mm, est composé du réceptacle, de fleurs externes ligulées, en général au nombre de 4-5, et de 3-20 fleurs centrales tubulées. L'involucre comporte 3 rangées de bractées vertes, pubescentes, imbriquées, de forme lancéolée, à bord membraneux, brunâtre ou blanchâtre. Le réceptacle est peu convexe et porte des paillettes à l'aisselle desquelles sont insérées des fleurs externes, à ligule blanchâtre ou rougeâtre trilobée, et des fleurs centrales tubulées à corolle radiale à 5 lobes jaunâtres ou brunâtre clair. La tige, pubescente, verte ou par endroits brune ou violette, d'une épaisseur allant jusqu'à 3 mm, présente des sillons longitudinaux et une partie médullaire claire.

B. Réduisez l'achillée millefeuille en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est verte ou vert-gris. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de tiges, de feuilles et de bractées portant des poils sécréteurs, très rares, à pédicelle court, à tête formée de 2 rangées de 3-5 cellules incluses dans une membrane en forme de vésicule, des poils tecteurs unisériés, composés de 4-6 petites cellules plus ou moins isodiamétriques à la base et d'une cellule terminale à paroi épaisse, souvent légèrement sinueuse, d'une longueur variant d'environ 400 µm à plus de 1000 µm ; des fragments de corolle ligulée à cellules épidermiques papilleuses ; du parenchyme de la corolle tubulée à petites cellules contenant des macles d'oxalate de calcium, des groupes de cellules lignifiées et ponctuées provenant des bractées ; des grains de pollen sphériques, d'un diamètre d'environ 30 µm avec 3 pores germinatifs et exine échinulée ; des groupes de fibres sclérenchymateuses et de petits vaisseaux épaissis, spiralés ou annelés, provenant de la tige.

C. A 2,0 g d'achillée millefeuille pulvérisée (710) (*2.9.12*), ajoutez 25 mL d'*acétate d'éthyle R* et agitez pendant 5 min, puis filtrez. Evaporez à siccité au bain-marie et dissolvez le résidu dans 0,5 mL de *toluène R* (solution A). A 0,1 mL de cette solution, ajoutez 2,5 mL de *solution de diméthylaminobenzaldéhyde R8* puis chauffez au bain-marie pendant 2 min. Laissez refroidir. Ajoutez 5 mL d'*éther de pétrole R* et agitez énergiquement le mélange. La phase aqueuse présente une coloration bleue ou bleu-vert.

D. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Utilisez la solution A préparée dans l'identification C.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg de *cinéole R* et 10 mg de *gaïazulène R* dans 20 mL de *toluène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

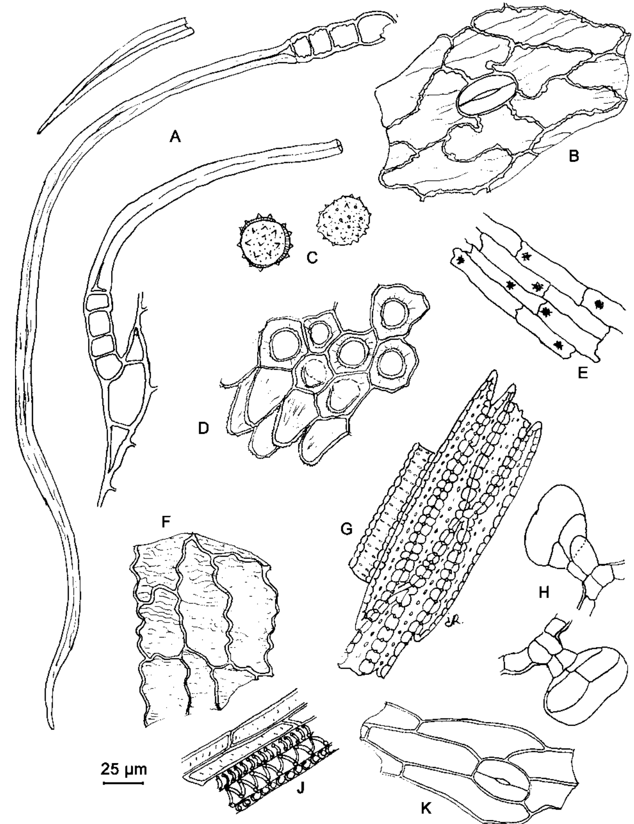
*Dépôt* : 20 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R*. Chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min et examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente une bande rouge (gaïazulène) dans sa partie supérieure et une bande bleue ou bleu-gris (cinéole) dans sa partie médiane. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande violette légèrement au-dessus de la bande due au gaïazulène dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin ; au-dessous de cette bande, une bande violet-rouge sous laquelle 1-2 bandes, non clairement séparées, violet-gris ou grisâtres (virant au gris-vert après quelques heures) et une autre bande violet-rouge légèrement au dessus de la bande due au cinéole dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. D'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes.




A. Poils tecteurs, entiers ou fragmentés
B. Epiderme de la feuille, avec stomate anomocytique, vu de face
C. Grains de pollen
D. Fragment de corolle ligulée à cellules épidermiques papilleuses
E. Parenchyme de la corolle tubulée à petites cellules contenant des macles d'oxalate de calcium
F. Epiderme de la corolle tubulée, vu de face
G. Cellules lignifiées des bractées
H. Poils sécréteurs
J. Fibres sclérenchymateuses et vaisseaux de la tige
K. Epiderme de la tige, vu de face

Figure 1382.-1. – *Dessin pour l'identification de l'achillée millefeuille (voir Identification B)*

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent de tiges de diamètre supérieur à 3 mm et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 0,500 g d'achillée millefeuille pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 2,5 pour cent.

DOSAGE

**Huile essentielle**. Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez 20,0 g d'achillée millefeuille fragmentée, un ballon à fond rond de 1000 mL et 500 mL d'un mélange de 1 volume d'*eau R* et de

9 volumes d'*éthylèneglycol R* comme liquide d'entraînement. Ajoutez 0,2 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 2 h.

Stoppez la réfrigération à la fin de la distillation et poursuivez la distillation jusqu'à ce que les composants bleus entraînés par la vapeur aient atteint la base du réfrigérant. Reprenez immédiatement la réfrigération, pour éviter de chauffer l'espace de séparation. Arrêtez la distillation après 5 min. Remplacez le ballon de 1000 mL par un ballon de 250 mL contenant un mélange de 0,4 mL de *xylène R* et de 50 mL d'*eau R*. Distillez pendant 15 min. Après 10 min, notez le volume total. Pour déterminer la valeur à blanc, placez 0,2 mL de *xylène R* dans le tube gradué et distillez un mélange de 0,4 mL de *xylène R* et de 50 mL d'*eau R* pendant 15 min.

**Proazulènes**. En prenant soin de prélever le moins d'eau possible, transférez dans un ballon jaugé de 50 mL le mélange bleu d'huile essentielle et de xylène obtenu lors du dosage de l'huile essentielle, à l'aide de petites quantités de *xylène R* et en rinçant le tube gradué de l'appareil avec du *xylène R*, puis complétez à 50,0 mL avec le même solvant. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 608 nm en utilisant le *xylène R* comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en proazulènes, exprimés en chamazulène, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 2,1}{m}$$

en prenant 23,8 comme valeur de l'absorbance spécifique du chamazulène.

$A$ = absorbance à 608 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2009:0310**

# AGAR-AGAR

## Agar

DÉFINITION

Polyosides de diverses espèces de Rhodophyceae, principalement du genre *Gelidium*. L'agar-agar est extrait par traitement des algues à l'eau bouillante ; l'extrait est filtré à chaud, puis concentré et desséché.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre, rubans chiffonnés d'une largeur de 2-5 mm, ou parfois flocons, incolores ou jaune pâle, translucides, plutôt résistants et difficiles à rompre, devenant cassants au séchage.

Saveur mucilagineuse.

IDENTIFICATION

A. Examinez au microscope en utilisant de l'*iode 0,005 M*. L'agar-agar sous forme de bandes ou de flocons se colore en partie en violet-brun. Vu sous grossissement (100 ×), il présente les éléments suivants : de nombreux grains minuscules, incolores, ovoïdes ou arrondis, sur un fond amorphe et parfois des spores brunes, arrondies ou ovoïdes, à surface réticulée, mesurant jusqu'à 60 µm. Réduisez l'agar-agar en poudre, si nécessaire. La poudre est blanc-jaune. Examinez au microscope en utilisant de l'*iode 0,005 M*. La poudre présente des fragments anguleux sur lesquels se trouvent de nombreux grains, similaires à ceux qui sont observés dans les rubans et flocons ; la coloration de certains fragments vire au violet-brun.

B. Dissolvez en chauffant 0,1 g d'agar-agar dans 50 mL d'*eau R*. Refroidissez et ajoutez prudemment 3 mL d'*eau R* à 1 mL de mucilage de façon à obtenir 2 phases distinctes. Ajoutez ensuite 0,1 mL d'*iode 0,05 M*. A la zone de contact, il apparaît une coloration violet-brun foncé. Mélangez ; le liquide devient jaune pâle.

C. Chauffez au bain-marie 5 mL du mucilage préparé pour l'identification B avec 0,5 mL d'*acide chlorhydrique R* pendant 30 min. Ajoutez 1 mL de *solution de chlorure de baryum R1*. Il se forme un trouble blanc dans les 30 min.

D. Chauffez au bain-marie 0,5 g d'agar-agar avec 50 mL d'*eau R* jusqu'à dissolution. Seuls de rares fragments restent insolubles. Au cours du refroidissement, la solution se gélifie entre 35 °C et 30 °C. Le gel obtenu, chauffé au bain-marie, ne se liquéfie qu'au-dessus de 80 °C.

ESSAI

**Indice de gonflement** (*2.8.4*) : au minimum 10 et dans les 10 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette, déterminé sur l'agar-agar pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**Matières insolubles** : au maximum 1,0 pour cent.

A 5,00 g d'agar-agar pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 100 mL d'*eau R* et 14 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*. Faites bouillir doucement pendant 15 min en agitant fréquemment. Filtrez à chaud sur un filtre de verre fritté (160) (*2.1.2*) taré. Lavez à l'*eau R* chaude et desséchez à 100-105 °C. La masse du résidu est au maximum de 50 mg.

**Gélatine**. Chauffez au bain-marie 1,00 g d'agar-agar avec 100 mL d'*eau R* jusqu'à dissolution. Laissez refroidir à 50 °C. A 5 mL de cette solution, ajoutez 5 mL de *solution d'acide picrique R*. Il ne se forme aucun trouble dans les 10 min.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 20,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g d'agar-agar pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 5,0 pour cent.

**Contamination microbienne**

DGAT : critère d'acceptation $10^3$ UFC/g (*2.6.12*).

DMLT : critère d'acceptation $10^2$ UFC/g (*2.6.12*).

Absence d'*Escherichia coli* (*2.6.13*).

Absence de salmonelles (*2.6.13*).

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique l'indice de gonflement.

**01/2008:1833**
**corrigé 6.0**

# AGRIPAUME

## Leonuri cardiacae herba

DÉFINITION

Parties aériennes fleuries, séchées, entières ou fragmentées, de *Leonurus cardiaca* L.

*Teneur* : au minimum 0,2 pour cent de flavonoïdes, exprimés en hypéroside ($C_{21}H_{20}O_{12}$ ; $M_r$ 464,4) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Les morceaux de tige sont velus, striés longitudinalement, quadrangulaires, creux et peuvent atteindre 10 mm de large. Les tiges portent des feuilles pétiolées, opposées et décussées et environ 6 à 12 petites fleurs disposées en glomérule à l'aisselle des feuilles supérieures, l'ensemble formant un long épi feuillé. Les feuilles inférieures sont ovales à orbiculaires, découpées en 3 à 5 lobes, rarement 7, irrégulièrement dentés. Les feuilles supérieures sont entières ou légèrement trifides, lancéolées avec des bords en dents de scie et cunées à la base. La face supérieure des feuilles est verte avec des poils isolés, la face inférieure est d'un vert plus pâle, très pubescente et présente une nervation saillante, réticulée et palmée. Les fleurs ont un calice infundibuliforme, de 3 mm à 5 mm de long avec 5 dents rigides et recourbées ; la corolle est bilabiée avec une lèvre supérieure rose et pubescente à l'extérieur et une lèvre inférieure blanche avec des taches pourprées ; les étamines par 4 sont fortement pubescentes.

B. Réduisez l'agripaume en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est verte. Examinez au microscope, en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de limbe avec du mésophylle qui comporte une assise de cellules palissadiques atteignant presque le milieu et un parenchyme lacuneux et lâche ; des fragments d'épiderme de feuille ; des cellules de l'épiderme supérieur à parois anticlinales droites et une cuticule striée ; des cellules de l'épiderme inférieur avec des parois anticlinales sinueuses ; des stomates de type diacytique (*2.8.3*), plus nombreux sur la surface inférieure ; des poils glanduleux à pied court unicellulaire et à tête globuleuse comprenant 8, parfois jusqu'à 16 cellules, ou une tête unicellulaire ; des poils tecteurs coniques, unisériés, pouvant atteindre environ 300 µm de longueur, occasionnellement 1500 µm, composés de 2 à 8 cellules avec de légers renflements aux jonctions et une cuticule striée ou verruqueuse ; des fragments de calice avec de petits cristaux isolés d'oxalate de calcium ; des grains de pollen sphériques, de 25 µm à 30 µm de diamètre, à 3 pores et 3 sillons et à exine lisse ; des fibres lignifiées à parois épaisses et des vaisseaux épaissis spiralés et annelés provenant de la tige ; des fragments occasionnels de péricarpe avec des cristaux d'oxalate de calcium isolés.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 0,5 g d'agripaume pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 5 mL de *méthanol R*. Chauffez dans un bain-marie à 65 °C pendant 5 min en agitant. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *jaune naphtol S R* et 2,0 mg de *catalpol R* dans 5,0 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, eau R, acétate d'éthyle R* (20:20:60 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution de diméthylamino-benzaldéhyde R2* (environ 5 mL pour une plaque de 200 mm de côté) ; chauffez à 100-105 °C pendant 10 min jusqu'à apparition des taches ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible coloration bleu-gris peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une large bande blanche<br>Une bande bleu-gris (iridoïde) |
| ——— | ——— |
| Jaune naphtol S : une bande jaune intense<br>Catalpol : une bande bleu-gris | 1 ou 2 bandes bleu-gris (iridoïde) |
| ——— | ——— |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 2 pour cent de feuilles brunes ou jaunes et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g d'agripaume pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 12,0 pour cent.

DOSAGE

*Solution mère*. Dans un ballon à fond rond de 100 mL, introduisez 1,00 g d'agripaume pulvérisée (355) (*2.9.12*) et ajoutez 1 mL d'une solution d'*hexaméthylènetétramine R* à 5 g/L, 20 mL d'*acétone R* et 2 mL d'*acide chlorhydrique R1*. Chauffez à reflux pendant 30 min. Filtrez le liquide à travers un tampon de coton hydrophile en recueillant le filtrat dans une fiole. Ajoutez le coton hydrophile au résidu dans le ballon à fond rond et extrayez avec 2 fois 20 mL d'*acétone R*, en chauffant chaque fois à reflux pendant 10 min. Laissez refroidir puis filtrez à travers un tampon de coton hydrophile en recueillant le filtrat dans la fiole. Après refroidissement, filtrez les extraits à l'acétone réunis à travers un filtre en papier dans une fiole jaugée, puis complétez à 100,0 mL avec de l'*acétone R* en rinçant la fiole et le filtre en papier. Placez 20,0 mL de cette solution dans une ampoule à décantation, ajoutez 20 mL d'*eau R* et agitez le mélange avec 1 fois 15 mL, puis 3 fois 10 mL d'*acétate d'éthyle R*. Réunissez les extraits à l'acétate d'éthyle dans une ampoule à décantation, lavez avec 2 fois 50 mL d'*eau R*, puis filtrez sur 10 g de *sulfate de sodium anhydre R* en recueillant le filtrat dans une fiole jaugée. Complétez à 50,0 mL avec de l'*acétate d'éthyle R*.

*Solution à examiner*. A 10,0 mL de solution mère, ajoutez 1 mL de *réactif au chlorure d'aluminium R* et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide acétique glacial R* à 5 pour cent *V/V* dans du *méthanol R*.

*Liquide de compensation*. Prélevez 10,0 mL de solution mère et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide acétique glacial R* à 5 pour cent *V/V* dans du *méthanol R*.

Après 30 min, mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner à 425 nm, par rapport au liquide de compensation. Calculez la teneur pour cent en flavonoides, exprimés en hypéroside, à l'aide de l'expression :

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

en prenant 500 comme valeur de l'absorbance spécifique de l'hypéroside.

$A$ = absorbance à 425 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2011:1587**

# AIGREMOINE

## Agrimoniae herba

DÉFINITION

Sommité fleurie séchée d'*Agrimonia eupatoria* L.

*Teneur* : au minimum 2,0 pour cent de tanins, exprimés en pyrogallol ($C_6H_6O_3$ ; $M_r$ 126,1) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La tige est verte ou, le plus souvent, rougeâtre, cylindrique et peu ramifiée. Elle est couverte de poils longs, dressés ou enchevêtrés. Les feuilles sont composées, imparipennées avec 3 ou 6 paires de folioles opposées entre lesquelles se trouvent 2 à 3 folioles plus petites. Les folioles sont dentées profondément ou en dents de scie, leur face supérieure est vert foncé, la face inférieure est grisâtre et fortement tomenteuse. Les fleurs sont petites et forment un épi terminal. Elles sont pentamères et se développent aux aisselles de bractées velues, le calice est entouré de près par de nombreux brins se terminant en crochet et prenant naissance au bord du réceptacle velu. Les pétales sont libres, jaunes et caducs. Des réceptacles fructifères coniques, à profonds sillons et à soies recourbées en crochet, sont généralement présents à la base de l'inflorescence.

B. Réduisez l'aigremoine en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-jaune ou grise. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants (figure 1587.-1) : de nombreux poils tecteurs [Ab, Ca, F] longs, droits ou courbés, unicellulaires, à parois épaisses (environ 500 µm), finement verruqueux et comportant parfois des marques en spirale, souvent fragmentés (F) ; des fragments de l'épiderme des tiges [A] portant des stomates [Aa], des poils tecteurs (Ab) et des poils sécréteurs [Ac] ; des fragments d'épiderme foliaire supérieur vu de face [C] aux parois droites, portant des poils tecteurs (Ca), accompagné de parenchyme palissadique [Cb] dont certaines cellules contiennent des prismes d'oxalate de calcium [Cc] ; des fragments d'épiderme foliaire inférieur vu de face [J] à parois sinueuses comportant de nombreux stomates [Ja], principalement anomocytiques (*2.8.3*) mais pouvant occasionnellement être anisocytiques, et des poils sécréteurs [Jb] ; des grains de pollen ovoïdes à subsphériques, à 3 pores et à exine lisse [D] ; des poils sécréteurs à pied pluricellulaire unisérié et tête unicellulaire à quadricellulaire [B, Jb] ; des fragments de tiges [H] comportant des groupes de fibres [Ha] et des cellules parenchymateuses dont certaines contiennent des macles d'oxalate de calcium [Hb] ; des petits vaisseaux spiralés issus des folioles [G] ; des fragments de larges vaisseaux spiralés ou à ponctuation aréolée, issus de la tige [E].

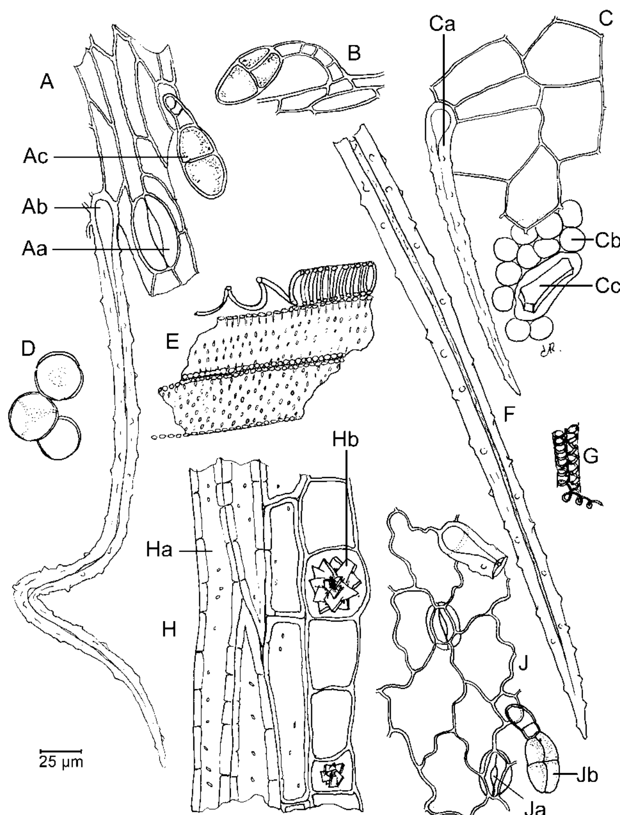



Figure 1587.-1.– *Dessin pour l'identification B de l'aigremoine pulvérisée*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 2,0 g d'aigremoine pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 20 mL de *méthanol R*. Chauffez en agitant à 40 °C pendant 10 min. Filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 1,0 mg d'*isoquercitroside R* et 1,0 mg de *rutine R* dans 2 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, acétate d'éthyle R* (10:10:80 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 12 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez la plaque encore chaude avec une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R*, puis avec une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R*. Laissez sécher à l'air pendant 30 min. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence orange peut être présente (quercitroside) |
| Isoquercitroside : une bande de fluorescence orange | Une bande de fluorescence orange (isoquercitroside) |
| | Une bande de fluorescence orange (hypéroside) |
| Rutine : une bande de fluorescence orange | Une bande de fluorescence orange (rutine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

## ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g d'aigremoine pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

## DOSAGE

Effectuez la détermination des tanins dans les drogues végétales (*2.8.14*). Utilisez 1,000 g d'aigremoine pulvérisée (180) (*2.9.12*).

**01/2008:1216**
**corrigé 6.0**

# AIL (POUDRE D')

## Allii sativi bulbi pulvis

## DÉFINITION

Bulbe d'*Allium sativum* L., divisé, cryodesséché ou séché à une température ne dépassant pas 65 °C, et réduit en poudre.

*Teneur* : au minimum 0,45 pour cent d'allicine ($C_6H_{10}OS_2$ ; $M_r$ 162,3) (drogue desséchée).

## CARACTÈRES

*Aspect* : poudre jaunâtre clair.

## IDENTIFICATION

A. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre d'ail présente les éléments suivants : de nombreux fragments de parenchyme et des groupes de vaisseaux spiralés ou annelés accompagnés de cellules parenchymateuses à paroi mince.

B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de poudre d'ail, ajoutez 5,0 mL de *méthanol R*. Agitez pendant 60 s, puis filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg d'*alanine R* dans 10 mL d'*eau R* et complétez à 20 mL avec du *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, propanol R, eau R, éthanol anhydre R* (20:20:20:40 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL de solution à examiner et 10 µL de solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution de *ninhydrine R* à 2 g/L dans un mélange de 5 volumes d'*acide acétique glacial R* et de 95 volumes de *butanol R* ; chauffez à 105-110 °C pendant 5-10 min et examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente dans son tiers médian une bande violette (alanine). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande violette ou rouge-brun semblable quant à sa position à celle du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, correspondant à l'alliine et, de part et d'autre de cette bande, d'autres bandes violettes généralement plus faibles.

ESSAI

**Amidon**. Examinez au microscope en utilisant de l'*eau R*. Ajoutez de la *solution d'iode R1*. Aucune coloration bleue ne se développe.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 7,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de poudre d'ail.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 5,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*). *Effectuez le dosage le plus rapidement possible.*

*Solution d'étalon interne*. Dissolvez 20,0 mg de *parahydroxybenzoate de butyle SCR* dans 100,0 mL d'un mélange à volumes égaux d'*eau R* et de *méthanol R*.

*Solution à examiner.* A 0,800 g de poudre d'ail, ajoutez 20,0 mL d'*eau R*. Homogénéisez le mélange par traitement aux ultrasons à 4 °C pendant 5 min. Laissez reposer à température ambiante pendant 30 min, puis centrifugez pendant 30 min. Prélevez 10,0 mL de surnageant et complétez à 25,0 mL avec un mélange de 40 volumes d'une solution d'*acide formique anhydre R* à 1 pour cent *V/V* et de 60 volumes de *méthanol R* (solution mère). Agitez, puis centrifugez pendant 5 min. Introduisez 0,50 mL de solution d'étalon interne dans une fiole jaugée et complétez à 10,0 mL avec la solution mère.

*Précolonne* :

– *dimensions* : *l* = 20 mm, Ø = 4 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* silanisé (5 µm).

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* silanisé (5 µm).

*Phase mobile* : mélangez 40 volumes d'une solution d'*acide formique anhydre R* à 1 pour cent *V/V* et 60 volumes de *méthanol R.*

*Débit* : 0,8 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 254 nm.

*Injection* : injecteur à boucle, 1 µL de solution d'étalon interne et 10 µL de solution à examiner.

Calculez la teneur pour cent en allicine à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{F_1 \times m_2 \times 22,75}{F_2 \times m_1}$$

$F_1$ = surface du pic dû à l'allicine (pic principal) dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_2$ = surface du pic dû au parahydroxybenzoate de butyle dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$m_1$ = masse de la prise d'essai, en grammes,

$m_2$ = masse de parahydroxybenzoate de butyle dans 100,0 mL de solution d'étalon interne, en grammes ; 1 mg de parahydroxybenzoate de butyle correspond à 8,65 mg d'allicine.

Drogues végétales

**01/2008:1387**
**corrigé 6.0**

# ALCHÉMILLE

## Alchemillae herba

DÉFINITION

Parties aériennes fleuries séchées, entières ou fragmentées, d'*Alchemilla vulgaris* L. *sensu latiore.*

*Teneur* : au minimum 6,0 pour cent de tanins, exprimés en pyrogallol ($C_6H_6O_3$ ; $M_r$ 126,1) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Les feuilles basales, qui constituent la majeure partie de la drogue, sont vert-gris, par endroits vert-brun, réniformes ou presque semi-circulaires, d'un diamètre allant généralement jusqu'à 8 cm ou parfois jusqu'à 11 cm ; elles comportent 7 à 9 ou 11 lobes et possèdent un long pétiole. Les feuilles caulinaires, de plus petite taille, portent à la base une paire de grandes stipules ; elles comportent 5-9 lobes et possèdent un pétiole plus court ou sont sessiles. Les feuilles sont fortement pubescentes, notamment sur la face inférieure, et leur bord est grossièrement denté. Les jeunes feuilles sont repliées et présentent une pubescence blanc argenté, les feuilles plus âgées sont légèrement pubescentes et leur face inférieure présente un fin réseau de nervures proéminentes. Le pétiole, vert-gris ou vert-jaune, est pubescent, d'un diamètre d'environ 1 mm, avec un sillon adaxial. Les fleurs apétales, vert-jaune ou vert clair, ont un diamètre d'environ 3 mm. Le calice, double, est surmonté d'un calicule à 4 pièces alternant avec 4 sépales de plus grande taille, subaigus ou triangulaires. La fleur comporte 4 courtes étamines et un carpelle unique à stigmate capité. La tige creuse, de couleur vert-gris ou vert-jaune, est pubescente et présente des sillons plus ou moins longitudinaux.

B. Réduisez l'alchémille en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-gris. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des poils unicellulaires étroits, de longueur allant jusqu'à 1 mm, sinueux par endroits, à épaisse paroi lignifiée, acuminés et en pointe émoussée à l'extrémité, plus ou moins élargis et ponctués à la base ; des fragments de feuilles comportant 2 assises de parenchyme palissadique, avec des cellules 2-3 fois plus longues dans l'assise supérieure que dans l'assise inférieure, et un parenchyme lacuneux contenant des macles d'oxalate de calcium dispersées, de diamètre pouvant atteindre 25 µm ; des fragments de feuilles qui, vus de face, présentent des cellules épidermiques plus ou moins sinueuses, à parois anticlinales irrégulièrement épaissies en chapelet, et des stomates de type anomocyte (*2.8.3*) ; des formations composées de tissu vasculaire et de fibres lignifiées, provenant des tiges et des pétioles, avec des vaisseaux spiralés ou à ponctuations aréolées ; quelques poils coniques à paroi mince, d'une longueur d'environ 300 µm ; des cellules parenchymateuses à paroi mince contenant des macles d'oxalate de calcium ; des grains de pollen sphériques, d'un diamètre d'environ 15 µm, à 3 pores distincts et exine granuleuse ; quelques fragments de la paroi de l'ovaire, à cellules contenant un cristal unique d'oxalate de calcium.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 0,5 g d'alchémille pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 5 mL de *méthanol R* et chauffez à reflux dans un bain-marie à 70 °C pendant 5 min, puis refroidissez et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 1,0 mg d'*acide caféique R* et 1,0 mg d'*acide chlorogénique R* dans 10 mL de *méthanol R.*

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, acétate d'éthyle R* (8:8:84 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL de solution à examiner et 10 µL de solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C pendant 5 min.

*Détection* : pulvérisez une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R*, puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R*. Laissez sécher à l'air pendant 30 min. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | 2 bandes de fluorescence rouge (chlorophylle) |
| Acide caféique : une bande de fluorescence bleu clair | 1 ou 2 bandes d'intense fluorescence bleu clair |
| | Une ou plusieurs bandes d'intense fluorescence vert ou jaune-vert |
| _______ | _______ |
| Acide chlorogénique : une bande de fluorescence bleu clair | Une bande d'intense fluorescence jaune ou orange |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum à 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g d'alchémille pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 12,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des tanins dans les drogues végétales (*2.8.14*). Utilisez 0,50 g d'alchémille pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**01/2008:0257**
**corrigé 6.0**

# ALOÈS DES BARBADES

## Aloe barbadensis

DÉFINITION

Suc concentré et séché provenant des feuilles d'*Aloe barbadensis* Miller.

*Teneur* : au minimum 28,0 pour cent de dérivés hydroxyanthracéniques, exprimés en barbaloïne ($C_{21}H_{22}O_9$ ; $M_r$ 418,4) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

*Aspect* : masses brun foncé, légèrement brillantes ou opaques, à cassure conchoïdale, ou poudre brune.

*Solubilité* : partiellement soluble dans l'eau bouillante et soluble à chaud dans l'éthanol à 96 pour cent.

IDENTIFICATION

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Chauffez dans un bain-marie jusqu'à ébullition 0,25 g de drogue pulvérisée avec 20 mL de *méthanol R*. Agitez pendant quelques minutes, décantez la solution et maintenez-la à environ 4 °C ; cette solution doit être utilisée dans les 24 h.

*Solution témoin*. Dissolvez 25 mg de *barbaloïne R* dans du *méthanol R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R.*

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R, acétate d'éthyle R* (13:17:100 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes de 20 mm sur au maximum 3 mm.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : pulvérisez une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 100 g/L dans du *méthanol R*. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats A* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente en son milieu une bande de fluorescence jaune (barbaloïne) semblable quant à sa position à celle de la bande due à la barbaloïne dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente dans sa partie inférieure une bande de fluorescence bleu clair (aloésine).

*Détection B* : chauffez à 110 °C pendant 5 min.

*Résultats B* : dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner il apparaît une bande de fluorescence violette située immédiatement au-dessous de la bande due à la barbaloïne.

B. Agitez 1 g de drogue pulvérisée avec 100 mL d'*eau R* bouillante et refroidissez. Ajoutez 1 g de *talc R* et filtrez. Dissolvez à chaud 0,25 g de *tétraborate de disodium R* dans 10 mL du filtrat. Versez 2 mL de cette solution dans 20 mL d'*eau R*. Il apparaît une fluorescence vert-jaune, plus distincte en lumière ultraviolette à 365 nm.

C. A 5 mL du filtrat obtenu au cours de l'identification B, ajoutez 1 mL d'*eau de brome R* récemment préparée. Il se forme un précipité jaune-brun. Le surnageant est violet.

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de drogue pulvérisée.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 2,0 pour cent.

DOSAGE

*Effectuez le dosage à l'abri d'une lumière vive.*

Dans une fiole conique de 250 mL, introduisez 0,300 g de drogue pulvérisée (180) (*2.9.12*). Humectez avec 2 mL de *méthanol R*, ajoutez 5 mL d'*eau R* chauffée au préalable à environ 60 °C et mélangez. Ajoutez encore 75 mL d'*eau R* chauffée à la même température et agitez le mélange pendant 30 min. Refroidissez et filtrez dans une fiole jaugée. Rincez la fiole conique et le filtre avec 20 mL d'*eau R*. Ajoutez l'eau de lavage dans la fiole jaugée et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*. Introduisez 10,0 mL de cette solution dans un ballon à fond rond de 100 mL contenant 1 mL d'une solution de *chlorure ferrique R* à 600 g/L et 6 mL d'*acide chlorhydrique R*. Chauffez à reflux dans un bain-marie pendant 4 h en prenant soin que le niveau de l'eau soit toujours au-dessus de celui du liquide dans le ballon. Laissez refroidir. Introduisez la solution dans une ampoule à décantation. Lavez successivement le ballon avec 4 mL d'*eau R*, 4 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* et 4 mL d'*eau R* et ajoutez les solutions de lavage au contenu de l'ampoule. Agitez le contenu de l'ampoule à décantation avec 3 fois 20 mL d'*éther R*. Réunissez les phases éthérées, lavez-les avec 2 fois 10 mL d'*eau R* et rejetez les solutions de lavage. Complétez la phase organique à 100,0 mL avec de l'*éther R*. Prélevez-en 20,0 mL et évaporez-les avec précaution au bain-marie à siccité. Dissolvez le résidu dans 10,0 mL d'une solution d'*acétate de magnésium R* à 5 g/L dans du *méthanol R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 512 nm, en utilisant du *méthanol R* comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent de dérivés hydroxyanthracéniques exprimés en barbaloïne, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 19,6}{m}$$

en prenant 255 comme valeur de l'absorbance spécifique de la barbaloïne.

$A$ = absorbance à 512 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

CONSERVATION

En récipient étanche.

**01/2008:0258**
**corrigé 6.0**

# ALOÈS DU CAP

## Aloe capensis

DÉFINITION

Suc concentré et séché provenant des feuilles de diverses espèces d'*Aloe*, principalement d'*Aloe ferox* Miller et de ses hybrides.

*Teneur* : au minimum 18,0 pour cent de dérivés hydroxyanthracéniques, exprimés en barbaloïne ($C_{21}H_{22}O_9$ ; $M_r$ 418,4) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

*Aspect* : masses brun foncé à reflets verdâtres, à cassure conchoïdale brillante, ou poudre brun-vert.

*Solubilité* : partiellement soluble dans l'eau bouillante et soluble à chaud dans l'éthanol à 96 pour cent.

IDENTIFICATION

A. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai Aloes des Barbades.

   *Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente en son milieu une bande de fluorescence jaune (barbaloïne) semblable quant à sa position à celle de la bande due à la barbaloïne dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente dans sa partie inférieure 2 bandes de fluorescence jaune (aloénosides A et B) ainsi qu'une bande de fluorescence bleue (aloésine).

B. Agitez 1 g de drogue pulvérisée avec 100 mL d'*eau R* bouillante et refroidissez. Ajoutez 1 g de *talc R* et filtrez. Dissolvez à chaud 0,25 g de *tétraborate de disodium R* dans 10 mL du filtrat. Versez 2 mL de cette solution dans 20 mL d'*eau R*. Il apparaît une fluorescence vert-jaune, plus distincte en lumière ultraviolette à 365 nm.

C. A 5 mL du filtrat obtenu au cours de l'identification B, ajoutez 1 mL d'*eau de brome R* récemment préparée. Il se forme un précipité jaune. Le surnageant ne présente aucune coloration violette.

ESSAI

**Aloes des Barbades**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Chauffez au bain-marie jusqu'à ébullition 0,25 g de drogue pulvérisée avec 20 mL de *méthanol R*. Agitez pendant quelques minutes, décantez la solution et maintenez-la à environ 4 °C ; cette solution doit être utilisée dans les 24 h.

*Solution témoin*. Dissolvez 25 mg de *barbaloïne R* dans du *méthanol R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R*.

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R, acétate d'éthyle R* (13:17:100 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes de 20 mm sur au maximum 3 mm.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 100 g/L dans du *méthanol R* et chauffez à 110 °C pendant 5 min. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande de fluorescence violette située immédiatement au-dessous de la bande due à la barbaloïne.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de drogue pulvérisée.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 2,0 pour cent.

DOSAGE

*Effectuez le dosage à l'abri d'une lumière vive.*

Dans une fiole conique de 250 mL, introduisez 0,400 g de drogue pulvérisée (180) (*2.9.12*). Humectez avec 2 mL de *méthanol R*, ajoutez 5 mL d'*eau R* chauffée au préalable à environ 60 °C et mélangez. Ajoutez encore 75 mL d'*eau R* chauffée à la même température et agitez le mélange pendant 30 min. Refroidissez et filtrez dans une fiole jaugée. Rincez la fiole conique et le filtre avec 20 mL d'*eau R*. Ajoutez l'eau de lavage dans la fiole jaugée et complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*. Introduisez 10,0 mL de cette solution dans un ballon à fond rond de 100 mL contenant 1 mL d'une solution de *chlorure ferrique R* à 600 g/L et 6 mL d'*acide chlorhydrique R*. Chauffez à reflux dans un bain-marie pendant 4 h en prenant soin que le niveau de l'eau soit toujours au-dessus de celui du liquide dans le ballon. Laissez refroidir. Introduisez la solution dans une ampoule à décantation. Lavez successivement le ballon avec 4 mL d'*eau R*, 4 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* et 4 mL d'*eau R* et ajoutez les solutions de lavage au contenu de l'ampoule. Agitez le contenu de l'ampoule à décantation avec 3 fois 20 mL d'*éther R*. Réunissez les phases éthérées, lavez-les avec 2 fois 10 mL d'*eau R* et rejetez les eaux de lavage. Complétez la phase organique à 100,0 mL avec de l'*éther R*. Prélevez-en 20,0 mL et évaporez-les avec précaution au bain-marie à siccité. Dissolvez le résidu dans 10,0 mL d'une solution d'*acétate de magnésium R* à 5 g/L dans le *méthanol R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 512 nm, en utilisant du *méthanol R* comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent de dérivés hydroxyanthracéniques en barbaloïne, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 19,6}{m}$$

en prenant 255 comme valeur de l'absorbance spécifique de la barbaloïne.

$A$ = absorbance à 512 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

CONSERVATION

En récipient étanche.

**01/2008:0259**

# ALOÈS (EXTRAIT SEC TITRÉ D')

## Aloes extractum siccum normatum

DÉFINITION

Extrait sec titré préparé à partir d'Aloès des Barbades ou d'Aloès du Cap ou d'un mélange des 2.

*Teneur* : 19,0 pour cent à 21,0 pour cent de dérivés hydroxyanthracéniques, exprimés en barbaloïne ($C_{21}H_{22}O_9$ ; $M_r$ 418,4) ajustée si nécessaire (extrait desséché).

Drogues végétales

PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec de l'eau bouillante.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre brune ou brun-jaune.

*Solubilité* : assez soluble dans l'eau bouillante.

IDENTIFICATION

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Chauffez dans un bain-marie jusqu'à ébullition 0,25 g d'extrait à examiner avec 20 mL de *méthanol R*. Agitez pendant quelques minutes, décantez la solution et maintenez-la à environ 4 °C ; cette solution doit être utilisée dans les 24 h.

*Solution témoin*. Dissolvez 25 mg de *barbaloïne R* dans du *méthanol R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R*.

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R, acétate d'éthyle R* (13:17:100 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes de 20 mm sur au maximum 3 mm.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 100 g/L dans le *méthanol R* et examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente, en son milieu, une bande de fluorescence jaune (barbaloïne) semblable quant à sa position à la bande due à la barbaloïne dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin et, dans sa partie inférieure, une bande de fluorescence bleu clair (aloésine) ; dans la partie inférieure du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, 2 bandes de fluorescence jaune (aloénosides A et B) (Aloès du Cap) et une bande de fluorescence violette située immédiatement au-dessous de la bande due à la barbaloine (Aloès des Barbades) peuvent être présentes.

B. Agitez 1 g d'extrait à examiner avec 100 mL d'*eau R* bouillante et refroidissez. Ajoutez 1 g de *talc R* et filtrez. Dissolvez à chaud 0,25 g de *tétraborate de disodium R* dans 10 mL du filtrat. Versez 2 mL de cette solution dans 20 mL d'*eau R*. Il apparaît une fluorescence vert-jaune, plus distincte en lumière ultraviolette à 365 nm.

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.8.17*) : au maximum 4,0 pour cent *m/m*.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 2,0 pour cent.

DOSAGE

*Effectuez le dosage à l'abri d'une lumière vive.*

Dans une fiole conique de 250 mL, introduisez 0,400 g d'extrait à examiner. Humectez avec 2 mL de *méthanol R*, ajoutez 5 mL d'*eau R* chauffée au préalable à environ 60 °C et mélangez. Ajoutez encore 75 mL d'*eau R* à 60 °C et agitez le mélange pendant 30 min. Refroidissez et filtrez dans une fiole jaugée. Rincez la fiole conique et le filtre avec 20 mL d'*eau R*. Ajoutez l'eau de lavage dans la fiole jaugée, puis complétez à 1000,0 mL avec de l'*eau R*. Introduisez 10,0 mL de cette solution dans un ballon à fond rond de 100 mL contenant 1 mL d'une solution de *chlorure ferrique R* à 600 g/L et 6 mL d'*acide chlorhydrique R*. Chauffez à reflux dans un bain-marie pendant 4 h en veillant à ce que le niveau de l'eau soit toujours au-dessus de celui du liquide dans le ballon. Laissez refroidir. Introduisez la solution dans une ampoule à décantation. Lavez successivement le ballon avec 4 mL d'*eau R*, 4 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* et 4 mL d'*eau R*, puis ajoutez les solutions de lavage au contenu de l'ampoule. Agitez le contenu de l'ampoule à décantation avec 3 fois 20 mL d'*éther R*. Réunissez les phases éthérées, lavez avec 2 fois 10 mL d'*eau R* et rejetez les solutions de lavage. Complétez la phase organique à 100,0 mL avec de l'*éther R*. Prélevez 20,0 mL et évaporez-les avec précaution à siccité au bain-marie. Dissolvez le résidu dans 10,0 mL d'une solution d'*acétate de magnésium R* à 5 g/L dans le *méthanol R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 512 nm, en utilisant du *méthanol R* comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en dérivés hydroxyanthracéniques exprimés en barbaloïne, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 19,6}{m}$$

en prenant 255 comme valeur de l'absorbance spécifique de la barbaloïne.

$A$ = absorbance à 512 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2011:1857**

# ANGÉLIQUE (RACINE D')

## Angelicae radix

DÉFINITION

Rhizome et racine, entiers ou fragmentés, soigneusement séchés, d'*Angelica archangelica* L. (*Archangelica officinalis* Hoffm.).

*Teneur* : au minimum 2,0 mL/kg d'huile essentielle (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Saveur amère.

IDENTIFICATION

A. Le rhizome est brun-gris ou brun-rouge, avec des épaississements annulaires transversaux. La base porte des racines brun-gris ou brun-rouge, cylindriques, creusées de sillons longitudinaux, parfois ramifiées, souvent avec des arêtes circulaires transversales incomplètes. L'apex porte parfois des restes de bases de tiges et de feuilles. La cassure est irrégulière. En section transversale, la surface présente une écorce blanc-gris lacuneuse, à structure distinctement radiée, où les canaux sécréteurs apparaissent sous l'aspect de taches brunes, et du bois jaune vif ou jaune-gris qui, dans le rhizome, entoure la moelle grisâtre ou blanc-brun.

B. Réduisez la racine d'angélique en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est blanc-brun. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants (figure 1857.-1) : des fragments de suber constitués de plusieurs assises de cellules brun-gris ou brun-rouge à paroi mince, vus de face [C] ou en section transversale [E] ; de grands canaux sécréteurs brun-jaune, entiers ou fragmentés, vus en section transversale [A] ou longitudinale [F] ; des fragments de rayons médullaires, larges de 2 ou 4 cellules [G] ; des fragments de xylème [B] constitué de vaisseaux lignifiés à épaississements réticulés [Ba], seuls ou en petits groupes, et de parenchyme non lignifié dont certaines cellules associées aux vaisseaux présentent des épaississements collenchymateux. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente de nombreux grains d'amidon simples, de 2-4 µm de diamètre, libres ou inclus dans des cellules de parenchyme [D].

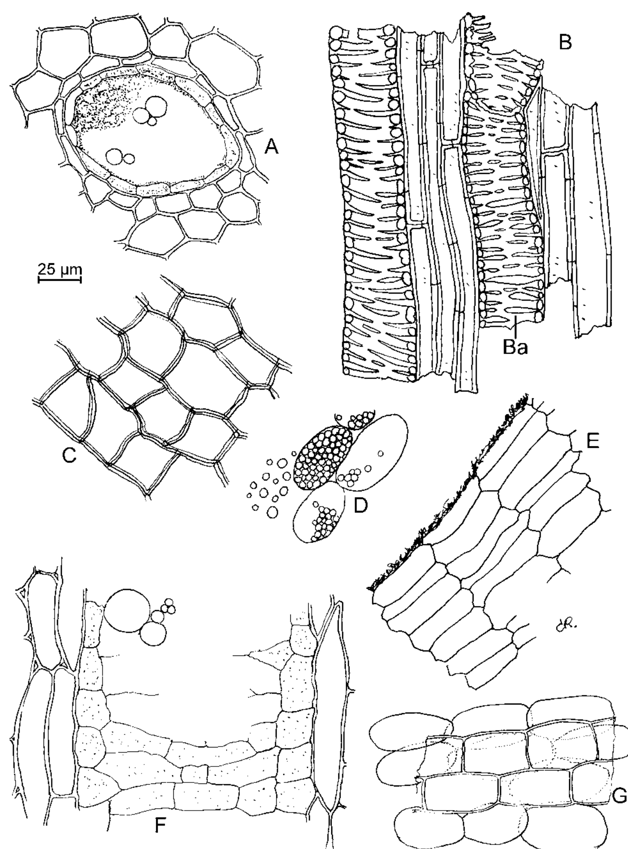



Figure 1857.-1. – *Dessin pour l'identification B de la racine d'angélique pulvérisée*

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de la racine de livèche.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Eugénol : (marqué à 254 nm) | |
| Coumarine : (marquée à 254 nm) | |
| _______ | _______ |
| | Une bande de fluorescence bleu intense |
| | Des bandes de fluorescence jaune |
| | Une bande de fluorescence bleue |
| | Une bande de fluorescence jaune |
| | Une bande de fluorescence bleu intense |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Racine de livèche**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de racine d'angélique fraîchement pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 5 mL de *méthanol R* et chauffez à ébullition pendant 30 s. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *coumarine R* et 25 µL d'*eugénol R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R*.

*Phase mobile* : *chlorure de méthylène R, toluène R* (50:50 *V/V*).

*Dépôt* : 20 µL en bandes.

*Développement* : 2 fois sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm et marquez les bandes d'atténuation de fluorescence dues à la coumarine et à l'eugénol sur le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande de fluorescence bleu pâle ou blanche entre les bandes de la coumarine et de l'eugénol dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent de bases de feuilles et de tiges, au maximum 5 pour cent de fragments décolorés et au maximum 1 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de racine d'angélique pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 2,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez 40,0 g de racine d'angélique pulvérisée (500) (*2.9.12*) immédiatement avant la détermination, un ballon à fond rond de 2 L, 10 gouttes de *paraffine liquide R* et 500 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Introduisez 0,50 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 4 h.

**07/2010:0262**

# ANIS (FRUIT D')

## Anisi fructus

DÉFINITION

Diakène entier, sec, de *Pimpinella anisum* L.

*Teneur* : au minimum 20 mL/kg d'huile essentielle (drogue anhydre).

CARACTÈRES

Odeur rappelant celle de l'anéthole.

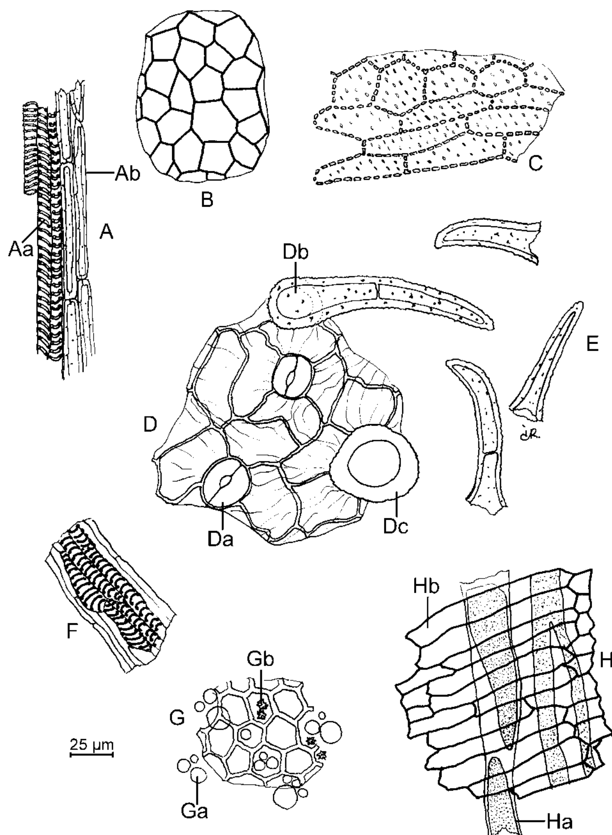
Le fruit est un diakène, généralement entier, souvent encore muni d'un petit fragment de pédoncule mince, rigide et légèrement arqué.

IDENTIFICATION

A. Le diakène, ovoïde ou piriforme, un peu comprimé sur les côtés, est vert-jaune ou gris-vert ; il mesure 3-5 mm de longueur et au maximum 3 mm de largeur, et surmonté d'un stylopode à 2 styles courts et réfléchis. Les méricarpes, attachés par le sommet à l'extrémité du carpophore, présentent une face commissurale plane et une face dorsale convexe ; cette dernière est recouverte de poils courts, verruqueux, visibles à la loupe ; chaque méricarpe est parcouru longitudinalement par 5 côtes primaires, 3 dorsales et 2 commissurales, peu proéminentes, de couleur plus claire.

B. Réduisez le fruit d'anis en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune-vert ou vert-brun. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des poils tecteurs entiers ou fragmentés, la plupart unicellulaires, parfois recourbés, à pointe émoussée, à cuticule verruqueuse ; des fragments d'épicarpe à cuticule striée, de rares stomates anomocytiques (*2.8.3*) ; des fragments de nombreux canaux sécréteurs à ramifications étroites, souvent accompagnés par des fragments d'endocarpe à cellules allongées à parois fines ; des fragments du tégument de la graine composé d'une assise de cellules brunes, polyédriques, à parois fines ; des fragments d'albumen avec des grains d'aleurone et de petites macles d'oxalate de calcium ; des cellules sclérifiées, carrées ou allongées, du mésocarpe ou de la

face commissurale du fruit ; des paquets de courtes fibres sclérifiées du carpophore et du pédoncule, accompagnés de vaisseaux de bois à épaississements spiralés ou annelés.




A. Vaisseaux de bois (Aa) et fibres (Ab) du pédoncule
B. Tégument de la graine
C. Cellules sclérifiées du mésocarpe
D. Epicarpe à cuticule striée avec stomate anomocytique (Da), poil tecteur entier (Db) et base de poil tecteur (Dc)
E. Poils tecteurs fragmentés
F. Vaisseaux de bois
G. Fragment de l'albumen avec gouttelettes d'huile (Ga) et petites macles d'oxalate de calcium (Gb)
H. Fragment de canal sécréteur (Ha) accompagné de cellules allongées à parois fines de l'endocarpe (Hb)

Figure 0262.-1. – *Dessin pour l'identification du fruit d'anis (voir Identification B)*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Agitez 0,10 g de fruit d'anis pulvérisé (1400) (*2.9.12*) avec 2 mL de *chlorure de méthylène R* pendant 15 min. Filtrez et évaporez avec précaution le filtrat à siccité au bain-marie à 60 °C. Reprenez le résidu par 0,5 mL de *toluène R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 3 µL d'*anéthole R* et 40 µL d'*huile d'olive R* dans 1 mL de *toluène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $GF_{254}$ pour CCM R*.

*Phase mobile* : *toluène R*.

*Dépôt* : 2 µL et 3 µL de solution à examiner, puis 1 µL, 2 µL et 3 µL de solution témoin, à 2 cm de distance.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : les chromatogrammes présentent, sur un fond clair, au milieu de la plaque, une tache d'atténuation de fluorescence (anéthole).

*Détection B* : pulvérisez, pour une plaque de 200 mm de côté, 10 mL d'une solution récemment préparée d'*acide phosphomolybdique R* à 200 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*, puis chauffez à 120 °C pendant 5 min.

*Résultats B* : les taches dues à l'anéthole apparaissent en bleu sur fond jaune. La dimension de la tache due à l'anéthole dans le chromatogramme obtenu avec 2 µL de solution à examiner est comprise entre les dimensions des taches correspondantes dans les chromatogrammes obtenus avec 1 µL et 3 µL de solution témoin. Les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner présentent, dans leur tiers inférieur, une tache bleue (triglycérides) semblable quant à sa position à celle de la tache dans le tiers inférieur des chromatogrammes obtenus avec la solution témoin (triglycérides de l'huile d'olive).

## ESSAI

**Eau** (*2.2.13*) : au maximum 70 mL/kg, déterminé sur 20,0 g de fruit d'anis pulvérisé.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 12,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 2,5 pour cent.

## DOSAGE

Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez 10,0 g de fruit d'anis réduit en poudre grossière immédiatement avant la détermination, un ballon à fond rond de 250 mL et 100 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Introduisez 0,50 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 2,5-3,5 mL/min pendant 2 h.

**01/2008:0804**
**corrigé 7.0**

# ANIS (HUILE ESSENTIELLE D')

## Anisi aetheroleum

## DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau à partir des fruits mûrs et secs de *Pimpinella anisum* L.

## CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, incolore ou jaune clair.

## IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Dissolvez 1 g d'huile essentielle d'anis dans du *toluène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin.* Dissolvez 10 µL de *linalol R*, 30 µL d'*aldéhyde anisique R* et 200 µL d'*anéthole R* dans du *toluène R* et complétez à 15 mL avec le même solvant. Prélevez 1 mL de cette solution et complétez à 5 mL avec du *toluène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (7 :93 *V/V*).

*Dépôt* : 5 µL en bandes de 10 mm (pour les plaques CCM ordinaires) ou 2 µL en bandes de 10 mm (pour les plaques de fine granulométrie).

*Développement* : sur un parcours de 15 cm (pour les plaques CCM ordinaires ou sur un parcours de 6 cm (pour les plaques de fine granulométrie).

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Drogues végétales

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| Anéthole : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande très intense d'atténuation de fluorescence (anéthole) |
| _______ | _______ |
| | Une bande d'atténuation de fluorescence |
| Aldéhyde anisique : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence (aldéhyde anisique) |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez du *réactif au 4-acétylbenzoate de méthyle R* et chauffez à 100-105 °C pendant 10 min ; examinez la plaque encore chaude à la lumière du jour dans les 5 min qui suivent.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| | Une bande brun-violet (hydrocarbures monoterpéniques) (front du solvant) |
| Anéthole : une bande brune | Une bande brune très intense (anéthole), nettement séparée |
| _______ | _______ |
| | Une bande grise |
| Aldéhyde anisique : une bande jaune | Une bande jaune (aldéhyde anisique) |
| _______ | _______ |
| Linalol : une bande grise | Une bande grise (linalol) |
| | Une bande grise |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,980 à 0,990.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,552 à 1,561.

**Point de solidification** (*2.2.18*) : 15 °C à 19 °C.

**Fenchone**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications de l'essai du profil chromatographique avec les modifications suivantes.

*Solution à examiner.* Dissolvez 400 µL d'huile essentielle d'anis dans 2,0 mL d'*hexane R*.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 10 µL de *fenchone R* dans de l'*hexane R* et complétez à 1,2 g avec le même solvant.

*Solution témoin (b).* Prélevez 100 µL de solution témoin (a) et complétez à 100 mL avec de l'*hexane R*.

*Conformité du système* : solution témoin (b) :

– *rapport signal/bruit* : au minimum 10 pour le pic principal.

*Limite* :

– *fenchone* : au maximum 0,01 pour cent.

**Foeniculine**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications de l'essai du profil chromatographique avec les modifications suivantes.

*Solution à examiner.* L'huile essentielle d'anis.

*Solution témoin (a).* Prélevez 10 mg de solution à examiner et complétez à 1,000 g avec de l'*hexane R*. Prélevez 0,5 mL de cette solution et complétez à 100 mL avec de l'*hexane R*.

*Solution témoin (b). Foeniculine pour identification des pics SCR.*

*Conformité du système* :

– le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) est semblable au chromatogramme fourni avec la *foeniculine pour identification des pics SCR,*
– *rapport signal/bruit* : au minimum 10 pour le pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

*Limite* : localisez le pic dû à la foeniculine en comparant avec le chromatogramme fourni avec la *foeniculine pour identification des pics SCR*.

– *foeniculine* : au maximum 0,01 pour cent.

**Huiles grasses et huiles essentielles résinifiées** (*2.8.7*). L'huile essentielle d'anis satisfait à l'essai des huiles grasses et huiles essentielles résinifiées.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner.* Dissolvez 200 µL d'huile essentielle d'anis dans 1,0 mL d'*hexane R*.

*Solution témoin.* A 1,0 mL d'*hexane R,* ajoutez 20 µL de *linalol R,* 20 µL d'*estragole R,* 20 µL d'*α-terpinéol R,* 60 µL d'*anéthole R* et 30 µL d'*aldéhyde anisique R*.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 30 m, Ø = 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur du film 0,25 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R.*

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Rapport de division* : 1 :100.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 – 5 | 60 |
| | 5 – 80 | 60 → 210 |
| | 80 – 95 | 210 |
| Chambre à injection | | 200 |
| Détecteur | | 220 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 0,2 µL.

*Ordre d'élution* : ordre donné pour la préparation de la solution témoin ; notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus à l'estragole et à l'α-terpinéol.

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez les composants de la solution témoin sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner et localisez le *cis*-anéthole et le 2-méthylbutyrate de pseudoisoeugényle à l'aide du chromatogramme de la figure 0804.-1 (ne tenez pas compte du pic dû à l'hexane).

Déterminez la teneur pour cent de ces composants. Ces teneurs sont comprises entre les valeurs suivantes :

– *linalol* : au maximum 1,5 pour cent,
– *estragole* : 0,5 pour cent à 5,0 pour cent,
– *α-terpinéol* : au maximum 1,2 pour cent,
– *cis-anéthole* : 0,1 pour cent à 0,4 pour cent,
– *trans-anéthole* : 87 pour cent à 94 pour cent,

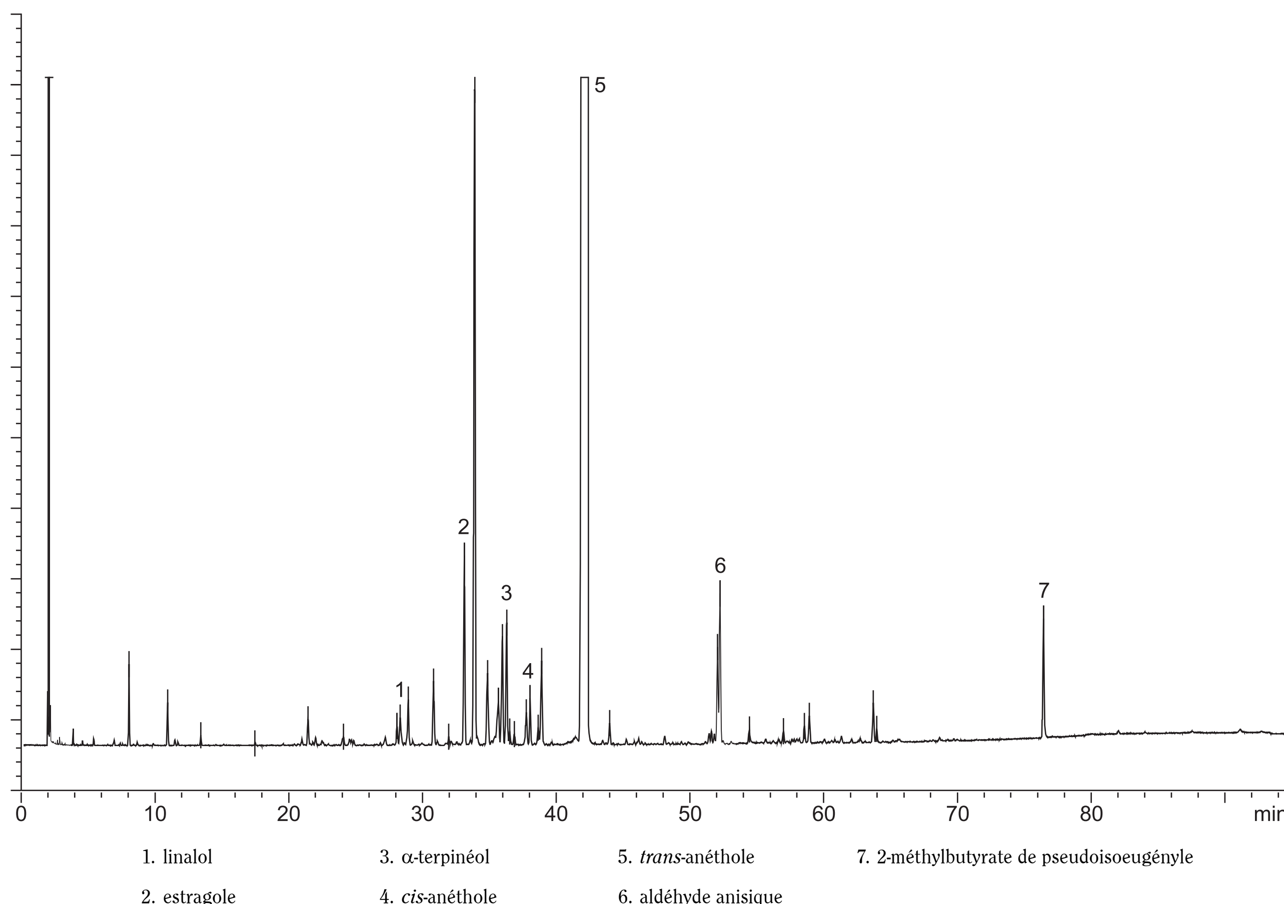



Figure 0804.-1. – *Chromatogramme pour l'essai du profil chromatographique de l'huile essentielle d'anis*

– *aldéhyde anisique* : 0,1 pour cent à 1,4 pour cent,
– *2-méthylbutyrate de pseudoisoeugényle* : 0,3 pour cent à 2,0 pour cent.

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

**04/2008:1391**
**corrigé 6.3**

# ARNICA (FLEUR D')

## Arnicae flos

DÉFINITION

Capitule, entier ou brisé, séché, d'*Arnica montana* L.

*Teneur* : au minimum 0,40 pour cent *m/m* de sesquiterpènes lactoniques totaux, exprimés en tiglate de dihydrohélénaline (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Odeur aromatique.

Le capitule, étalé, a un diamètre d'environ 20 mm et une profondeur d'environ 15 mm et possède un pédoncule de 2-3 cm de longueur. L'involucre est constitué de 18-24 bractées lancéolées, allongées, aiguës à leur sommet, disposées sur 1-2 rangées ; les bractées sont longues d'environ 8-10 mm, vertes et possèdent des poils externes vert-jaune, visibles à la loupe. Le réceptacle convexe, d'un diamètre d'environ 6 mm, possède des alvéoles et est garni de poils. Il porte sur son pourtour une vingtaine de fleurons ligulés mesurant 20-30 mm de long et, sur son disque, un nombre plus considérable de fleurons tubulés mesurant environ 15 mm de long. L'ovaire mesure 4-8 mm de long ; il est surmonté d'un pappus de soies blanchâtres mesurant 4-8 mm de long. Quelques akènes, bruns, surmontés ou non du pappus, peuvent être présents.

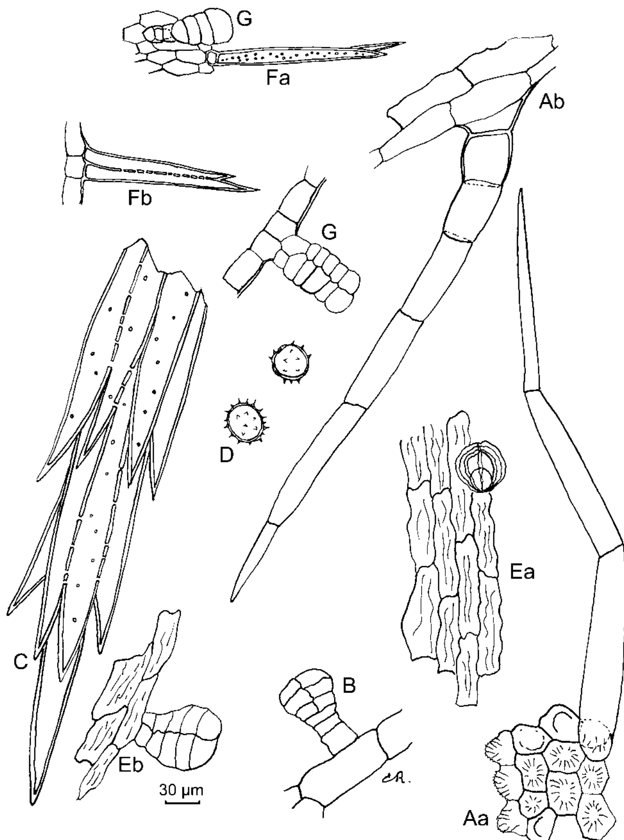
IDENTIFICATION

A. L'involucre est composé de bractées ovales-allongées et aiguës à leur sommet ; leur bord est cilié. Le fleuron ligulé a un calice réduit surmonté d'une couronne de soies blanchâtres, fines et brillantes, revêtues de petits poils rudes. La corolle jaune orangé porte 7-10 nervures parallèles et se termine par 3 petits lobes. Les étamines à anthères libres sont incomplètement développées. L'ovaire, étroit, brun, est surmonté du stigmate divisé en 2 branches incurvées vers l'extérieur. Le fleuron tubulé est actinomorphe. L'ovaire et le calice sont semblables à ceux de la fleur ligulée. La corolle, courte, possède 5 lobes triangulaires réfléchis ; les 5 étamines fertiles sont soudées par les anthères.

B. Séparez les différentes parties du capitule. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : les épidermes des bractées de l'involucre présentent des stomates et des poils, ceci avec une fréquence plus grande sur la face externe (abaxiale). Les poils sont de plusieurs types : poils tecteurs unisériés, pluricellulaires, de longueur variable de 50-500 µm, particulièrement abondants sur les bords de la bractée ; poils sécréteurs à pied pluricellulaire, uni ou bisérié, à tête globuleuse, pluricellulaire, mesurant environ 300 µm de long, abondants sur la face externe de la bractée ; poils sécréteurs, à pied pluricellulaire, unisérié, à tête globuleuse, pluricellulaire, mesurant environ 80 µm de long, fréquents sur la face interne de la bractée. L'épiderme de la corolle ligulée est constitué par des cellules lobées ou allongées, quelques stomates et des poils de différents types : poils tecteurs à extrémité très effilée, dont la longueur peut dépasser 500 µm, constitués par 1-3 cellules proximales à parois épaissies et 2-4 cellules distales, à parois fines ; poils sécréteurs à tête pluricellulaire bisériée ; poils sécréteurs à pied pluricellulaire et à tête globuleuse pluricellulaire. L'extrémité de la ligule porte des cellules en papilles arrondies. L'épiderme de l'ovaire est recouvert

Drogues végétales

de poils : poils sécréteurs à pied court et tête globuleuse pluricellulaire ; poils tecteurs géminés et constitués, le plus souvent, par 2 cellules accolées longitudinalement, la paroi commune étant ponctuée ; leur extrémité est effilée et parfois bifide. Les épidermes du calice sont constitués par des cellules allongées portant des poils tecteurs courts, unicellulaires, orientés vers l'extrémité supérieure de la soie. Les grains de pollen, d'un diamètre d'environ 30 µm, sont arrondis, à exine échinulée ; ils présentent 3 pores germinatifs.

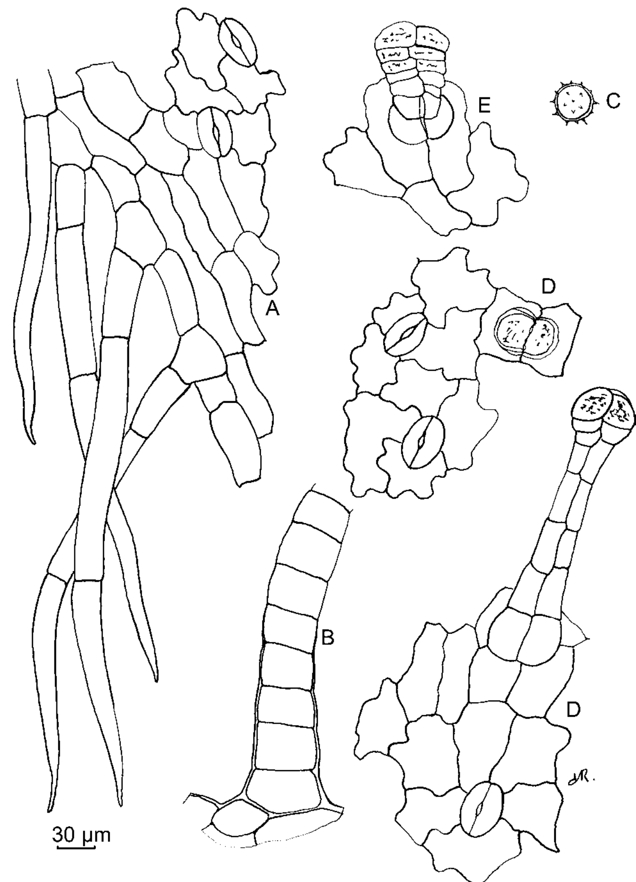



A. Epiderme de la corolle des fleurs ligulées avec poil tecteur vu de face (Aa) et vu de profil (Ab)
B. Poil sécréteur à tête pluricellulaire
C. Soies du calice
D. Grain de pollen
E. Epiderme de la corolle avec cuticule striée et poil sécréteur bisérié vu de face (Ea) et vu de profil (Eb)
F. Poil tecteur de l'ovaire vu de face (Fa) et vu de profil (Fb)
G. Poil sécréteur de l'ovaire

Figure 1391.-1. – *Dessin pour l'identification de la fleur d'arnica (voir Identification B)*

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai *Calendula officinalis* L. - *Heterotheca inuloides* Cass.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente, vers le milieu, une bande de fluorescence bleutée correspondant à celle due à l'acide chlorogénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin ; au-dessus de cette bande, il présente 3 bandes de fluorescence brun-jaune ou jaune orangé et, au-dessus, une bande de fluorescence jaune-vert (astragaline). La bande située en dessous de l'astragaline est due à l'isoquercitroside ; la bande située juste en dessous de cette dernière est due au lutéolol-7-glucoside. Il présente également une bande de fluorescence bleu-vert en dessous de la bande due à l'acide caféique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.




A. Epiderme des bractées de l'involucre avec poils tecteurs et stomates
B. Base pluricellulaire de poil tecteur
C. Grain de pollen
D. Epiderme des bractées de l'involucre avec stomate et poil sécréteur bisérié
E. Poil sécréteur

Figure 1391.-2. – *Dessin pour l'identification de la fleur d'arnica (voir Identification B)*

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5,0 pour cent.

***Calendula officinalis* L. - *Heterotheca inuloides* Cass**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 2,00 g de fleur d'arnica pulvérisée (710) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Chauffez, en agitant, dans un bain-marie à 60 °C pendant 5 min. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 2,0 mg d'*acide caféique R*, 2,0 mg d'*acide chlorogénique R* et 5,0 mg de *rutine R* dans du *méthanol R* et complétez à 30 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, méthyléthylcétone R, acétate d'éthyle R* (10:10:30:50 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 15 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air pendant quelques minutes.

*Détection* : pulvérisez une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R*, puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R*. Chauffez à 100-105 °C pendant 5 min. Laissez sécher à l'air et examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente dans sa partie inférieure une bande de fluorescence jaune orangé due à la rutine, dans sa partie médiane une bande de fluorescence due à l'acide chlorogénique et dans sa partie supérieure une bande de fluorescence bleu clair due à l'acide caféique. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente ni la bande de fluorescence jaune orangé

correspondant à celle due à la rutine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, ni celle en dessous de la bande due à la rutine.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de fleur d'arnica pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution d'étalon interne*. Préparez une solution extemporanée de 0,010 g exactement pesé de *santonine SCR* dans 10,0 mL de *méthanol R*.

*Solution à examiner*. Dans un ballon à fond rond de 250 mL, introduisez 1,00 g de fleur d'arnica pulvérisée (355) (*2.9.12*). Ajoutez 50 mL d'un mélange à volumes égaux de *méthanol R* et d'*eau R* et chauffez à reflux dans un bain-marie à 50-60 °C pendant 30 min, en agitant fréquemment. Laissez refroidir et filtrez à travers un filtre en papier. Transférez le filtre en papier découpé en morceaux et le résidu dans le ballon à fond rond, ajoutez 50 mL d'un mélange à volumes égaux de *méthanol R* et d'*eau R* et chauffez à reflux dans un bain-marie à 50-60 °C pendant 30 min, en agitant fréquemment. Répétez 2 fois l'opération. Réunissez les filtrats, puis ajoutez 3,00 mL de solution d'étalon interne et évaporez sous pression réduite jusqu'à obtention d'un volume de 18 mL. Rincez le ballon à fond rond avec de l'*eau R* et complétez à 20,0 mL avec les eaux de lavage. Transférez la solution dans une colonne chromatographique, d'une longueur d'environ 0,15 m et d'un diamètre intérieur d'environ 30 mm, contenant 15 g de *kieselguhr pour chromatographie R*. Laissez reposer pendant 20 min, puis éluez avec 200 mL d'un mélange à volumes égaux d'*acétate d'éthyle R* et de *chlorure de méthylène R*. Évaporez l'éluat à siccité dans un ballon à fond rond de 250 mL. Dissolvez le résidu dans 10,0 mL de *méthanol R* et ajoutez 10,0 mL d'*eau R*, puis 7,0 g d'*oxyde d'aluminium neutre R*. Agitez pendant 120 s, centrifugez à 5000 *g* pendant 10 min et filtrez sur un filtre en papier. Evaporez à siccité 10,0 mL du filtrat. Dissolvez le résidu dans 3,0 mL d'un mélange à volumes égaux de *méthanol R* et d'*eau R*, puis filtrez.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,12 m, Ø = 4 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (4 µm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *eau R,*
– *phase mobile B* : *méthanol R,*

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 3 | 62 | 38 |
| 3 - 20 | 62 → 55 | 38 → 45 |
| 20 - 30 | 55 | 45 |
| 30 - 55 | 55 → 45 | 45 → 55 |
| 55 - 57 | 45 → 0 | 55 → 100 |
| 57 - 70 | 0 | 100 |
| 70 - 90 | 62 | 38 |

*Débit* : 1,2 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 225 nm.

*Injection* : injecteur à boucle de 20 µL.

Calculez la teneur pour cent en sesquiterpènes lactoniques totaux, exprimés en tiglate de dihydrohélénaline, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{S_{\mathrm{LS}} \times C \times V \times 1,187 \times 100}{S_{\mathrm{S}} \times m \times 1000}$$

$S_{LS}$ = surface totale des pics dus aux sesquiterpènes lactoniques apparaissant après le pic de santonine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$S_S$ = surface du pic dû à la santonine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes,

$C$ = concentration de santonine dans la solution d'étalon interne utilisée pour la solution à examiner, en milligrammes par millilitre,

$V$ = volume de solution d'étalon interne utilisée pour la solution à examiner, en millilitres,

1,187 = facteur de corrélation entre le tiglate de dihydrohélénaline et la santonine.

**01/2008:1809**
**corrigé 6.3**

# ARNICA (TEINTURE D')

## Arnicae tinctura

DÉFINITION

Teinture produite à partir de *Fleur d'arnica (1391)*.

*Teneur* : au minimum 0,04 pour cent de sesquiterpènes lactoniques exprimés en tiglate de dihydrohélénaline ($C_{20}H_{26}O_5$ ; $M_r$ 346,42).

PRODUCTION

La teinture d'arnica est produite à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec 10 parties d'éthanol à 60-70 pour cent *V/V* pour 1 partie de drogue.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide brun-jaune.

IDENTIFICATION

Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de *Calendula officinalis - Heterotheca inuloïdes*.

*Chromatogramme obtenu avec la solution à examiner* :

– dans la partie médiane : une bande de fluorescence bleue correspondant à celle due à l'acide chlorogénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin ;
– au-dessus de cette bande : 3 bandes de fluorescence brun-jaune à jaune orangé et, au-dessus de ces 3 bandes, une bande de fluorescence jaune-vert correspondant à l'astragaline ; la bande située en dessous de cette dernière correspond à l'isoquercitrine ; la bande située juste en dessous de cette dernière correspond au lutéol-7-glucoside ;
– en dessous de la bande due à l'acide caféique du chromatogramme obtenu avec la solution témoin : une bande de fluorescence bleu-vert.

ESSAI

***Calendula officinalis - Heterotheca inuloïdes***. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. La teinture à examiner.

*Solution témoin*. Dissolvez 2,0 mg d'*acide caféique R*, 2,0 mg d'*acide chlorogénique R* et 5,0 mg de *rutine R* dans du *méthanol R* puis complétez à 30,0 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, méthyléthylcétone R, acétate d'éthyle R* (10:10:30:50 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 30 µL [ou 8 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 8 cm].

*Séchage* : à 80-105 °C.

Drogues végétales

*Détection* : pulvérisez sur la plaque encore chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R* puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R*. Chauffez pendant 5 min à 100-105 °C. Laissez sécher la plaque à l'air et examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente dans la partie inférieure une bande de fluorescence jaune-orange (rutine), dans la partie médiane une bande de fluorescence due à l'acide chlorogénique et dans la partie supérieure une faible bande de fluorescence bleuâtre (acide caféique). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente ni la bande de fluorescence jaune orangé correspondant à la rutine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin ni celle sous la bande correspondant à la rutine.

**Ethanol** (*2.9.10*) : la concentration finale en éthanol est au minimum de 90 pour cent de celle du solvant d'extraction initial.

**Méthanol et 2-propanol** (*2.9.11*) : au maximum 0,05 pour cent *V/V* de méthanol et au maximum 0,05 pour cent *V/V* de 2-propanol.

**Résidu sec** (*2.8.16*) : au minimum 1,7 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution d'étalon interne*. Dissolvez extemporanément 0,010 g de *santonine SCR*, exactement pesé, et 0,02 g de *4-hydroxybenzoate de butyle R* dans 10,0 mL de *méthanol R*.

*Solution à examiner*. Dans un ballon à fond rond, introduisez 5,00 g de teinture d'arnica, ajoutez 2,00 mL de solution d'étalon interne et 3 g d'*oxyde d'aluminium anhydre R*. Agitez pendant 120 s et filtrez sur un papier filtre. Rincez le ballon à fond rond avec 5 mL d'un mélange à volumes égaux de *méthanol R* et d'*eau R* puis filtrez. Evaporez le filtrat à siccité. Dissolvez le résidu dans 2,0 mL d'un mélange de 20 volumes d'*eau R* et de 80 volumes de *méthanol R* puis filtrez sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm).

*Solution témoin*. Dissolvez 0,02 g de *4-hydroxybenzoate de méthyle R* et 0,02 g de *4-hydroxybenzoate d'éthyle R* dans du *méthanol R* puis complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,12 m, Ø = 4 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie R* (5 µm),
– *température* : 20 °C.

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *eau R,*
– *phase mobile B* : *méthanol R,*

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 3 | 62 | 38 |
| 3 - 20 | 62 → 55 | 38 → 45 |
| 20 - 30 | 55 | 45 |
| 30 - 55 | 55 → 45 | 45 → 55 |

*Débit* : 1,2 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 225 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Rétention relative* par rapport à la santonine (temps de rétention = environ 9,5 min) : 4-hydroxybenzoate de butyle = environ 4,6.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 5 entre les pics dus au 4-hydroxybenzoate de méthyle et au 4-hydroxybenzoate d'éthyle.

Calculez la teneur pour cent en sesquiterpènes lactoniques, exprimés en tiglate de dihydrohélénaline, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{F_1 \times C \times V \times 1,187}{F_2 \times m \times 10}$$

$F_1$ = surface des pics apparaissant entre les pics dus à la santonine et au 4-hydroxybenzoate de butyle dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_2$ = surface du pic dû à la santonine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes,

$C$ = concentration en santonine de la solution d'étalon interne utilisé pour préparer la solution à examiner, en milligrammes par millilitre,

$V$ = volume de la solution d'étalon interne utilisé pour préparer la solution à examiner, en millilitres,

1,187 = facteur de corrélation entre le tiglate de dihydrohélénaline et la santonine.

**01/2011:1866**

# ARTICHAUT (FEUILLE D')

## Cynarae folium

DÉFINITION

Feuille séchée, entière ou coupée, de *Cynara scolymus* L.

*Teneur* : au minimum 0,8 pour cent d'acide chlorogénique ($C_{16}H_{18}O_9$ ; $M_r$ 354,3) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La feuille entière peut atteindre 70 cm de long et 30 cm de large. Le limbe est profondément lobé dans sa partie supérieure, jusqu'à 1-2 cm du pétiole de chaque côté, et devient penné dans sa partie inférieure ; tous les segments ont un bord nettement denté et se rétrécissent vers l'apex. Les épines sont absentes. La face supérieure du limbe est verte, avec un fin duvet de poils blanchâtres, tandis que la face inférieure est vert pâle ou blanche et fortement tomenteuse avec de longs poils enchevêtrés. Le pétiole et les nervures principales sont plats sur la face supérieure, proéminents et striés longitudinalement sur la face inférieure, avec des poils bien visibles sur les 2 faces.

B. Réduisez la feuille d'artichaut en poudre (1000) (*2.9.12*). La poudre est gris-vert. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants (figure 1866.-1) : des fragments des épidermes du limbe, vus de face ; l'épiderme supérieur [F] est composé de cellules à parois droites ou légèrement sinueuses [Fa] et accompagné de parenchyme palissadique [Fb] ; l'épiderme inférieur [C] est composé de cellules à parois plus fortement sinueuses ; sur les 2 faces, de nombreux stomates anomocytiques (*2.8.3*) [D], et des poils tecteurs pluricellulaires unisériés en masse feutrée, la majorité fragmentés [Ca], à pied court composé de plusieurs cellules et à cellule terminale très allongée, étroite et souvent recourbée, d'autres formés de 4-6 cellules cylindriques ; de très rares poils sécréteurs à pied court et tête unisériée ou bisériée, vus de face [E] ou en section transversale [Ba] ; de très nombreux fragments de poils tecteurs [G] ; des fragments de limbe en section transversale [B] ; d'abondants fragments de tissu vasculaire provenant du pétiole et des nervures [A].

Drogues végétales

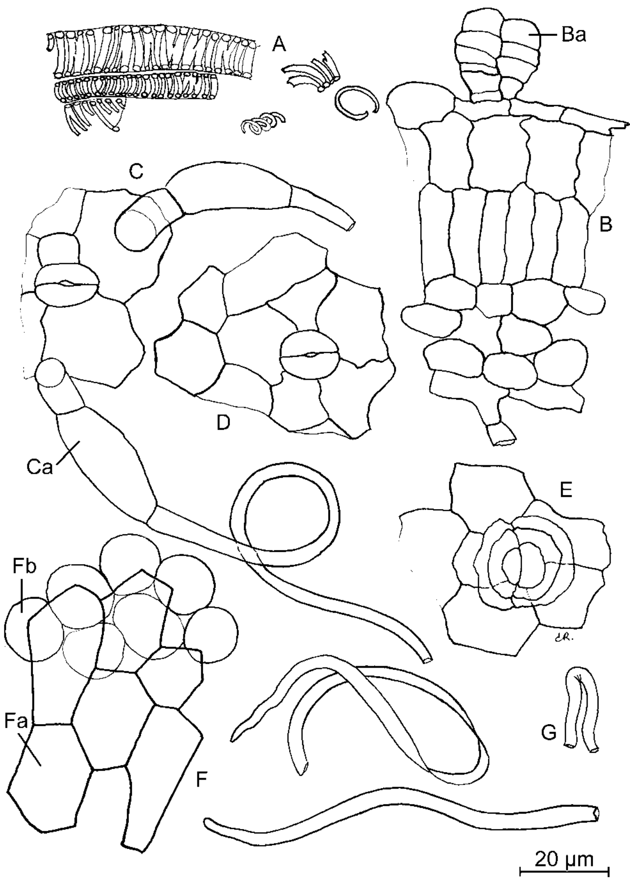



Figure 1866.-1.– *Dessin pour l'identification B de la feuille d'artichaut pulvérisée*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 2,0 g de feuille d'artichaut pulvérisée (1000) (*2.9.12*), ajoutez 20 mL d'*éthanol à 60 pour cent V/V R*. Laissez en contact pendant 2 h en agitant de temps en temps. Filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *lutéoline-7-glucoside R* et 5 mg d'*acide chlorogénique SCR* dans du *méthanol R* puis complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, acide acétique glacial R, eau R, acétate d'éthyle R* (11:11:27:100 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 2 µL] en bandes de 10 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 13 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : chauffez à 100 °C pendant 5 min ; pulvérisez sur la plaque encore chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R* puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R* ; examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes de fluorescence présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| _______ | Une bande de fluorescence bleu clair<br>_______ |
| Lutéoline-7-glucoside : une bande de fluorescence jaune ou orange<br>Acide chlorogénique : une bande de fluorescence bleu clair<br>_______ | Une bande de fluorescence jaune ou orange (lutéoline-7-glucoside)<br>Une bande de fluorescence bleu clair (acide chlorogénique)<br>_______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 20,0 pour cent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de feuille d'artichaut pulvérisée (710) (*2.9.12*).

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. A 0,500 g de feuille d'artichaut pulvérisée (1000) (*2.9.12*), ajoutez 50,0 mL de *méthanol R* et chauffez à reflux au bain-marie à 70 °C pendant 1 h. Centrifugez et transférez le surnageant dans une fiole jaugée de 200 mL. Répétez les opérations et complétez à 200,0 mL avec de l'*eau R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 5,0 mg d'*acide chlorogénique SCR* dans 50,0 mL de *méthanol R*. Transférez 5,0 mL de cette solution dans une fiole jaugée, ajoutez 5 mL de *méthanol R* et complétez à 20,0 mL avec de l'*eau R*.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,

– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),

– *température* : 40 °C.

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acide phosphorique R, eau R* (0,5:99,5 *V/V*),

– *phase mobile B* : *acide phosphorique R, acétonitrile R* (0,5:99,5 *V/V*),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 1 | 92 | 8 |
| 1 - 20 | 92 → 75 | 8 → 25 |
| 20 - 33 | 75 | 25 |
| 33 - 35 | 75 → 0 | 25 → 100 |

*Débit* : 1,2 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 330 nm.

*Injection* : 25 µL.

*Conformité du système* : solution à examiner :

– le chromatogramme obtenu est semblable au chromatogramme représenté figure 1866.-2,

– *résolution* : au minimum 2,0 entre le pic dû à l'acide chlorogénique et le pic suivant (pic 2).

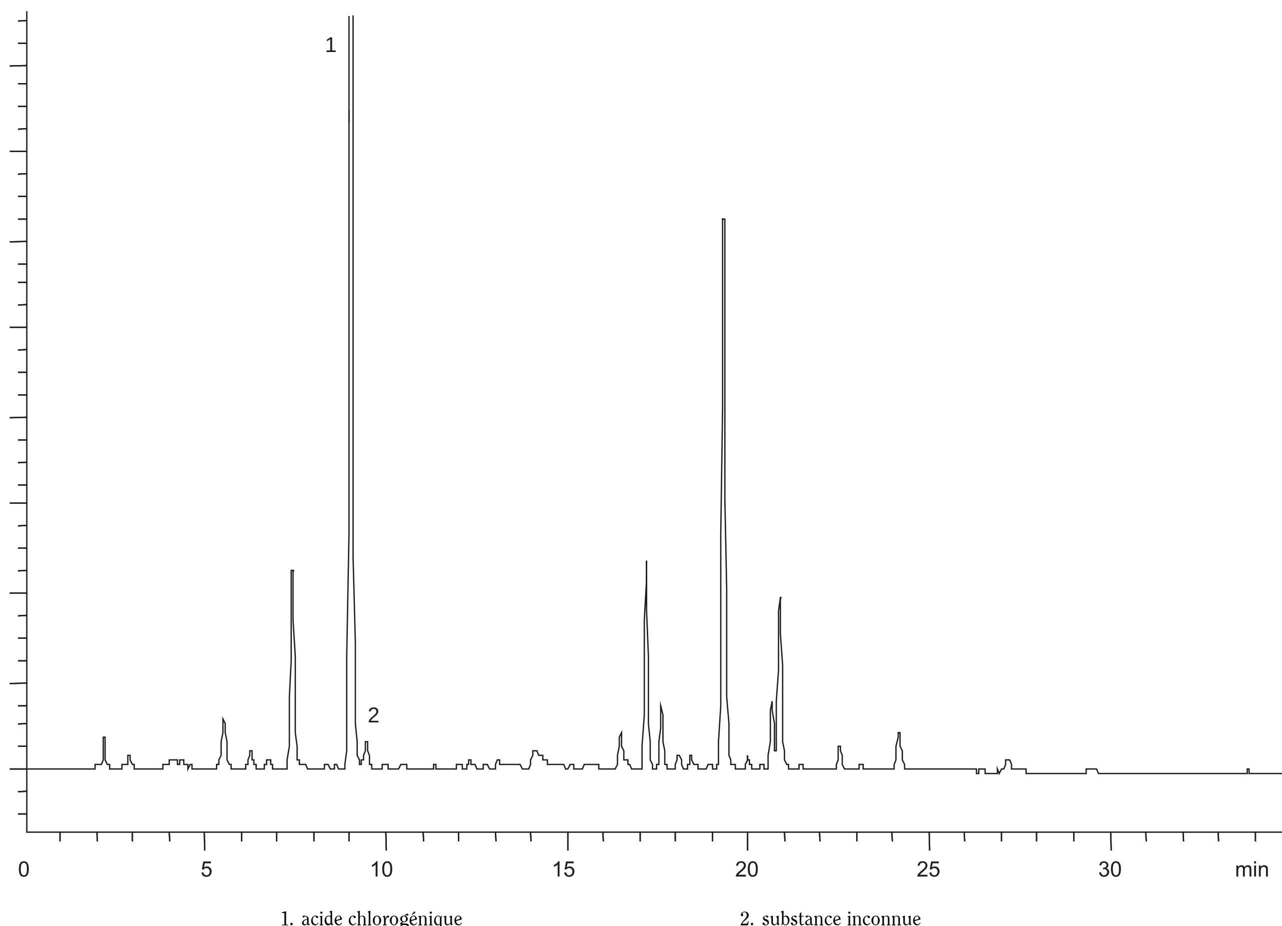



Figure 1866.-2.– *Chromatogramme pour le dosage de la feuille d'artichaut : solution à examiner*

Calculez la teneur pour cent en acide chlorogénique à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'acide chlorogénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'acide chlorogénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai dans la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse d'*acide chlorogénique SCR* dans la solution témoin, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en acide chlorogénique dans l'*acide chlorogénique SCR*.

**01/2010:2389**

# ARTICHAUT (FEUILLE D'), EXTRAIT SEC DE

## Cynarae folii extractum siccum

DÉFINITION

Extrait sec produit à partir de *Feuille d'artichaut (1866)*.

*Teneur* : au minimum 0,6 pour cent d'acide chlorogénique ($C_{16}H_{18}O_9$ ; $M_r$ 354,3) (extrait desséché).

PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec de l'eau à 80 °C au minimum.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre amorphe, brun clair ou brune.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Dissolvez 1,0 g d'extrait à examiner dans 10 mL d'*éthanol à 60 pour cent V/V R*. Traitez aux ultrasons pendant 5 min et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 5 mg de *lutéoline-7-glucoside R* et 5 mg d'*acide chlorogénique R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, acide acétique glacial R, eau R, acétate d'éthyle R* (11:11:27:100 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 2 µL] en bandes de 10 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 13 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : chauffez à 100 °C pendant 5 min ; pulvérisez sur la plaque encore chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R* puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R* ; examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes de fluorescence présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence bleu clair |
| _______ | _______ |
| Lutéoline-7-glucoside : une bande de fluorescence jaune ou orange | Une bande de fluorescence jaune ou orange (lutéoline-7-glucoside) |
| Acide chlorogénique : une bande de fluorescence bleu clair | Une bande de fluorescence bleu clair (acide chlorogénique) |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.8.17*) : au maximum 6,0 pour cent.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 30,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Mélange de solvants* : *méthanol R*, *eau R* (30:70 *V/V*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 30,0 mg d'extrait à examiner dans le mélange de solvants et complétez à 25,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 5,0 mg d'*acide chlorogénique SCR* dans 50,0 mL de *méthanol R*. Transférez 5,0 mL de cette solution dans une fiole jaugée, ajoutez 5 mL de *méthanol R* et complétez à 20,0 mL avec de l'*eau R*.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 30 mg d'*extrait sec de feuille d'artichaut ERV* dans le mélange de solvants et complétez à 25,0 mL avec le mélange de solvants.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 μm),
– *température* : 40 °C.

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acide phosphorique R*, *eau R* (0,5:99,5 *V/V*),
– *phase mobile B* : *acide phosphorique R*, *acétonitrile R* (0,5:99,5 *V/V*),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 1 | 92 | 8 |
| 1 - 20 | 92 → 75 | 8 → 25 |
| 20 - 33 | 75 | 25 |
| 33 - 35 | 75 → 0 | 25 → 100 |

*Débit* : 1,2 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 330 nm.

*Injection* : 25 μL.

*Conformité du système* : solution témoin (b) :

– *rapport pic/vallée* : au minimum 2,5, avec $H_p$ = hauteur au-dessus de la ligne de base du pic suivant immédiatement le pic dû à l'acide chlorogénique et $H_v$ = hauteur au-dessus de la ligne de base du point le plus bas du tracé entre ce pic et celui dû à l'acide chlorogénique,
– le chromatogramme obtenu est semblable au chromatogramme fourni avec l'*extrait sec de feuille d'artichaut ERV*.

Calculez la teneur pour cent en acide chlorogénique à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 0,125}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'acide chlorogénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'acide chlorogénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),

$m_1$ = masse d'extrait à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en milligrammes,

$m_2$ = masse d'*acide chlorogénique SCR* utilisée pour préparer la solution témoin (a), en milligrammes,

$p$ = teneur pour cent en acide chlorogénique dans l'*acide chlorogénique SCR*.

**07/2009:2419**
**corrigé 7.0**

# ASPIC (HUILE ESSENTIELLE D')

## Spicae aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau à partir des sommités fleuries de *Lavandula latifolia* Medik.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide mobile, limpide, jaune clair ou jaune-vert.

Odeur rappelant le cinéole et le camphre.

IDENTIFICATION

*Première identification* : *B*.

*Seconde identification* : *A*.

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 20 μL d'huile essentielle d'aspic dans 1 mL de *toluène R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 μL de *cinéole R*, 10 μL de *linalol R* et 10 μL d'*acétate de linalyle R* dans 1 mL de *toluène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 μm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 μm)].

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R*, *toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 μL [ou 2 μL], en bandes de 10 mm [ou 6 mm].

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 8 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min. Examinez immédiatement à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| | Une bande rose |
| _______ | _______ |
| Acétate de linalyle : une bande violette ou brune | Une faible bande violette ou brune peut apparaître (acétate de linalyle)<br>Une bande rose |
| _______ | _______ |
| Cinéole : une bande brun-violet | Une bande brun-violet intense (cinéole) |
| Linalol : une bande violette ou brune | Une bande violette ou brune intense (linalol)<br>Une bande grisâtre ou brunâtre<br>Une faible bande violette |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

Drogues végétales

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.
*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux pics dus au limonène, au cinéole, au camphre, au linalol, à l'acétate de linalyle, à l'α-terpinéol et au *trans*-α-bisabolène du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,894 à 0,907.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,461 à 1,468.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : – 7° à + 2°.

**Indice d'acide** (*2.5.1*) : au maximum 1,5, déterminé sur 5,00 g d'huile essentielle d'aspic.

**Solubilité dans l'alcool** (*2.8.10*) : 1,0 mL d'huile essentielle d'aspic est soluble, parfois avec opalescence, dans 3,0 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*.

**Profil chromatographique.** Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner.* Dissolvez 200 µL d'huile essentielle d'aspic dans l'*heptane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 200 µL d'*huile essentielle d'aspic SCR* dans l'*heptane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 5 µL de *limonène R* dans 50,0 mL d'*heptane R*. Prélevez 0,5 mL de cette solution et complétez à 5,0 mL avec de l'*heptane R*.

*Colonne* :
– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 60 m, Ø = 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur du film 0,25 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Rapport de division* : 1:50.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 15 | 70 |
| | 15 - 70 | 70 - 180 |
| Chambre à injection | | 220 |
| Détecteur | | 220 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL.

*Identification des pics* : utilisez le chromatogramme fourni avec l'*huile essentielle d'aspic SCR* et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) pour identifier les pics dus au limonène, au cinéole, au camphre, au linalol, à l'acétate de linalyle, à l'α-terpinéol et au *trans*-α-bisabolène.

*Conformité du système* : solution témoin (a) :
– le chromatogramme obtenu est semblable au chromatogramme fourni avec l'*huile essentielle d'aspic SCR*,
– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au limonène et au cinéole.

Déterminez la teneur pour cent de chacun de ces composants. Ces teneurs sont comprises entre les valeurs suivantes :
– *limonène* : 0,5 pour cent à 3,0 pour cent,
– *cinéole* : 16,0 pour cent à 39,0 pour cent,
– *camphre* : 8,0 pour cent à 16,0 pour cent,
– *linalol* : 34,0 pour cent à 50,0 pour cent,
– *acétate de linalyle* : au maximum 1,6 pour cent,
– *α-terpinéol* : 0,2 pour cent à 2,0 pour cent,
– *trans-α-bisabolène* : 0,4 pour cent à 2,5 pour cent,
– *limite d'exclusion* : la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,05 pour cent).

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

**01/2011:2435**

# ASTRAGALUS MONGHOLICUS (RACINE D')

## Astragali mongholici radix

DÉFINITION

Racine entière, séchée, d'*Astragalus mongholicus* var. *mongholicus* (Syn. *Astragalus membranaceus* Bunge var. *mongholicus* (Bunge) P.K. Hsiao) et d'*Astragalus mongholicus* var. *dahuricus* (DC.) Podlech (Syn. *Astragalus membranaceus* Bunge), débarrassée des radicelles et du collet, récoltée du printemps à l'automne.

*Teneur* : au minimum 0,040 pour cent d'astragaloside IV ($C_{41}H_{68}O_{14}$ ; $M_r$ 785) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Eléments cylindriques, souvent ramifiés, s'épaississant vers le haut, d'une longueur de 30-90 cm et d'un diamètre de 1-3,5 cm. La surface externe est jaune-brun pâle ou brun pâle, parcourue de rides ou de sillons longitudinaux irréguliers. La texture est dure et coriace, difficile à briser ; la cassure est très fibreuse et faiblement (plante cultivée) ou fortement (plante sauvage) amylacée ; l'écorce est blanc-jaune, le bois jaune pâle à stries et fissures radiales ; la région centrale est brun foncé et peut, chez les racines âgées, être résorbée et former un creux entouré de fragments de tissu en désintégration.

B. Réduisez la racine d'astragalus mongholicus en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est blanc-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fibres, en faisceaux ou isolées, d'un diamètre de 8-30 µm, à paroi épaisse et surface parcourue de fissures longitudinales, avec des parois primaires souvent séparées des parois secondaires, et des extrémités souvent cassées ou en brosse, ou légèrement tronquées ; des vaisseaux incolores ou oranges aux ponctuations aréolées très rapprochées ; des fragments de suber comportant plusieurs assises, souvent accompagnés de phelloderme collenchymateux ; parfois, des cellules scléreuses de forme arrondie, oblongue ou irrégulière, aux parois légèrement épaissies. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V* : la poudre présente de petits grains d'amidon arrondis ou ovoïdes, généralement simples ou parfois composés de 2 ou 3 éléments, d'environ 5 µm de diamètre.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).
*Solution à examiner.* Chauffez à reflux 3 g de racine d'astragalus mongholicus pulvérisée (355) (*2.9.12*) avec 50 mL de *méthanol R* pendant 50 min puis filtrez. Évaporez le filtrat à siccité sous pression réduite et reprenez le résidu dans 1 mL d'*eau R*. Transférez la solution sur une colonne d'extraction en phase solide de 6 mL contenant du *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* préconditionnée avec 3 mL de *méthanol R* puis 3 mL d'*eau R*. Lavez la colonne avec 15 mL d'*eau R* puis avec 15 mL d'une solution de *méthanol R* à 30 pour cent *V/V*. Rejetez les eaux de lavage. Eluez avec 20 mL de *méthanol R*, recueillez l'éluat et évaporez à siccité sous pression réduite. Reprenez le résidu dans 2 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 10,0 mg de *daidzine R* et 5,0 mg de *daidzéine R* dans 5,0 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (2-10 µm).

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R, acétate d'éthyle R* (10:13,5:100 *V/V/V*).

*Dépôt* : 3 µL en bandes de 8 mm.

*Développement* : sur un parcours de 7 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence bleue |
| Daidzéine : une bande d'atténuation de fluorescence | |
| | Une bande d'atténuation de fluorescence |
| _______ | _______ |
| | Une bande d'atténuation de fluorescence |
| Daidzine : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : traitez avec de la *solution d'aldéhyde anisique R*. Chauffez à 100 °C pendant 3 min. Examinez en lumière ultraviolette à 366 nm.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande violette |
| Daidzéine : une bande bleu pâle | |
| | Une bande violette |
| _______ | _______ |
| | Une bande violette |
| Daidzine : une bande bleu pâle | Une bande brune |
| | 5 bandes brunes |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 3 h sur 1,000 g de racine d'astragalus mongholicus pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 5,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 1,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Dans un extracteur de type Soxhlet, pesez 4,0 g de racine d'astragalus mongholicus pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 40 mL de *méthanol R* et laissez macérer une nuit. Ajoutez à nouveau 40 mL de *méthanol R* et chauffez à reflux pendant 4 h. Evaporez à siccité. Dissolvez le résidu dans 10 mL d'*eau R*, en chauffant légèrement si nécessaire. Agitez avec 4 fois 40 mL de *butanol R* saturé d'*eau R*. Réunissez les extraits butanoliques et lavez avec 2 fois 40 mL d'*ammoniaque R*. Jetez les phases ammoniaquées et évaporez les phases butanoliques à siccité. Dissolvez le résidu dans 5 mL d'*eau R* et refroidissez. Déposez la solution sur une colonne d'extraction en phase solide contenant 1 g de *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R*, préalablement lavée avec 5 mL de *méthanol R* et 5 mL d'*eau R*. Lavez la colonne avec 20 mL d'*eau R* et 20 mL d'*éthanol à 25 pour cent V/V R*. Eluez avec 25 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*, recueillez l'éluat et évaporez à siccité. Dissolvez le résidu dans 5,0 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 10,0 mg d'*astragaloside IV SCR* dans du *méthanol R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solutions témoins (b), (c), (d).* Diluez la solution témoin (a) de façon à obtenir 3 solutions témoins dont les concentrations en astragaloside IV encadrent la concentration présumée de la solution à examiner.

*Solution témoin (e).* Dissolvez 5,0 mg de *ginsénoside Rb1 R* dans 5 mL de *méthanol R* et complétez à 10,0 mL avec la solution témoin (a).

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 3,2 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (3 µm),
– *température* : 25 °C.

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *eau R,*
– *phase mobile B* : *acétonitrile R,*

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 5 | 90 | 10 |
| 5 - 10 | 90 → 80 | 10 → 20 |
| 10 - 20 | 80 → 75 | 20 → 25 |
| 20 - 30 | 75 → 67 | 25 → 33 |
| 30 - 40 | 67 → 65 | 33 → 35 |
| 40 - 50 | 65 → 40 | 35 → 60 |
| 50 - 55 | 40 | 60 |

*Débit* : 0,5 mL/min.

*Détection* : détecteur à diffusion de lumière ; les réglages suivants ont donné satisfaction ; si le détecteur présente des paramètres de réglage différents, ajustez les réglages de sorte que le critère de conformité du système soit satisfait :

– *gaz vecteur* : air,
– *débit* : 1,5 mL/min,
– *température de l'évaporateur* : 50 °C.

*Injection* : 20 µL de solution à examiner et des solutions témoins (b), (c), (d) et (e).

*Rétention relative* par rapport au ginsénoside Rb1 (temps de rétention = environ 33,6 min) : astragaloside IV = environ 1,05.

*Conformité du système* :

– *résolution* : au minimum 4,0 entre les pics dus à l'astragaloside IV et au ginsénoside Rb1 dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (e).

Tracez une courbe d'étalonnage en portant en abscisse le logarithme de la concentration (mg/mL) des solutions témoins (b), (c) et (d) (corrigé par la teneur pour cent déclarée de l'*astragaloside IV SCR*) et en ordonnée le logarithme de la surface du pic correspondant. Calculez la teneur pour cent en astragaloside IV à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{10^A \times 0,5}{m}$$

*A* = logarithme de la concentration correspondant au pic de l'astragaloside IV dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, déterminée à partir de la courbe d'étalonnage,

*m* = masse de la drogue à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes.

**01/2008:1220**
**corrigé 6.0**

# AUBÉPINE (BAIE D')

## Crataegi fructus

DÉFINITION

Pseudo-fruit séché de *Crataegus monogyna* Jacq. (Lindm.) ou de *Crataegus laevigata* (Poir.) D.C. (synonyme : *Crataegus oxyacantha* L.) ou de leurs hybrides, ou mélange de ces pseudo-fruits.

*Teneur* : au minimum 1,0 pour cent de procyanidines, exprimées en chlorure de cyanidine ($C_{15}H_{11}ClO_6$ ; $M_r$ 322,7) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Saveur mucilagineuse sucrée.

IDENTIFICATION

A. Le pseudo-fruit de *C. monogyna* est de forme obovée ou globulaire, généralement d'une longueur de 6-10 mm et d'une largeur de 4-8 mm, brun-rouge ou rouge sombre. Il présente une surface ponctuée ou, plus rarement, réticulée. L'extrémité supérieure du fruit est couronnée par les restes de 5 sépales réfléchis, entourant un petit disque en creux délimité par un léger renflement. Au centre du disque se trouvent les restes du style avec, à la base, des touffes de poils, raides, incolores. L'extrémité inférieure du fruit porte un court fragment du pédicelle ou, plus fréquemment, une petite cicatrice ronde de couleur claire correspondant au point d'attache du pédicelle. Le réceptacle est charnu et contient un fruit ovoïde, brun-jaune, à paroi épaisse et dure, qui renferme une graine unique brun pâle, lisse et luisante, de forme allongée.

   Le pseudo-fruit de *C. laevigata* a une longueur pouvant atteindre 13 mm. Il contient 2-3 drupes, à face ventrale aplatie, présentant des poils courts à leur extrémité. Le centre du disque surmontant le pseudo-fruit porte souvent des restes des 2 styles.

B. Réduisez la baie d'aubépine en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est rouge-gris. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : de longs poils tecteurs, unicellulaires, provenant de l'intérieur du disque, souvent flexueux, se terminant en pointe et possédant une paroi lisse, fortement épaissie et lignifiée ; des fragments de parenchyme du réceptacle dont l'assise externe est rouge et dont certaines cellules des assises internes contiennent de petites macles d'oxalate de calcium ; de rares fragments comprenant des groupes de scléréides et de faisceaux vasculaires associés à des files de cellules contenant des prismes d'oxalate de calcium ; des fragments de péricarpe composé de grandes cellules scléreuses à paroi épaisse comportant de nombreuses ponctuations, dont certaines sont très visiblement ramifiées ; quelques fragments de tégument à assise épidermique composée de cellules mucilagineuses hexagonales, surmontant une assise pigmentée en brun-jaune et contenant de nombreux prismes d'oxalate de calcium de forme allongée ; du parenchyme provenant de l'albumen et des cotylédons, composé de cellules à paroi mince, contenant des grains d'aleurone et des globules d'huile.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

   *Solution à examiner.* A 1,0 g de baie d'aubépine pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Chauffez dans un bain-marie à 65 °C pendant 5 min, en agitant fréquemment. Laissez refroidir à température ambiante, puis filtrez. Complétez le filtrat à 10 mL avec du *méthanol R*.

   *Solution témoin.* Dissolvez 2 mg d'*acide chlorogénique R*, 2 mg d'*acide caféique R*, 5 mg d'*hypéroside R* et 5 mg de *rutine R* dans 20 mL de *méthanol R*.

   *Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

   *Phase mobile* : *acide formique anhydre R*, *eau R*, *méthyléthylcétone R*, *acétate d'éthyle R* (10:10:30:50 *V/V/V/V*).

   *Dépôt* : 30 µL de solution à examiner et 10 µL de solution témoin, en bandes.

   *Développement* : sur un parcours de 15 cm.

   *Séchage* : à 100-105 °C.

   *Détection* : pulvérisez à chaud une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R*, puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R* ; laissez sécher à l'air pendant 30 min et examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

   *Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente, dans sa moitié inférieure et par ordre de $R_F$ croissant, une bande de fluorescence brun-jaune (rutine), une bande de fluorescence bleu clair (acide chlorogénique) et une bande de fluorescence brun-jaune (hypéroside) ; il présente en outre, dans son tiers supérieur, une bande de fluorescence bleu clair (acide caféique). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente 3 bandes semblables quant à leur position et leur fluorescence à celles du chromatogramme obtenu avec la solution témoin dues à l'acide chlorogénique, à l'hypéroside et à l'acide caféique. Il présente également trois faibles bandes de fluorescence rougeâtre dont une est semblable quant à sa position à celle due à la rutine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, les 2 autres étant situées au-dessus de la bande due à l'hypéroside. Des bandes de fluorescence bleu clair sont présentes au-dessus et au-dessous de la bande due à l'acide caféique.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent de pseudo-fruits altérés et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers. La baie d'aubépine ne contient pas de pseudo-fruits d'autres espèces du genre *Crataegus* (*C. nigra* Waldst. et Kit., *C. pentagyna* Waldst. et Kit. ex Willd. et *C. azarolus* L.), se caractérisant par la présence de plus de 3 drupes.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de baie d'aubépine pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 5,0 pour cent.

DOSAGE

A 2,50 g de baie d'aubépine pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 30 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Chauffez à reflux pendant 30 min, puis filtrez. Lavez le résidu avec 10,0 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Ajoutez au filtrat 15,0 mL d'*acide chlorhydrique R1* et 10,0 mL d'*eau R*. Chauffez à reflux pendant 80 min. Laissez refroidir, filtrez et lavez le résidu avec de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R* jusqu'à obtention d'un filtrat incolore. Complétez le filtrat à 250,0 mL avec de l'*éthanol à*

*70 pour cent V/V R*. Introduisez 50,0 mL de solution dans un ballon à fond rond, évaporez jusqu'à réduction du volume à environ 3 mL, et transvasez dans une ampoule à décantation. Rincez le ballon à fond rond avec 10 mL puis 5 mL d'*eau R* et transvasez dans l'ampoule à décantation. Agitez avec 3 fois 15 mL de *butanol R*. Réunissez les phases organiques et complétez à 100,0 mL avec du *butanol R*.

Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à 545 nm.

Calculez la teneur pour cent en procyanidines, exprimées en chlorure de cyanidine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 500}{75 \times m}$$

en prenant 75 comme valeur de l'absorbance spécifique du chlorure de cyanidine.

$A$ = absorbance à 545 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2010:1432**

# AUBÉPINE (FEUILLE ET FLEUR D')

## Crataegi folium cum flore

DÉFINITION

Rameaux florifères séchés, entiers ou coupés de *Crataegus monogyna* Jacq. (Lindm.), *C. laevigata* (Poir.) DC. (synonymes : *C. oxyacanthoides* Thuill. ; *C. oxyacantha* auct.) ou de leurs hybrides, ou plus rarement d'autres espèces européennes de *Crataegus* comme *C. pentagyna* Waldst. et Kit. ex Willd., *C. nigra* Waldst. et Kit. et *C. azarolus* L.

*Teneur* : au minimum 1,5 pour cent de flavonoïdes totaux, exprimés en hyperoside ($C_{21}H_{20}O_{12}$ ; $M_r$ 464,4) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Les rameaux, brun foncé, ligneux, ont un diamètre de 1-2,5 mm et portent des feuilles alternes, pétiolées, à petites stipules souvent caduques, ainsi que de nombreuses petites fleurs, blanches, disposées en corymbes. Les feuilles, plus ou moins profondément lobées, ont un bord légèrement denté ou presque entier ; celles de *C. laevigata* sont pennatilobées ou pennatifides et divisées en 3, 5 ou 7 lobes obtus ; celles de *C. monogyna* sont pennatiséquées et divisées en 3 ou 5 lobes acuminés. Leur face adaxiale est vert foncé ou vert-brun, leur face abaxiale est d'un vert-gris plus clair et présente une nervation réticulée dense et saillante. Les feuilles de *C. laevigata, C. monogyna* et *C. pentagyna* sont glabres ou portent seulement des poils isolés, celles de *C. azarolus* et de *C. nigra* sont fortement pubescentes. Les fleurs comportent un calice tubulaire vert-brun composé de 5 sépales libres, réfléchis, une corolle formée de 5 pétales libres blanc-jaune ou brunâtres, arrondis ou approximativement ovales, brièvement onguiculés, et de nombreuses étamines. L'ovaire, soudé au calice, comporte 1-5 carpelles dont chacun est surmonté d'un long style et contient 1 seul ovule, celui de *C. monogyna* comporte 1 seul carpelle, celui de *C. laevigata* 2 ou 3, celui de *C. azarolus* 2, 3 ou parfois 1 seul, celui de *C. pentagyna* 5 ou plus rarement 4.

B. Réduisez la drogue en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des poils tecteurs, unicellulaires, le plus souvent à paroi épaisse et large lumen, presque droits ou légèrement recourbés, ponctués à la base ; des fragments d'épiderme foliaire comportant des cellules à paroi anticlinale sinueuse ou polygonale et de grands stomates de type anomocytique (*2.8.3*) entourés de 4-7 cellules annexes ; des cellules parenchymateuses du mésophylle contenant des macles d'oxalate de calcium mesurant en général 10-20 µm, associées à des nervures contenant des groupes de petits cristaux prismatiques ; des fragments de pétales à cellules épidermiques polygonales arrondies, fortement papilleuses, à paroi épaisse, dont la cuticule présente nettement des stries onduleuses ; des fragments d'anthères présentant un endothécium avec une bordure arquée et régulièrement épaissie ; des fragments de tiges contenant des cellules collenchymateuses, des vaisseaux à ponctuations aréolées et des groupes de fibres sclérenchymateuses lignifiées à lumen étroit ; de nombreux grains de pollen sphériques à elliptiques, ou triangulaires, d'un diamètre allant jusqu'à 45 µm, à 3 pores germinatifs et exine légèrement granuleuse.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R* et chauffez à reflux dans un bain-marie à 65 °C, pendant 5 min, refroidissez et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 1,0 mg d'*acide chlorogénique R* et 2,5 mg d'*hypéroside R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, méthyléthylcétone R, acétate d'éthyle R* (10:10:30:50 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez sur la plaque encore chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R* ; pulvérisez ensuite une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R* ; laissez sécher à l'air pendant 30 min puis examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| | Une bande de fluorescence vert-jaune (vitexine) |
| Hypéroside : une bande de fluorescence orange-jaune | Une bande de fluorescence orange-jaune (hypéroside) |
| Acide chlorogénique : une bande de fluorescence bleu clair | Une bande de fluorescence bleu clair (acide chlorogénique) |
| | Une bande de fluorescence vert-jaune (vitexine-2″-rhamnoside) |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 8 pour cent de rameaux lignifiés d'un diamètre supérieur à 2,5 mm et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

DOSAGE

*Solution mère*. Dans un flacon de 200 mL, introduisez 0,400 g de drogue pulvérisée (250) (*2.9.12*) et ajoutez 40 mL d'*éthanol à 60 pour cent V/V R*. Chauffez dans un bain-marie à 60 °C pendant 10 min, en agitant fréquemment. Laissez refroidir et filtrez sur un tampon de coton hydrophile en recueillant le filtrat dans une fiole jaugée de 100 mL. Transférez le coton hydrophile avec le résidu de la drogue dans le flacon de 200 mL, ajoutez 40 mL d'*éthanol à 60 pour cent V/V R* et chauffez à

Drogues végétales

nouveau dans un bain-marie à 60 °C pendant 10 min, en agitant fréquemment. Laissez refroidir et filtrez dans la même fiole jaugée de 100 mL. Rincez le flacon de 200 mL avec de l'*éthanol à 60 pour cent V/V R*, filtrez et transférez dans la même fiole jaugée de 100 mL. Complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 60 pour cent V/V R* et filtrez.

*Solution à examiner.* Introduisez 5,0 mL de solution mère dans un ballon à fond rond et évaporez à siccité sous pression réduite. Reprenez le résidu avec 8 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique anhydre R* et transvasez dans une fiole jaugée de 25 mL. Rincez le ballon à fond rond avec 3 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique anhydre R* ; transvasez ensuite dans la même fiole jaugée de 25 mL. Ajoutez 10,0 mL d'une solution contenant 25,0 g/L d'*acide borique R* et 20,0 g/L d'*acide oxalique R* dans de l'*acide formique anhydre R* puis complétez à 25,0 mL avec de l'*acide acétique anhydre R*.

*Liquide de compensation.* Introduisez 5,0 mL de solution mère dans un ballon à fond rond et évaporez à siccité sous pression réduite. Reprenez le résidu dans 8 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique anhydre R* et transvasez dans une fiole jaugée de 25 mL. Rincez le ballon à fond rond avec 3 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique anhydre R* ; transvasez ensuite dans la même fiole jaugée de 25 mL. Ajoutez 10,0 mL d'*acide formique anhydre R* puis complétez à 25,0 mL avec de l'*acide acétique anhydre R*.

Après 30 min, mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner à 410 nm, par comparaison au liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en flavonoïdes totaux, exprimés en hypéroside, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 1,235}{m}$$

en prenant 405 comme valeur de l'absorbance spécifique de l'hyperoside.

$A$ = absorbance à 410 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2008:1864**

# AUBÉPINE (FEUILLE ET FLEUR D'), EXTRAIT FLUIDE QUANTIFIÉ DE

## Crataegi folii cum flore extractum fluidum quantificatum

### DÉFINITION

Extrait fluide quantifié produit à partir de *Feuille et fleur d'aubépine (1432)*.

*Teneur* : 0,8 pour cent à 3,0 pour cent de flavonoïdes, exprimés en hypéroside ($C_{21}H_{20}O_{12}$ ; $M_r$ 464,4).

### PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale et de l'éthanol de 30 pour cent *V/V* à 70 pour cent *V/V*, par une méthode appropriée.

### IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Diluez 1,0 g d'extrait à examiner dans du *méthanol R* et complétez à 5 mL avec le même solvant. Mélangez et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 1,0 mg d'*acide chlorogénique R* et 2,5 mg d'*hypéroside R* dans du *méthanol R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, méthyléthylcétone R, acétate d'éthyle R* (10:10:30:50 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL [ou 5 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R* ; pulvérisez ensuite une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R* ; laissez sécher la plaque à l'air pendant 30 min, puis examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| | Une bande de fluorescence vert-jaune |
| Hypéroside : une bande de fluorescence orange-jaune | Une bande de fluorescence orange-jaune (hypéroside) |
| Acide chlorogénique : une bande de fluorescence bleu clair | Une bande de fluorescence bleu clair (acide chlorogénique) |
| | Une bande de fluorescence vert-jaune |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

### ESSAI

**Ethanol** (*2.9.10*) : 95 pour cent *V/V* à 105 pour cent *V/V* de la quantité mentionnée sur l'étiquette.

### DOSAGE

*Solution mère.* Diluez environ 0,400 g d'extrait à examiner exactement pesés dans de l'*éthanol à 60 pour cent V/V R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Solution à examiner.* Introduisez 5,0 mL de solution mère dans un ballon à fond rond et évaporez à siccité, sous pression réduite. Reprenez le résidu avec 8 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique glacial R* puis transvasez dans une fiole jaugée de 25 mL. Rincez le ballon à fond rond avec 3 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique glacial R* puis transvasez dans la fiole jaugée de 25 mL. Ajoutez 10,0 mL d'une solution contenant 25,0 g/L d'*acide borique R* et 20,0 g/L d'*acide oxalique R* dans de l'*acide formique anhydre R*, puis complétez à 25,0 mL avec de l'*acide acétique anhydre R*.

*Liquide de compensation.* Introduisez 5,0 mL de solution mère dans un ballon à fond rond et évaporez à siccité, sous pression réduite. Reprenez le résidu dans 8 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique glacial R* puis transvasez dans une fiole jaugée de 25 mL. Rincez le ballon à fond rond avec 3 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique glacial R* puis transvasez dans la fiole jaugée de 25 mL. Ajoutez 10,0 mL d'*acide formique anhydre R*, puis complétez à 25,0 mL avec de l'*acide acétique anhydre R*.

Après 30 min, mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner à 410 nm.

Calculez la teneur pour cent en flavonoïdes totaux, exprimés en hypéroside, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 1,235}{m}$$

en prenant 405 comme valeur de l'absorbance spécifique de l'hyperoside.

$A$ = absorbance à 410 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2010:1865**

# AUBÉPINE (FEUILLE ET FLEUR D'), EXTRAIT SEC DE

## Crataegi folii cum flore extractum siccum

DÉFINITION

Extrait sec produit à partir de *Feuille et fleur d'aubépine (1432).*

*Teneur* :

– pour les extraits aqueux : au minimum 2,5 pour cent de flavonoïdes totaux, exprimés en hypéroside ($C_{21}H_{20}O_{12}$ ; $M_r$ 464,4) (extrait desséché) ;

– pour les extraits hydroalcooliques : au minimum 6,0 pour cent de flavonoïdes totaux, exprimés en hypéroside ($C_{21}H_{20}O_{12}$ ; $M_r$ 464,4) (extrait desséché).

PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec de l'eau ou un solvant hydroalcoolique au moins équivalent en concentration à l'éthanol à 45 pour cent *V/V.*

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre brun clair ou brun-vert.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Mettez en suspension 0,2 g d'extrait à examiner dans 20 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R* et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 1 mg d'*acide chlorogénique R*, 2,5 mg d'*hypéroside R* et 2,5 mg de *rutine R* dans 10 mL de *méthanol R.*

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, méthyléthylcétone R, acétate d'éthyle R* (10:10:30:50 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL de solution à examiner et 10 µL de solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez sur la plaque encore chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R* ; pulvérisez ensuite une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R* ; laissez sécher à l'air pendant 30 min puis examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence jaune clair |
| Hypéroside : une bande de fluorescence orange-jaune | Une bande de fluorescence orange-jaune (hypéroside) |
| Acide chlorogénique : une bande de fluorescence bleu clair | Une bande de fluorescence bleu clair (acide chlorogénique) |
| | Une bande de fluorescence vert-jaune (vitexine-2''-rhamnoside) |
| Rutine : une bande de fluorescence orange-jaune | Une bande de fluorescence orange-jaune (rutine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 6,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 0,500 g d'extrait à examiner.

DOSAGE

*Solution mère.* Dissolvez 0,100 g d'extrait à examiner dans de l'*éthanol à 60 pour cent V/V R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Solution à examiner.* Introduisez 5,0 mL de solution mère dans un ballon à fond rond et évaporez à siccité sous pression réduite. Reprenez le résidu avec 8 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique anhydre R* et transvasez dans une fiole jaugée de 25 mL. Rincez le ballon à fond rond avec 3 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique anhydre R* ; transvasez ensuite dans la même fiole jaugée de 25 mL. Ajoutez 10,0 mL d'une solution contenant 25,0 g/L d'*acide borique R* et 20,0 g/L d'*acide oxalique R* dans de l'*acide formique anhydre R* puis complétez à 25,0 mL avec de l'*acide acétique anhydre R.*

*Liquide de compensation.* Introduisez 5,0 mL de solution mère dans un ballon à fond rond et évaporez à siccité sous pression réduite. Reprenez le résidu dans 8 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique anhydre R* et transvasez dans une fiole jaugée de 25 mL. Rincez le ballon à fond rond avec 3 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique anhydre R* ; transvasez ensuite dans la même fiole jaugée de 25 mL. Ajoutez 10,0 mL d'*acide formique anhydre R* puis complétez à 25,0 mL avec de l'*acide acétique anhydre R.*

Après 30 min, mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner à 410 nm, par rapport au liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en flavonoïdes totaux, exprimés en hypéroside, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 1,235}{m}$$

en prenant 405 comme valeur de l'absorbance spécifique de l'hyperoside.

$A$ = absorbance à 410 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2008:1153**

# BADIANE

## Anisi stellati fructus

DÉFINITION

Fruit composé séché d'*Illicium verum* Hooker fil.

*Teneur* :

– au minimum 70 mL/kg d'huile essentielle (drogue anhydre),

– au minimum 86,0 pour cent de *trans*-anéthole dans l'huile essentielle.

CARACTÈRES

Les carpelles du fruit sont bruns.

Odeur d'anéthole.

IDENTIFICATION

A. La badiane est généralement constituée de 8 follicules développés, disposés radialement autour d'une courte colonne centrale à extrémité tronquée, et mesurant chacun 12-22 mm de long et 6-12 mm de haut, contenant chacun 1 graine. Dans certains fruits, 1 à 2 follicules peuvent être manquants ; leur emplacement est alors bien visible. Chaque follicule a un profil en bateau ou en sabot, une face dorsale brun-gris avec des ornementations grossières et des faces latérales qui présentent les cicatrices des follicules voisins. La fente de déhiscence ventrale est ouverte sur au moins un des follicules, laissant apparaître une graine unique, lenticulaire, brillante, de couleur brun-rouge et d'un diamètre d'environ 8 mm. Les ornementations de la face dorsale ne sont pas visibles depuis la face ventrale. 1-3 follicules avortés peuvent parfois être présents. Des follicules, des pédoncules et des graines isolés peuvent être présents.

B. Réduisez la badiane en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-rouge. Examinez au microscope avec de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les caractères distinctifs suivants : cellules brunes de l'épicarpe, polygonales vues de face, à cuticule fortement striée et rares stomates de type anomocytique (*2.8.3*) ; fragments d'endocarpe à cellules palissadiques longues ; fragments de mésocarpe composés de grandes cellules parenchymateuses, vaisseaux, cellules oléifères et amas de slérites ; fragments de tégument de la graine avec des cellules jaunes, sclérifiées, fortement ponctuées, en palissade, d'une longueur pouvant atteindre 200 µm ; fragments de la colonne centrale et du pédoncule fructifère comportant des sclérites étoilées, à paroi fortement et irrégulièrement épaissie, d'environ 400 µm de long et 150 µm de large ; cristaux rhomboïdaux ou rectangulaires d'oxalate de calcium.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai B d'*Illicium anisatum* (= *I. religiosum*) et certaines autres espèces d'*Illicium*.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et la solution témoin. Par ailleurs, d'autres bandes de plus faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Acide caféique : une bande de fluorescence bleu clair | |
| Quercitroside : une bande de fluorescence jaune-brun | |
| | Une bande de fluorescence jaune-brun |
| _______ | _______ |
| | Une bande de fluorescence verdâtre |
| Hypéroside : une bande de fluorescence jaune-brun | Une bande de fluorescence jaune-brun |
| Acide chlorogénique : une bande de fluorescence bleu clair | |
| | Une bande de fluorescence verte |
| Rutine : une bande de fluorescence jaune-brun | Une bande de fluorescence jaune-brun |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

***Illicium anisatum* (= *I. religiosum*) et certaines autres espèces d'*Illicium*.**

A. La présence de fruit majoritairement à plus de 8 follicules ; de fruit de dimension inférieure à 2,5 cm ou plus de 3,5 cm ; de follicule ayant une fente de déhiscence bordée par un épaississement rejoignant le follicule voisin ou une ornementation de la face dorsale visible depuis la face ventrale ; de follicule se terminant par un bec fin après une ou plusieurs ondulations ou par un petit crochet se recourbant vers la face ventrale ; de follicule dont le profil s'inscrit dans un rectangle ; de pédoncule de plus de 5 cm de long ; de fruit dépourvu de graines ; de graines très plates ou, au contraire, presque sphériques signalent une falsification par *Illicium anisatum* ou par certaines autres espèces d'*Illicium*.

B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Chauffez à reflux, au bain-marie à 60 °C pendant 5 min, 2,0 g de badiane pulvérisée (355) (*2.9.12*) et 10 mL de *méthanol R*. Laissez refroidir et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 1 mg d'*acide caféique R*, 1 mg d'*acide chlorogénique R*, 2,5 mg de *quercitroside R*, 2,5 mg de *rutine R* et 2,5 mg d'*hypéroside R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM* (2-10 µm).

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, acide acétique glacial R, eau R, acétate d'éthyle R* (11:11:26:100 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 5 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 6 cm.

*Séchage* : dans un courant d'air chaud.

*Détection* : pulvérisez une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R* puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R*. Après 30 min, examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande de fluorescence jaune-brun, au même niveau ou au dessus de la bande due au quercitroside dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande de fluorescence jaune au même niveau ou au dessus de la bande due à l'acide caféique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Il n'est pas observé une bande de fluorescence jaune directement au dessus de la bande due à l'hypéroside dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

**Eau** (*2.2.13*) : au maximum 100 mL/kg, déterminé par entraînement sur 20,0 g de badiane pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 4,0 pour cent.

DOSAGE

**Huile essentielle**. Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez un ballon à fond rond de 250 mL et 100 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Immédiatement avant la détermination, réduisez 50,0 g de badiane en poudre grossière (1400) (*2.9.12*) et mélangez. Réduisez en poudre plus fine (710) (*2.9.12*) environ 10,0 g de ce mélange. Utilisez 2,50 g de poudre pour la détermination. Introduisez 0,50 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 2 h.

***trans*-Anéthole**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner.* Complétez le mélange d'huile essentielle et de *xylène R* obtenu dans le dosage de l'huile essentielle à 5,0 mL avec du *xylène R,* en rinçant l'appareil.

*Solution témoin.* A 1,0 mL de *xylène R*, ajoutez 20 µL d'*estragole R,* 20 mg d'*α-terpinéol R* et 60 µL d'*anéthole R.*

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 30 m, Ø = 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R.*

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R.*

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Rapport de division* : 1:100.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 5 | 60 |
| | 5 - 80 | 60 → 210 |
| | 80 - 95 | 210 |
| Chambre à injection | | 200 |
| Détecteur | | 220 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL.

*Ordre d'élution* : ordre indiqué pour la préparation de la solution témoin.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 5 entre les pics dus à l'estragole et à l'α-terpinéol.

A l'aide des temps de rétention déterminés avec le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez les composants de la solution témoin sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Calculez la teneur pour cent en *trans*-anéthole. Ne tenez compte ni des pics dus au solvant, ni des pics dont la surface est inférieure à 0,05 pour cent de celle du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

**01/2008:2108**
**corrigé 7.0**

# BADIANE (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Anisi stellati aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau à partir des fruits mûrs et secs de *Illicium verum* Hook.fil.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, incolore ou jaune clair.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Dissolvez 1 g d'huile essentielle de badiane dans du *toluène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin.* Dissolvez 10 µL de *linalol R,* 30 µL d'*aldéhyde anisique R* et 200 µL d'*anéthole R* dans du *toluène R* et complétez à 15 mL avec le même solvant. Prélevez 1 mL de cette solution et complétez à 5 mL avec du *toluène R.*

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (7:93 *V/V*).

*Dépôt* : 5 µL en bandes de 10 mm (pour les plaques CCM ordinaires) ou 2 µL en bandes de 10 mm (pour les plaques de fine granulométrie).

*Développement* : sur un parcours de 15 cm (pour les plaques ordinaires) ou sur un parcours de 6 cm (pour les plaques de fine granulométrie).

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande d'atténuation de fluorescence, pas complètement séparée |
| Anéthole : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence très intense (anéthole) |
| _______ | _______ |
| Aldéhyde anisique : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence (aldéhyde anisique) |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez du *réactif au 4-acétylbenzoate de méthyle R* et chauffez à 100-105 °C pendant 10 min ; examinez la plaque encore chaude à la lumière du jour dans les 10 min qui suivent.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande brun-violet, pas complètement séparée |
| Anéthole : une bande brune | Une bande brune très intense (anéthole) |
| _______ | _______ |
| Aldéhyde anisique : une bande jaune | Une bande jaune (aldéhyde anisique) |
| _______ | _______ |
| Linalol : une bande grise | Une bande grise (linalol) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,979 à 0,985.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,553 à 1,556.

**Point de solidification** (*2.2.18*) : 15 °C à 19 °C.

**Fenchone**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications de l'essai du profil chromatographique avec les modifications suivantes.

*Solution à examiner*. Dissolvez 400 µL d'huile essentielle de badiane dans 2,0 mL d'*hexane R*.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 10 µL de *fenchone R* dans de l'*hexane R* et complétez à 1,2 g avec le même solvant.

*Solution témoin (b)*. Prélevez 100 µL de solution témoin (a) et complétez à 100 mL avec de l'*hexane R*.

*Conformité du système* : solution témoin (b) :

– *rapport signal/bruit* : au minimum 10 pour le pic principal.

*Limite* :

– *fenchone* : au maximum 0,01 pour cent.

**2-Méthylbutyrate de pseudoisoeugényle**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications de l'essai du profil chromatographique avec les modifications suivantes.

*Solution à examiner*. L'huile essentielle de badiane.

*Solution témoin (a)*. Prélevez 10 mg de solution à examiner et complétez à 1,000 g avec de l'*hexane R*. Prélevez 0,5 mL de cette solution et complétez à 100 mL avec de l'*hexane R*.

*Solution témoin (b). 2-Méthylbutyrate de pseudoisoeugényle pour identification des pics SCR.*

*Conformité du système* :

– le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) est semblable au chromatogramme fourni avec le *2-méthylbutyrate de pseudoisoeugényle pour identification des pics SCR*,
– *rapport signal/bruit* : au minimum 10 pour le pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

*Limite* : localisez le pic dû au 2-méthylbutyrate de pseudoisoeugényle en comparant avec le chromatogramme fourni avec le *2-méthylbutyrate de pseudoisoeugényle pour identification des pics SCR*.

– *2-méthylbutyrate de pseudoisoeugényle* : au maximum 0,01 pour cent.

**Huiles grasses et huiles essentielles résinifiées** (*2.8.7*). L'huile essentielle de badiane satisfait à l'essai des huiles grasses et huiles essentielles résinifiées.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. Dissolvez 200 µL d'huile essentielle de badiane dans 1,0 mL d'*hexane R*.

*Solution témoin*. A 1,0 mL d'*hexane R*, ajoutez 20 µL de *linalol R*, 20 µL d'*estragole R*, 20 µL d'*α-terpinéol R*, 60 µL d'*anéthole R* et 30 µL d'*aldéhyde anisique R*.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 30 m, Ø = 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur du film 0,25 µm).

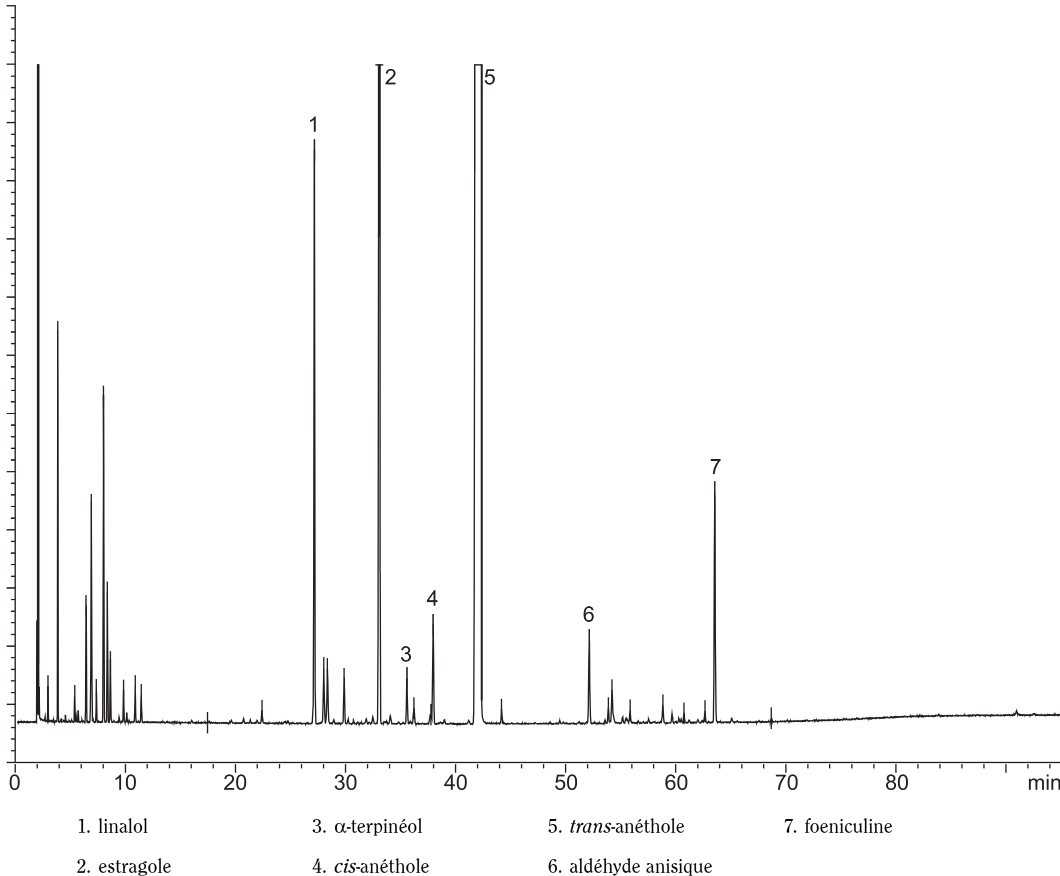
*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Rapport de division* : 1:100.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 5 | 60 |
| | 5 - 80 | 60 → 210 |
| | 80 - 95 | 210 |
| Chambre à injection | | 200 |
| Détecteur | | 220 |




1. linalol
2. estragole
3. α-terpinéol
4. *cis*-anéthole
5. *trans*-anéthole
6. aldéhyde anisique
7. foeniculine

Figure 2108.-1. – *Chromatogramme pour l'essai du profil chromatographique de l'huile essentielle de badiane*

Drogues végétales

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 0,2 μL.

*Ordre d'élution* : ordre indiqué pour la préparation de la solution témoin ; notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus à l'estragole et à l'α-terpinéol.

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez les composants de la solution témoin sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner et localisez le *cis*-anéthole et la foeniculine à l'aide du chromatogramme de la figure 2108.-1 (ne tenez pas compte du pic dû à l'hexane).

Déterminez la teneur pour cent de ces composants. Ces teneurs sont comprises entre les valeurs suivantes :

– *linalol* : 0,2 pour cent à 2,5 pour cent,
– *estragole* : 0,5 pour cent à 6,0 pour cent,
– *α-terpinéol* : au maximum 0,3 pour cent,
– *cis-anéthole* : 0,1 pour cent à 0,5 pour cent,
– *trans-anéthole* : 86 pour cent à 93 pour cent,
– *aldéhyde anisique* : 0,1 pour cent à 0,5 pour cent,
– *foeniculine* : 0,1 pour cent à 3,0 pour cent.

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

**01/2008:1858**
**corrigé 6.0**

# BALLOTE NOIRE

## Ballotae nigrae herba

DÉFINITION

Sommités fleuries séchées de *Ballota nigra* L.

*Teneur* : au minimum 1,5 pour cent de dérivés de l'acide *ortho*-dihydroxycinnamique totaux, exprimés en actéoside ($C_{29}H_{36}O_{15}$ ; $M_r$ 624,6) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Les tiges sont nettement quadrangulaires, elles présentent des stries longitudinales, vert foncé ou brun-rouge, plus ou moins pubescentes. Les feuilles sont vert-gris, pétiolées, recouvertes sur les 2 faces d'un abondant duvet blanchâtre ; le limbe ovale ou orbiculaire mesure 2-4 cm de large, il est irrégulièrement crénelé sur les bords, cunéiforme ou cordiforme à la base ; la nervation est pennée, saillante à la face inférieure, légèrement déprimée à la face supérieure. Les fleurs sont sessiles ou très brièvement pédicellées ; le calice est infundibuliforme fortement pubescent, avec 10 nervures saillantes et 5 dents ovaloïdes sensiblement égales ; la corolle est pourpre avec un tube légèrement plus court que celui du calice, elle est bilabiée avec une lèvre supérieure pubescente sur sa face externe, une lèvre inférieure trilobée et un lobe médian échancré.

B. Réduisez la ballote noire en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-gris et légèrement floconneuse. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : un grand nombre de longs poils tecteurs pluricellulaires unisériés, pouvant comprendre 4 cellules, ou davantage, à jonctions épaissies et renflées et parois légèrement lignifiées et ponctuées ; des poils sécréteurs en plus petit nombre, certains à pédicelle uni- ou pluricellulaire et tête globuleuse uni- ou bicellulaire, d'autres à pédicelle unicellulaire et tête pluricellulaire ; des fragments d'épiderme foliaire composé de cellules à parois sinueuses avec, pour ceux de l'épiderme inférieur, de nombreux stomates en majorité anomocytiques (*2.8.3*) mais parfois diacytiques ; des fragments d'épiderme de la corolle composé de cellules polygonales, ceux de l'épiderme interne papilleux ; des grains de pollen subsphériques à 3 pores et à exine lisse ; des groupes de cellules collenchymateuses et de vaisseaux lignifiés à épaississements en spirale à ponctuation aréolée, provenant de la tige.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 2 g de ballote noire pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 100 mL de *méthanol R*. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Laissez refroidir, puis filtrez. Evaporez le filtrat sous pression réduite jusqu'à un volume d'environ 10 mL.

*Solution témoin*. Dissolvez 2,5 mg de *rutine R* et 1 mg d'*acide chlorogénique R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, acide acétique glacial R, eau R, acétate d'éthyle R* (7,5:7,5:18:67 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 20 μL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L et de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R*. Laissez sécher dans un courant d'air chaud. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm après 30 min.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence rougeâtre |
| | Une bande de faible fluorescence jaune |
| | Une bande de fluorescence bleu clair (acide caféoylmalique) |
| | Une bande de fluorescence bleu-vert (actéoside) |
| | Une bande de fluorescence brun-jaune (lutéolol-7-lactate) |
| Acide chlorogénique : une bande de fluorescence bleu clair | |
| | Une bande de fluorescence bleu-vert (forsythoside B) |
| Rutine : une bande de fluorescence jaune-orange | 2 bandes de fluorescence bleu-vert (arénarioside) |
| | Une bande de fluorescence jaune (lutéolol-7-glucosyl-lactate) |
| | Une bande de faible fluorescence bleu-vert (ballotétroside) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de ballote noire pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 13,0 pour cent.

DOSAGE

*Solution mère*. Dans un ballon, placez 1,000 g de ballote noire pulvérisée (355) (*2.9.12*). Ajoutez 90 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R*. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Laissez refroidir et filtrez en recueillant le filtrat dans une fiole jaugée de 100 mL. Rincez le ballon et le filtre avec 10 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R*. Ajoutez les eaux de lavage au filtrat et complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 50 pour cent V/V R*.

*Solution à examiner*. Dans une fiole jaugée de 10 mL, introduisez successivement, en agitant après chaque ajout, 1,0 mL de solution mère, 2 mL d'*acide chlorhydrique 0,5 M*, 2 mL d'une solution contenant du *nitrite de sodium R* à

Drogues végétales

100 g/L et du *molybdate de sodium R* à 100 g/L, 2 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* et complétez à 10,0 mL avec de l'*eau R*.

*Liquide de compensation.* Dans une fiole jaugée de 10 mL, introduisez 1,0 mL de solution mère, 2 mL d'*acide chlorhydrique 0,5 M*, 2 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* et complétez à 10,0 mL avec de l'*eau R*.

Mesurez immédiatement l'absorbance (*2.2.25*) à 525 nm de la solution à examiner, par comparaison au liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en dérivés de l'acide *ortho*-dihydroxycinnamique totaux, exprimés en actéoside, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 1000}{185 \times m}$$

en prenant 185 comme valeur de l'absorbance spécifique de l'actéoside.

$A$ = absorbance à 525 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2008:1596**

# BAUME DE TOLU

## Balsamum tolutanum

DÉFINITION

Oléo-résine obtenue des troncs de *Myroxylon balsamum* (L.) Harms var. *balsamum*.

*Teneur* : 25,0 pour cent à 50,0 pour cent d'acides libres ou combinés, exprimés en acide cinnamique ($C_9H_8O_2$ ; $M_r$ 148,2) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

*Aspect* : masse brunâtre à brun-rouge, dure, friable et dont les éclats minces paraissent jaune-brun par transparence.

Odeur rappelant celle de la vanilline.

*Solubilité* : pratiquement insoluble dans l'eau, très soluble à facilement soluble dans l'alcool, pratiquement insoluble dans l'éther de pétrole.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Agitez 0,40 g de baume de Tolu fragmenté avec 10 mL de *chlorure de méthylène R* pendant 5 min, puis filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 50 mg de *cinnamate de benzyle R* dans du *chlorure de méthylène R*, ajoutez 50 µL de *benzoate de benzyle R* et complétez à 10 mL avec du *chlorure de méthylène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R*.

*Phase mobile* : *éther de pétrole R*, *toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 20 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez du *réactif à la vanilline R*. Chauffez la plaque à 100-105 °C pendant 5 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et la solution témoin. Par ailleurs, d'autres bandes colorées sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| Benzoate de benzyle : une bande bleu- gris | Une bande bleu-gris |
| Cinnamate de benzyle : une bande vert-gris | Une bande vert-gris |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Indice d'acide** : 100 à 160.

Dissolvez 0,5 g de baume de Tolu fragmenté dans 50 mL d'*alcool R*. Ajoutez 0,5 mL de *solution de bleu acide 93 R* et 5,0 mL d'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M*. Agitez énergiquement, puis titrez par de l'*acide chlorhydrique 0,5 M* jusqu'à virage du rouge-brun au vert-noir ($n_1$ mL d'*acide chlorhydrique 0,5 M*). Effectuez de la même manière un essai à blanc ($n_2$ mL d'*acide chlorhydrique 0,5 M*). Le calcul se fait de la même manière que pour la détermination de l'indice de saponification (*2.5.6*).

**Matières insolubles dans l'alcool** : au maximum 5 pour cent.

Chauffez à ébullition 2,0 g de baume de Tolu fragmenté avec 25 mL d'*alcool à 90 pour cent V/V R*, puis filtrez. Lavez le résidu avec de l'*alcool à 90 pour cent V/V R* bouillant jusqu'à extraction complète, puis séchez le résidu à 100-105 °C. Pesez le résidu.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 5,0 pour cent.

Etalez 2,000 g de baume de Tolu fragmenté à la surface d'un cristallisoir plat de 9 cm de diamètre et laissez sécher sous vide pendant 4 h.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 0,3 pour cent.

DOSAGE

Chauffez à reflux 1,500 g de baume de Tolu avec 25 mL d'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M* pendant 1 h. Evaporez l'éthanol, et chauffez le résidu avec 50 mL d'*eau R* jusqu'à répartition homogène. Après refroidissement, ajoutez 80 mL d'*eau R* et une solution de 1,5 g de *sulfate de magnésium R* dans 50 mL d'*eau R*. Mélangez, puis laissez reposer pendant 10 min. Filtrez sur filtre plissé et lavez le résidu avec 20 mL d'*eau R*. Réunissez le filtrat et les eaux de lavage, acidifiez par l'*acide chlorhydrique R* et extrayez 4 fois avec 40 mL d'*éther R*. Rejetez la phase aqueuse. Réunissez les extraits organiques et lavez-les 2 fois avec 20 mL et 3 fois avec 10 mL d'une solution de *bicarbonate de sodium R* à 50 g/L. Rejetez la phase éthérée. Réunissez les extraits aqueux, acidifiez avec l'*acide chlorhydrique R* et agitez-les 1 fois avec 30 mL, 2 fois avec 20 mL et 1 fois avec 10 mL de *chlorure de méthylène R*. Réunissez les extraits de chlorure de méthylène et desséchez sur du *sulfate de sodium anhydre R*. Filtrez sur filtre plissé et lavez le résidu avec 10 mL de *chlorure de méthylène R*. Concentrez par distillation les extraits réunis à 10 mL, puis éliminez le reste du chlorure de méthylène dans un courant d'air. Dissolvez à chaud le résidu dans 10 mL d'*alcool R* neutralisé au préalable en présence de *solution de rouge de phénol R*. Après refroidissement, titrez par l'*hydroxyde de sodium 0,1 M*, en utilisant le même indicateur.

1 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* correspond à 14,82 mg d'acides totaux, exprimés en acide cinnamique.

CONSERVATION

Ne pas conserver sous forme de poudre.

**01/2008:0754**

# BAUME DU PÉROU

## Balsamum peruvianum

DÉFINITION

Baume obtenu à partir du tronc scarifié à chaud de *Myroxylon balsamum* (L). Harms. var. *pereirae* (Royle) Harms.

*Teneur* : 45,0 pour cent *m/m* à 70,0 pour cent *m/m* d'esters, principalement constitués de benzoate de benzyle et de cinnamate de benzyle.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide visqueux brun foncé qui, examiné en couche mince, est transparent et brun-jaune. Le baume du Pérou n'est ni collant, ni siccatif et il ne file pas.

*Solubilité* : pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol anhydre, non miscible aux huiles grasses, à l'exception de l'huile de ricin.

IDENTIFICATION

A. Dissolvez 0,20 g de baume du Pérou dans 10 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Ajoutez 0,2 mL de *solution de chlorure ferrique R1*. Il se développe une coloration verte ou vert-jaune.

B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,5 g de baume du Pérou dans 10 mL d'*acétate d'éthyle R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 4 mg de *thymol R*, 30 mg de *cinnamate de benzyle R* et 80 µL de *benzoate de benzyle R* dans 5 mL d'*acétate d'éthyle R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice* $GF_{254}$ *pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, acétate d'éthyle R, hexane R* (0,5:10:90 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes de 20 mm sur 3 mm.

*Développement* : 2 fois sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm et marquez les zones d'atténuation de fluorescence.

*Résultats A* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente dans le tiers supérieur 2 bandes d'atténuation de fluorescence ; la plus élevée due au benzoate de benzyle, la bande inférieure due au cinnamate de benzyle. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente 2 bandes d'atténuation de fluorescence au même niveau et pratiquement de mêmes dimensions.

*Détection B* : pulvérisez 10 mL d'une solution récemment préparée d'*acide phosphomolybdique R* à 200 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*, pour une plaque de 200 mm de coté. Chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min en observant à la lumière du jour.

*Résultats B* : les bandes dues au benzoate de benzyle et au cinnamate de benzyle sont bleues sur fond jaune. Le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente, à peu près au milieu, une bande gris-violet (thymol). Dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, une bande bleue (nérolidol) est visible, juste au-dessous de la bande due au thymol dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Immédiatement au-dessous de la bande due au nérolidol, le chromatogramme ne présente pas de bande bleue correspondant à une zone d'atténuation de fluorescence lors de l'examen en lumière ultraviolette à 254 nm (colophane). Dans les parties supérieure et inférieure du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, d'autres bandes bleu pâle peuvent être observées.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 1,14 à 1,17.

**Indice de saponification** (*2.5.6*) : 230 à 255, déterminé sur le résidu obtenu dans le dosage.

**Baumes artificiels**. Agitez 0,20 g de baume du Pérou avec 6 mL d'*éther de pétrole R1*. La solution d'éther de pétrole est limpide et incolore et les parties insolubles du baume adhèrent totalement aux parois du tube à essai.

**Huiles grasses**. Agitez 1 g de baume du Pérou avec 3 mL d'une solution d'*hydrate de chloral R* à 1000 g/L. La solution obtenue est aussi limpide que la solution d'*hydrate de chloral R* à 1000 g/L.

**Térébenthine**. Evaporez à siccité 4 mL de la solution d'éther de pétrole obtenue dans l'essai des baumes artificiels. Le résidu ne dégage aucune odeur de térébenthine.

DOSAGE

Dans une ampoule à décantation, agitez vigoureusement 2,50 g de baume du Pérou avec 7,5 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* et 40 mL d'*éther exempt de peroxydes R* pendant 10 min. Séparez la phase inférieure et agitez-la avec 3 fois 15 mL d'*éther exempt de peroxydes R*. Réunissez les phases étherées, séchez-les sur 10 g de *sulfate de sodium anhydre R* et filtrez. Lavez le sulfate de sodium avec 2 fois 10 mL d'*éther exempt de peroxydes R*. Réunissez les phases étherées et évaporez-les à siccité. Séchez le résidu (esters) à 100-105 °C pendant 30 min et pesez.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

**04/2010:0221**

# BELLADONE (FEUILLE DE)

## Belladonnae folium

DÉFINITION

Feuilles seules ou mêlées de sommités florifères et, parfois, fructifères, séchées d'*Atropa belladonna* L.

*Teneur* : au minimum 0,30 pour cent d'alcaloïdes totaux, exprimés en hyoscyamine ($C_{17}H_{23}NO_3$ ; $M_r$ 289,4) (drogue desséchée). Les alcaloïdes sont principalement constitués d'hyoscyamine associée à de faibles quantités de scopolamine (hyoscine).

CARACTÈRES

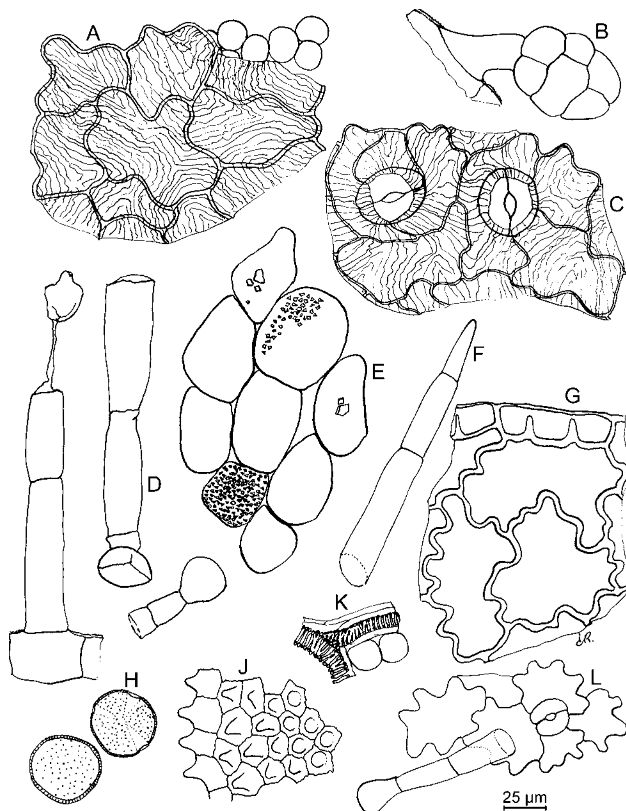
Odeur légèrement vireuse.

IDENTIFICATION

A. Les feuilles, vertes ou vert-brun, un peu plus sombres sur la face supérieure, sont souvent froissées et enroulées et partiellement agglomérées dans la drogue. La feuille est pétiolée, le limbe est acuminé, décurrent, et le bord est entier. Les tiges florifères sont aplaties et portent sur chaque noeud des feuilles géminées de taille inégale, à l'aisselle desquelles sont insérés des fleurs solitaires, ou parfois des fruits. Les fleurs ont un calice gamosépale et une corolle campanulée. La drogue peut contenir des fruits sous forme de baies globuleuses, vertes ou noir-brun, entourées d'un calice persistant aux lobes largement étalés.

B. Réduisez la feuille de belladone en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert foncé. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments du limbe formés de cellules épidermiques à parois sinueuses et à cuticule striée ; de nombreux stomates (anisocytiques et aussi quelques anomocytiques) (*2.8.3*) plus fréquents sur l'épiderme inférieur ; des poils tecteurs pluricellulaires, unisériés, à cuticule lisse, et des poils sécréteurs à tête unicellulaire et à pédicelle multicellulaire unisérié ou à tête pluricellulaire et à pédicelle unicellulaire ; des cellules du parenchyme parmi lesquelles des cellules arrondies contenant des microcristaux cunéiformes d'oxalate de calcium ; des vaisseaux épaissis annelés et spiralés. La feuille de belladone pulvérisée peut également présenter : des vaisseaux réticulés épaissis et des fibres provenant des tiges ; des grains de pollen subsphériques d'un diamètre de 40-50 µm, présentant 3 pores germinatifs, 3 sillons et une exine présentant de nombreuses ponctuations ; des fragments de corolle à épiderme papilleux

ou portant de nombreux poils tecteurs ou sécréteurs des types précédemment décrits ; des fragments de graines, jaune-brun, formés de cellules du tégument irrégulièrement sclérifiées et ponctuées.




A. Epiderme supérieur à cuticule striée, vu de face, et partie du parenchyme palissadique sous-jacent
B. Poil sécréteur à tête pluricellulaire et pied unicellulaire
C. Epiderme inférieur, vu de face, à cuticule striée et stomates anisocytiques
D. Poils sécréteurs à tête unicellulaire et pied pluricellulaire
E. Cellules de parenchyme dont certaines contiennent des microcristaux cunéiformes d'oxalate de calcium
F. Poil tecteur unisérié, pluricellulaire
G. Cellules du tégument de la graine à parois fortement sclérifiées
H. Grains de pollen
J. Epiderme papilleux de la corolle
K. Vaisseaux lignifiés
L. Epiderme de la corolle portant des poils sécréteurs à tête unicellulaire et pied pluricellulaire

Figure 0221.-1. – *Dessin pour l'identification de la feuille de belladone (voir Identification B)*

C. Agitez 1 g de feuille de belladone pulvérisée (180) (*2.9.12*) avec 10 mL d'*acide sulfurique 0,05 M* pendant 2 min et filtrez. Au filtrat, ajoutez 1 mL d'*ammoniaque concentrée R* et 5 mL d'*eau R*. Agitez ce mélange avec 15 mL d'*éther R*, avec précaution pour éviter la formation d'émulsion. Recueillez la phase éthérée et desséchez-la sur du *sulfate de sodium anhydre R*. Filtrez dans une capsule de porcelaine, puis évaporez l'éther. Ajoutez 0,5 mL d'*acide nitrique fumant R*, puis évaporez à siccité au bain-marie. Ajoutez 10 mL d'*acétone R* et, goutte à goutte, une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 30 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*. Il se développe une intense coloration violette.

D. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai Chromatographie.

*Résultats* : les bandes principales des chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner sont semblables quant à leur position, leur coloration et leurs dimensions aux bandes principales des chromatogrammes obtenus avec le même volume de solution témoin.

ESSAI

**Chromatographie**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 0,6 g de feuille de belladone pulvérisée (180) (*2.9.12*), ajoutez 15 mL d'*acide sulfurique 0,05 M*. Agitez pendant 15 min et filtrez. Lavez le filtre avec de l'*acide sulfurique 0,05 M* jusqu'à obtention de 20 mL de filtrat. Au filtrat, ajoutez 1 mL d'*ammoniaque concentrée R* et agitez avec 2 fois 10 mL d'*éther exempt de peroxydes R*. Séparez par centrifugation, si nécessaire. Réunissez les phases éthérées et desséchez-les sur du *sulfate de sodium anhydre R*, filtrez et évaporez le filtrat à siccité au bain-marie. Dissolvez le résidu dans 0,5 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 50 mg de *sulfate d'hyoscyamine R* dans 9 mL de *méthanol R*. Dissolvez 15 mg de *bromhydrate de scopolamine R* dans 10 mL de *méthanol R*. Mélangez 1,8 mL de la solution de bromhydrate de scopolamine et 8 mL de la solution de sulfate d'hyoscyamine.

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R*.

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, eau R, acétone R* (3:7:90 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL et 20 µL, en bandes de 20 mm sur 3 mm, distantes de 1 cm.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C pendant 15 min ; laissez refroidir.

*Détection A* : pulvérisez environ 10 mL de *solution d'iodobismuthate de potassium R2* pour une plaque de 200 mm de côté, jusqu'à apparition de bandes oranges ou brunes sur fond jaune.

*Résultats A* : les bandes des chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner sont semblables quant à leur position (hyoscyamine dans le tiers inférieur et scopolamine dans le tiers supérieur des chromatogrammes) et leur coloration à celles des chromatogrammes obtenus avec la solution témoin. La dimension des bandes des chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner n'est pas inférieure à celle des bandes correspondantes dans le chromatogramme obtenu avec le même volume de solution témoin. Des bandes secondaires de faible intensité peuvent apparaître, en particulier au centre du chromatogramme obtenu avec 20 µL de solution à examiner ou près du point de dépôt dans le chromatogramme obtenu avec 10 µL de solution à examiner.

*Détection B* : pulvérisez de la *solution de nitrite de sodium R* jusqu'à ce que la couche devienne transparente et examinez après 15 min.

*Résultats B* : la coloration des bandes dues à l'hyoscyamine dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner vire du brun au brun-rouge mais pas au bleu-gris (atropine) et les bandes secondaires éventuelles disparaissent.

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3 pour cent de tiges de diamètre supérieur à 5 mm.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 16,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 4,0 pour cent.

DOSAGE

a) Effectuez la perte à la dessiccation (*2.2.32*) par chauffage à l'étuve à 105 °C sur 2,000 g de feuille de belladone pulvérisée (180) (*2.9.12*).

b) Imbibez 10,00 g de feuille de belladone pulvérisée (180) (*2.9.12*) avec un mélange de 5 mL d'*ammoniaque R*, de 10 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et de 30 mL d'*éther exempt de peroxydes R*, puis mélangez soigneusement. Dans un percolateur approprié, introduisez le mélange, éventuellement à l'aide du mélange extracteur. Laissez macérer pendant 4 h. Lixiviez avec un mélange de 1 volume de *chloroforme R* et de 3 volumes d'*éther exempt de peroxydes R* jusqu'à extraction complète des alcaloïdes. Evaporez à siccité quelques millilitres s'écoulant du percolateur. Reprenez par de l'*acide*

Drogues végétales

*sulfurique 0,25 M* et vérifiez l'absence d'alcaloïdes avec la *solution de tétraiodomercurate de potassium R*. Réduisez le volume du percolat à environ 50 mL par distillation au bain-marie, puis introduisez-les dans une ampoule à décantation en rinçant avec de l'*éther exempt de peroxydes R*. Au liquide obtenu, ajoutez au moins 2,1 fois son volume d'*éther exempt de peroxydes R*, de façon à obtenir une phase de densité nettement inférieure à celle de l'eau. Agitez avec au moins 3 fois 20 mL d'*acide sulfurique 0,25 M*, séparez les 2 phases par centrifugation si nécessaire, puis versez les fractions acides dans une 2e ampoule à décantation. Alcalinisez par de l'*ammoniaque R* les solutions acides et agitez avec 3 fois 30 mL de *chloroforme R*. Réunissez les phases chloroformiques. Ajoutez 4 g de *sulfate de sodium anhydre R* et laissez en contact pendant 30 min en agitant de temps en temps. Recueillez le chloroforme et lavez le sulfate de sodium avec 3 fois 10 mL de *chloroforme R*. Réunissez les phases chloroformiques, évaporez à siccité au bain-marie et desséchez à l'étuve à 100-105 °C pendant 15 min. Dissolvez le résidu dans quelques millilitres de *chloroforme R*, ajoutez 20,0 mL d'*acide sulfurique 0,01 M* et éliminez le chloroforme par évaporation au bain-marie. Titrez l'excès d'acide par l'*hydroxyde de sodium 0,02 M* en présence d'*indicateur mixte au rouge de méthyle R*.

Calculez la teneur pour cent en alcaloïdes totaux, exprimés en hyoscyamine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{57,88 \times (20 - n)}{(100 - d) \times m}$$

$d$ = perte à la dessiccation, en pour cent,

$n$ = volume d'*hydroxyde de sodium 0,02 M*, en millilitres,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2009:1294**

# BELLADONE (FEUILLE DE), EXTRAIT SEC TITRÉ DE

## Belladonnae folii extractum siccum normatum

### DÉFINITION

Extrait sec titré obtenu à partir de *Feuille de belladone (0221)*.

*Teneur* : 0,95 pour cent à 1,05 pour cent d'alcaloïdes totaux, exprimés en hyoscyamine ($C_{17}H_{23}NO_3$ ; $M_r$ 289,4) (extrait desséché).

### PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec de l'éthanol à 70 pour cent *V/V*.

### CARACTÈRES

*Aspect* : poudre hygroscopique, brune ou verdâtre.

### IDENTIFICATION

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 1 g d'extrait à examiner, ajoutez 5,0 mL de *méthanol R*. Agitez pendant 2 min et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 1,0 mg d'*acide chlorogénique R* et 2,5 mg de *rutine R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, méthyléthylcétone R, acétate d'éthyle R* (10:10:30:50 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez sur la plaque encore chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R*, pulvérisez ensuite une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R*, laissez sécher à l'air pendant 30 min et examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner présentent, dans leur partie médiane, une bande de fluorescence bleu clair (acide chlorogénique) et, dans leur partie inférieure, une bande de fluorescence brun-jaune (rutine). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente également, légèrement au-dessus de la ligne de dépôt, une bande de fluorescence brun-jaune et directement au-dessus une bande de fluorescence jaune, et il présente une bande de fluorescence jaune ou brun-jaune entre la bande de la rutine et celle de l'acide chlorogénique. D'autres bandes peuvent être présentes.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de l'atropine.

*Résultats* : les bandes principales du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur position et leur coloration aux bandes principales du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

### ESSAI

**Atropine**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 0,20 g d'extrait à examiner, ajoutez 10,0 mL d'*acide sulfurique 0,05 M*, agitez pendant 2 min et filtrez. Ajoutez 1,0 mL d'*ammoniaque concentrée R* et agitez avec 2 fois 10 mL d'*éther exempt de peroxydes R*. Séparez par centrifugation si nécessaire. Réunissez les phases éthérées et séchez sur environ 2 g de *sulfate de sodium anhydre R*, puis filtrez et évaporez à siccité au bain-marie. Dissolvez le résidu dans 0,5 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 50 mg de *sulfate d'hyoscyamine R* dans 9 mL de *méthanol R*. Dissolvez 15 mg de *bromhydrate de scopolamine R* dans 10 mL de *méthanol R*. Mélangez 1,8 mL de la solution de bromhydrate de scopolamine et 8 mL de la solution de sulfate d'hyoscyamine.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, eau R, acétone R* (3:7:90 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C pendant 15 min et laissez refroidir.

*Détection A* : pulvérisez de la *solution d'iodobismuthate de potassium R2* jusqu'à obtention de bandes orangées ou brunes visibles sur fond jaune.

*Résultats A* : les bandes du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur position (hyoscyamine dans le tiers inférieur et scopolamine dans le tiers supérieur) et leur coloration à celles du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner peut également présenter d'autres faibles bandes.

*Détection B* : pulvérisez de la *solution de nitrite de sodium R* jusqu'à ce que la couche devienne transparente et examinez après 15 min.

*Résultats B* : les bandes dues à l'hyoscyamine dans les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et la solution témoin virent de l'orange au brun ou brun-rouge, mais pas au bleu-gris (atropine).

**Perte à la dessiccation** (*2.8.17*) : au maximum 5,0 pour cent.

**Contamination microbienne**

DGAT : critère d'acceptation $10^4$ UFC/g (*2.6.12*).

DMLT : critère d'acceptation $10^2$ UFC/g (*2.6.12*).

Absence d'*Escherichia coli* (*2.6.13*).

Absence de salmonelles (*2.6.13*).

DOSAGE

A chaque étape d'extraction il est nécessaire de vérifier que les alcaloïdes ont été complètement extraits. Si l'extraction est dans la phase organique, évaporez à siccité quelques millilitres de la dernière phase organique, reprenez par l'*acide sulfurique 0,25 M* et vérifiez l'absence d'alcaloïdes avec la *solution de tétraiodomercurate de potassium R*. Si l'extraction est dans la phase aqueuse acide, utilisez quelques millilitres de la dernière phase aqueuse acide et vérifiez l'absence d'alcaloïdes avec la *solution de tétraiodomercurate de potassium R*.

Dispersez 3,00 g d'extrait à examiner dans un mélange de 5 mL d'*ammoniaque R* et de 15 mL d'*eau R*. Agitez avec au moins 3 fois 40 mL d'un mélange de 1 volume de *chlorure de méthylène R* et de 3 volumes d'*éther exempt de peroxydes R* jusqu'à extraction complète des alcaloïdes. Réduisez le volume des phases organiques réunies à environ 50 mL par distillation au bain-marie, puis introduisez-les dans une ampoule à décantation en rinçant avec de l'*éther exempt de peroxydes R*. Au liquide obtenu, ajoutez au moins 2,1 fois son volume d'*éther exempt de peroxydes R*, de façon à obtenir une phase de densité nettement inférieure à celle de l'eau. Agitez la solution obtenue avec au moins 3 fois 20 mL d'*acide sulfurique 0,25 M* jusqu'à extraction complète des alcaloïdes. Séparez les phases par centrifugation si nécessaire, puis versez les solutions acides dans une 2[nde] ampoule à décantation. Alcalinisez par l'*ammoniaque R* les solutions acides et agitez avec au moins 3 fois 30 mL de *chlorure de méthylène R* jusqu'à extraction complète des alcaloïdes. Réunissez les phases organiques. Ajoutez 4 g de *sulfate de sodium anhydre R* et laissez en contact pendant 30 min en agitant de temps en temps. Décantez le chlorure de méthylène et lavez le sulfate de sodium avec 3 fois 10 mL de *chlorure de méthylène R*. Réunissez les phases organiques, évaporez à siccité au bain-marie et desséchez à l'étuve à 100-105 °C pendant 15 min. Dissolvez le résidu dans quelques millilitres de *chlorure de méthylène R*, évaporez à siccité au bain-marie et desséchez de nouveau le résidu à l'étuve à 100-105 °C pendant 15 min. Dissolvez le résidu dans quelques millilitres de *chlorure de méthylène R*. Ajoutez 20,0 mL d'*acide sulfurique 0,01 M* et éliminez le chlorure de méthylène par évaporation au bain-marie. Titrez l'excès d'acide par l'*hydroxyde de sodium 0,02 M* en présence d'*indicateur mixte au rouge de méthyle R*.

Calculez la teneur pour cent en alcaloïdes totaux, exprimés en hyoscyamine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{57,88 \times (20 - n)}{100 \times m}$$

$n$ = volume d'*hydroxyde de sodium 0,02 M* utilisé, en millilitres,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2008:1812**

# BELLADONE (FEUILLE DE), TEINTURE TITRÉE DE

## Belladonnae folii tinctura normata

DÉFINITION

Teinture produite à partir de *Feuille de Belladone (0221)*.

*Teneur* : 0,027 pour cent à 0,033 pour cent d'alcaloïdes totaux, exprimés en hyoscyamine ($C_{17}H_{23}NO_3$ ; $M_r$ 289,4). Parmi ces alcaloïdes, l'hyoscyamine nettement prépondérante est accompagnée de faibles quantités de scopolamine.

PRODUCTION

La teinture titrée de feuille de belladone est produite à partir de 1 partie de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*) et de 10 parties d'éthanol à 70 pour cent *V/V* par une méthode appropriée.

IDENTIFICATION

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Evaporez à siccité, dans un bain-marie à 40 °C sous pression réduite, 10,0 mL de teinture à examiner. Dissolvez le résidu dans 1,0 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 1,0 mg d'*acide chlorogénique R* et 2,5 mg de *rutine R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, méthyléthylcétone R, acétate d'éthyle R* (10:10:30:50 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 40 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez sur la plaque encore chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R* ; pulvérisez ensuite une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R* ; laissez sécher à l'air pendant 30 min puis examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Acide chlorogénique : une bande de fluorescence bleu clair | Une bande de fluorescence bleu clair (acide chlorogénique)<br>Une bande de fluorescence jaune ou brun-jaune |
| _______ | _______ |
| Rutine : une bande de fluorescence brun-jaune | Une bande de fluorescence gris-bleu<br>Une bande de fluorescence jaune<br>Une bande de fluorescence brun-jaune |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de l'atropine (détection A).

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. De faibles bandes secondaires peuvent apparaître, en particulier au centre du chromatogramme obtenu avec 40 µL de solution à examiner ou près du point de dépôt dans le chromatogramme obtenu avec 20 µL de solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Scopolamine : une bande orange-brun | Une bande orange-brun (scopolamine) |
| _______ | _______ |
| | Faibles bandes secondaires |
| _______ | _______ |
| Hyoscyamine : une bande orange-brun | Une bande orange-brun (hyoscyamine)<br>Faibles bandes secondaires |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

Drogues végétales

ESSAI

**Atropine**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 15,0 mL de teinture à examiner, ajoutez 15 mL d'*acide sulfurique 0,05 M* et filtrez. Au filtrat, ajoutez 1 mL d'*ammoniaque concentrée R* puis agitez avec 2 fois 10 mL d'*éther exempt de peroxydes R*. Séparez par centrifugation, si nécessaire. Réunissez les phases éthérées et séchez-les sur du *sulfate de sodium anhydre R*. Filtrez et évaporez le filtrat à siccité au bain-marie. Dissolvez le résidu dans 0,5 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 50 mg de *sulfate d'hyoscyamine R* dans 9 mL de *méthanol R*. Dissolvez 15 mg de *bromhydrate de scopolamine R* dans 10 mL de *méthanol R*. Mélangez 1,8 mL de la solution de bromhydrate de scopolamine et 8 mL de la solution de sulfate d'hyoscyamine.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, eau R, acétone R* (3:7:90 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL et 40 µL de chaque solution, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C pendant 15 min.

*Détection A* : pulvérisez de la *solution d'iodobismuthate de potassium R2*.

*Détection B* : pulvérisez de la *solution de nitrite de sodium R* jusqu'à ce que la plaque devienne transparente ; examinez après 15 min.

*Résultats B* : la coloration des bandes dues à l'hyoscyamine dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner vire du orange-brun au brun-rouge, mais pas au bleu-gris (atropine) et les bandes secondaires éventuelles disparaissent.

**Ethanol** (*2.9.10*) : 64 pour cent *V/V* à 69 pour cent *V/V*.

DOSAGE

Evaporez 50,0 g de teinture à examiner jusqu'à obtention d'un volume d'environ 10 mL. Transvasez quantitativement dans une ampoule à décantation à l'aide d'un volume minimal d'*alcool à 70 pour cent V/V R*. Ajoutez 5 mL d'*ammoniaque R* et 15 mL d'*eau R*. Agitez, à au moins 3 reprises, avec chaque fois 40 mL d'un mélange de 1 volume de *chlorure de méthylène R* et de 3 volumes d'*éther exempt de peroxydes R*, avec précaution pour éviter la formation d'émulsion, jusqu'à extraction complète des alcaloïdes. Réunissez les phases organiques et concentrez-les, jusqu'à obtention d'une volume d'environ 50 mL, par distillation au bain-marie. Transvasez quantitativement le liquide dans une ampoule à décantation en rinçant avec de l'*éther exempt de peroxydes R*. Au liquide obtenu, ajoutez au moins 2,1 fois son volume d'*éther exempt de peroxydes R* de façon à obtenir une phase de densité nettement inférieure à celle de l'eau. Agitez la solution obtenue à au moins 3 reprises avec 20 mL d'*acide sulfurique 0,25 M* jusqu'à extraction complète des alcaloïdes. Séparez les phases par centrifugation, si nécessaire, puis versez les phases aqueuses dans une deuxième ampoule à décantation. Alcalinisez les phases aqueuses réunies avec de l'*ammoniaque R*. Agitez, au moins à 3 reprises, avec chaque fois 30 mL de *chlorure de méthylène R* jusqu'à extraction complète des alcaloïdes. Réunissez les phases organiques, ajoutez 4 g de *sulfate de sodium anhydre R* et laissez en contact pendant 30 min en agitant de temps en temps. Filtrez après décantation. Rincez le résidu de sulfate de sodium à 3 reprises avec 10 mL de *chlorure de méthylène R*. Réunissez les phases organiques, évaporez à siccité au bain-marie et desséchez le résidu à l'étuve à 100-105 °C pendant 15 min. Dissolvez le résidu dans quelques millilitres de *chlorure de méthylène R*, évaporez à siccité au bain-marie et desséchez à nouveau le résidu à l'étuve à 100-105 °C pendant 15 min. Dissolvez le résidu dans quelques millilitres de *chlorure de méthylène R*. Ajoutez 20,0 mL d'*acide sulfurique 0,01 M* et éliminez le chlorure de méthylène par évaporation au bain-marie. Titrez l'excès d'acide par l'*hydroxyde de sodium 0,02 M* en présence d'*indicateur mixte au rouge de méthyle R*.

Calculez la teneur pour cent en alcaloïdes totaux, exprimés en hyoscyamine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{57,88 \times (20 - n)}{100 \times m}$$

$n$ = volume d'*hydroxyde de sodium 0,02 M* utilisé, en millilitres,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2008:0222**

# BELLADONE (POUDRE TITRÉE DE)

## Belladonnae pulvis normatus

DÉFINITION

Feuille de belladone pulvérisée (180) (*2.9.12*) ajustée, si nécessaire, avec du lactose en poudre ou une poudre de feuille de belladone à faible teneur en alcaloïdes.

*Teneur* : 0,28 pour cent à 0,32 pour cent d'alcaloïdes totaux, exprimés en hyoscyamine ($M_r$ 289,4) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Odeur légèrement vireuse.

IDENTIFICATION

A. La poudre est vert foncé. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de limbe formés de cellules épidermiques aux parois sinueuses, à cuticule striée ; de nombreux stomates sont présents surtout sur l'épiderme inférieur (anisocytiques et aussi quelques anomocytiques) (*2.8.3*) ; des poils tecteurs pluricellulaires, unisériés à cuticule lisse et des poils glanduleux à tête unicellulaire et à pédicelle multicellulaire unisérié ou à tête pluricellulaire et à pédicelle unicellulaire ; des cellules du parenchyme parmi lesquelles des cellules arrondies contenant des microcristaux cunéiformes d'oxalate de calcium ; des vaisseaux épaissis annelés et spiralés. La drogue pulvérisée peut présenter également : des vaisseaux réticulés épaissis et des fibres provenant des tiges ; des grains de pollen subsphériques d'un diamètre de 40-50 µm, présentant 3 pores germinatifs, 3 sillons et une exine percée de nombreuses ponctuations ; des fragments de la corolle aux épidermes papillés ou portant de nombreux poils tecteurs ou glanduleux des types précédemment décrits ; des fragments de semences, jaune-brun, formés de cellules du tégument irrégulièrement sclérifiées et ponctuées. Examinée dans le *glycérol à 85 pour cent R*, la poudre titrée de belladone peut présenter des cristaux de lactose.

B. Agitez 1 g de poudre titrée de belladone avec 10 mL d'*acide sulfurique 0,05 M* pendant 2 min et filtrez. Au filtrat, ajoutez 1 mL d'*ammoniaque concentrée R* et 5 mL d'*eau R*. Agitez avec 15 mL d'*éther R*, avec précaution pour éviter la formation d'émulsion. Recueillez la phase éthérée et desséchez-la sur du *sulfate de sodium anhydre R*. Filtrez dans une capsule de porcelaine, puis évaporez le solvant. Ajoutez 0,5 mL d'*acide nitrique fumant R*, puis évaporez au bain-marie à siccité. Ajoutez 10 mL d'*acétone R* et, goutte à goutte, une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 30 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*. Il se développe une intense coloration violette.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai Chromatographie.

*Résultats* : les bandes principales des chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner sont semblables quant à leur position, leur coloration et leurs dimensions aux bandes principales des chromatogrammes obtenus avec le même volume de la solution témoin.

ESSAI

**Chromatographie**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 0,6 g de poudre titrée de belladone, ajoutez 15 mL d'*acide sulfurique 0,05 M*. Agitez pendant 15 min et filtrez. Lavez le filtre avec de l'*acide sulfurique 0,05 M* jusqu'à obtention de 20 mL de filtrat. Au filtrat, ajoutez 1 mL d'*ammoniaque concentrée R* et agitez ensuite avec 2 fois 10 mL d'*éther exempt de peroxydes R*. Séparez par centrifugation, si nécessaire. Réunissez les phases éthérées et séchez-les sur du *sulfate de sodium anhydre R*. Filtrez et évaporez le filtrat au bain-marie à siccité. Dissolvez le résidu dans 0,5 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 50 mg de *sulfate d'hyoscyamine R* dans 9 mL de *méthanol R*. Dissolvez 15 mg de *bromhydrate de scopolamine R* dans 10 mL de *méthanol R*. A 8 mL de la solution de sulfate d'hyoscyamine, ajoutez 1,8 mL de la solution de bromhydrate de scopolamine.

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R.*

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, eau R, acétone R* (3:7:90 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL et 20 µL de chaque solution, en bandes de 20 mm sur 3 mm, à une distance de 1 cm.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C pendant 15 min, puis laissez refroidir.

*Détection A* : pulvérisez environ 10 mL de *solution d'iodobismuthate de potassium R2* pour une plaque de 200 mm de côté, jusqu'à apparition de bandes orangées ou brunes sur fond jaune.

*Résultats A* : les bandes des chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner sont semblables quant à leur position (hyoscyamine dans le tiers inférieur et scopolamine dans le tiers supérieur des chromatogrammes) et leur coloration à celles des chromatogrammes obtenus avec la solution témoin. La dimension des bandes des chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner n'est pas inférieure à celle des bandes correspondantes dans le chromatogramme obtenu avec le même volume de solution témoin. De faibles bandes secondaires peuvent apparaître, en particulier au centre du chromatogramme obtenu avec 20 µL de solution à examiner ou près du point de dépôt dans le chromatogramme obtenu avec 10 µL de solution à examiner.

*Détection B* : pulvérisez de la *solution de nitrite de sodium R* jusqu'à ce que la couche devienne transparente et examinez après 15 min.

*Résultats B* : les bandes dues à l'hyoscyamine dans les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et la solution témoin virent du brun au brun-rouge mais pas au bleu-gris (atropine) et les éventuelles bandes secondaires disparaissent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 5,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de poudre titrée de belladone.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 16,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 4,0 pour cent.

DOSAGE

a) Effectuez la perte à la dessiccation (*2.2.32*) par chauffage à l'étuve à 105 °C sur 2,000 g de poudre titrée de belladone.

b) Imbibez 10,00 g de poudre titrée de belladone avec un mélange de 5 mL d'*ammoniaque R*, de 10 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et de 30 mL d'*éther exempt de peroxydes R*. Mélangez soigneusement. Dans un percolateur approprié, introduisez la prise d'essai, éventuellement à l'aide du mélange extracteur. Laissez macérer pendant 4 h. Lixiviez avec un mélange de 1 volume de *chloroforme R* et de 3 volumes d'*éther exempt de peroxydes R* jusqu'à extraction complète des alcaloïdes. Evaporez à siccité quelques millilitres s'écoulant du percolateur, reprenez par de l'*acide sulfurique 0,25 M* et vérifiez l'absence d'alcaloïdes avec la *solution de tétraiodomercurate de potassium R*. Réduisez le volume du percolat à environ 50 mL par distillation au bain-marie, puis introduisez-les dans une ampoule à décantation en rinçant avec de l'*éther exempt de peroxydes R*. Au liquide obtenu, ajoutez au moins 2,1 fois son volume d'*éther exempt de peroxydes R*, de façon à obtenir une phase de densité nettement inférieure à celle de l'eau. Agitez avec au moins 3 fois 20 mL d'*acide sulfurique 0,25 M*. Séparez les 2 phases, par centrifugation si nécessaire, puis versez les fractions acides dans une 2nde ampoule à décantation. Alcalinisez par de l'*ammoniaque R* les solutions acides et agitez avec 3 fois 30 mL de *chloroforme R*. Réunissez les phases chloroformiques. Ajoutez 4 g de *sulfate de sodium anhydre R* et laissez en contact pendant 30 min en agitant de temps en temps. Recueillez le chloroforme et lavez le sulfate de sodium avec 3 fois 10 mL de *chloroforme R*. Réunissez les phases chloroformiques, évaporez à siccité au bain-marie et desséchez à l'étuve à 100-105 °C pendant 15 min. Dissolvez le résidu dans quelques millilitres de *chloroforme R*. Ajoutez 20,0 mL d'*acide sulfurique 0,01 M* et éliminez le chloroforme par évaporation au bain-marie. Titrez l'excès d'acide par l'*hydroxyde de sodium 0,02 M* en présence d'*indicateur mixte au rouge de méthyle R*.

Calculez la teneur pour cent en alcaloïdes totaux, exprimés en hyoscyamine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{57,88 \times (20 - n)}{(100 - d) \times m}$$

*d* = perte à la dessiccation, exprimée en pour cent,

*n* = volume d'*hydroxyde de sodium 0,02 M* utilisé, en millilitres,

*m* = masse de la prise d'essai, en grammes.

CONSERVATION

En récipient étanche.

**01/2008:1814**

# BENJOIN DE SUMATRA

## Benzoe sumatranus

DÉFINITION

Résine obtenue par incision du tronc de *Styrax benzoin* Dryander.

*Teneur* : 25,0 pour cent à 50,0 pour cent d'acides totaux, calculé en acide benzoïque ($C_7H_6O_2$ ; $M_r$ 122,1) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Le benjoin de Sumatra se présente sous forme de larmes rondes à ovoïdes, blanc crème qui peuvent être noyées dans une gangue brun-gris ou brun-rouge terne. Il est dur et cassant. La cassure est mate et irrégulière.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai B de *Styrax tonkinensis*.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes d'atténuation de fluorescence présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par

Drogues végétales

ailleurs, d'autres bandes faibles d'atténuation de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande foncée très intense |
| _______ | _______ |
| Cinnamate de méthyle : une bande foncée très intense | Une bande foncée |
| Acide benzoïque : une bande foncée | Une bande foncée de très faible intensité (acide benzoïque) |
| Acide cinnamique : une bande foncée intense | Une bande foncée très intense (acide cinnamique) |
| _______ | _______ |
| | Une bande foncée |
| | Une bande foncée très intense |
| | Une bande foncée |
| Vanilline : une bande foncée | Une bande foncée de très faible intensité (vanilline) |
| | Série de bandes non résolues dont 2 bandes foncées |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Dammar**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,2 g de benjoin de Sumatra en chauffant doucement dans 10 mL d'*éthanol à 90 pour cent V/V R* et centrifugez.

*Plaque* : *plaque à l'oxyde d'aluminium G pour CCM R*.

*Phase mobile* : *éther de pétrole R4, éther R* (40:60 *V/V*).

*Dépôt* : 5 µL.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5 min.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu ne présente aucune tache prononcée avec un $R_F$ entre 0,4 et 1,0.

***Styrax tonkinensis***

A. A 0,2 g de benjoin de Sumatra finement broyé, ajoutez 10 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Agitez énergiquement jusqu'à dissolution presque complète. Filtrez. Dans un tube à essai, introduisez 5 mL du filtrat et ajoutez 0,5 mL d'une solution de *chlorure ferrique R* à 50 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*. Il apparaît une coloration jaunâtre légèrement verte.

B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Traitez aux ultrasons 0,2 g de benjoin de Sumatra finement broyé dans 5 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Filtrez. Recueillez le filtrat.

*Solution témoin*. Dissolvez 20 mg d'*acide benzoïque R*, 10 mg d'*acide trans-cinnamique R*, 4 mg de *vanilline R* et 20 mg de *cinnamate de méthyle R* dans 10 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, éther isopropylique R, hexane R* (10:40:60 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 2 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 12 cm [ou 5 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente 2 bandes de faible intensité au même niveau que les bandes foncées dues à l'acide benzoïque et à la vanilline dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

**Matières insolubles dans l'éthanol** : au maximum 20,0 pour cent.

A 2,0 g de benjoin de Sumatra broyé, ajoutez 25 mL d'*éthanol à 90 pour cent V/V R*. Chauffez à ébullition jusqu'à dissolution presque complète. Filtrez sur filtre de verre fritté (16) (*2.1.2*) taré et lavez avec 3 fois 5 mL d'*éthanol à 90 pour cent V/V R* bouillant. Chauffez le filtre en verre et son contenu à l'étuve à 100-105 °C pendant 2 h. Laissez refroidir, puis pesez.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 5,0 pour cent, déterminé sous vide pendant 4 h sur 2,000 g de benjoin de Sumatra grossièrement broyé.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 2,0 pour cent.

DOSAGE

Dans une fiole de verre borosilicaté de 250 mL, introduisez 0,750 g de benjoin de Sumatra finement broyé et ajoutez 15,0 mL d'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M*. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Laissez refroidir et rincez le réfrigérant avec 20 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Titrez l'excès d'hydroxyde de potassium par l'*acide chlorhydrique 0,5 M*. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (*2.2.20*). Effectuez un titrage à blanc.

1 mL d'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M* correspond à 61,05 mg d'acide benzoïque ($C_7H_6O_2$).

**01/2008:1813**

# BENJOIN DE SUMATRA (TEINTURE DE)

## Benzois sumatrani tinctura

DÉFINITION

Teinture produite à partir du *Benjoin de Sumatra (1814)*.

*Teneur* : au minimum 4,0 pour cent *m/m* d'acides totaux calculés en acide benzoïque ($C_7H_6O_2$ ; $M_r$ 122,1).

PRODUCTION

La teinture de benjoin de Sumatra est produite à partir de 1 partie de drogue et de 5 parties d'éthanol (75 pour cent *V/V* à 96 pour cent *V/V*) par une méthode appropriée.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide jaune-orangé.

IDENTIFICATION

Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de la teinture de benjoin du Laos.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes d'atténuation de fluorescence présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes faibles d'atténuation de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| | Une bande foncée très intense |
| _______ | _______ |
| Cinnamate de méthyle : une bande foncée très intense | Une bande foncée |
| Acide benzoïque : une bande foncée | Une bande foncée de très faible intensité (acide benzoïque) |
| Acide cinnamique : une bande foncée intense | Une bande foncée très intense (acide cinnamique) |
| _______ | _______ |
| | Une bande foncée |
| | Une bande foncée très intense |
| | Une bande foncée |
| Vanilline : une bande foncée | Une bande foncée de très faible intensité (vanilline) |
| | Série de bandes non résolues foncées |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Teinture de benjoin du Laos**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* La teinture à examiner.

*Solution témoin.* Dissolvez 20 mg d'*acide benzoïque R*, 10 mg d'*acide trans-cinnamique R*, 4 mg de *vanilline R* et 20 mg de *cinnamate de méthyle R* dans 20 mL d'éthanol à la même concentration que celle utilisée pour la production de la teinture.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, éther isopropylique R, hexane R* (10:40:60 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL [ou 8 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 12 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bandes dues à l'acide benzoïque et à la vanilline plus intenses que les bandes correspondantes dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

**Ethanol** (*2.9.10*) : 95 pour cent à 105 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

DOSAGE

Dans une fiole de verre borosilicaté de 250 mL, introduisez 3,50 g de teinture à examiner et ajoutez 15,0 mL d'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M*. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Laissez refroidir et rincez le réfrigérant avec 20 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Titrez l'excès d'hydroxyde de potassium par l'*acide chlorhydrique 1 M*. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (*2.2.20*). Effectuez un titrage à blanc.

1 mL d'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M* correspond à 61,05 mg d'acide benzoïque ($C_7H_6O_2$).



**01/2008:2158**

# BENJOIN DU LAOS

## Benzoe tonkinensis

DÉFINITION

Résine obtenue par incision du tronc de *Styrax tonkinensis* (Pierre) Craib ex Hartwitch.

*Teneur* : 45,0 pour cent à 55,0 pour cent d'acides totaux, calculé en acide benzoïque ($C_7H_6O_2$ ; $M_r$ 122,1) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Odeur caractéristique de vanilline.

IDENTIFICATION

A. Le benjoin du Laos se présente en masses opaques, granuleuses, ovoides, aplaties (larmes), de quelques millimètres à 3 cm, séparées ou quelquefois légèrement agglomérées par une résine transparente brun-rouge. Les larmes individuelles sont blanc-jaune à rougeâtre à l'extérieur avec des cassures cireuses blanchâtres qui peuvent devenir rougeâtres après exposition à l'air.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai B de *Styrax benzoin*.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Cinnamate de méthyle : une bande d'atténuation de fluorescence très marquée | |
| Acide benzoïque : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence (acide benzoïque) |
| Acide cinnamique : une bande d'atténuation de fluorescence marquée | |
| _______ | _______ |
| | Une bande d'atténuation de fluorescence |
| | Une bande d'atténuation de fluorescence très marquée |
| Vanilline : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence (vanilline) |
| | Série de bandes non résolues dont une bande d'atténuation de fluorescence |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

***Styrax benzoin***

A. A 0,2 g de benjoin du Laos finement broyé, ajoutez 10 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Agitez énergiquement jusqu'à dissolution presque complète. Filtrez. Dans un tube à essai, introduisez 5 mL du filtrat et ajoutez 0,5 mL d'une solution de *chlorure ferrique R* à 50 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*. Il apparaît une coloration verte et non jaune.

B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Traitez aux ultrasons 0,2 g de benjoin du Laos finement broyé, dans 5 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Filtrez. Recueillez le filtrat.

*Solution témoin.* Dissolvez 20 mg d'*acide benzoïque R*, 10 mg d'*acide trans-cinnamique R*, 4 mg de *vanilline R* et 20 mg de *cinnamate de méthyle R* dans 10 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, éther isopropylique R, hexane R* (10:40:60 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 12 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente aucune bande au même niveau que la bande due à l'acide cinnamique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

**Matières insolubles dans l'éthanol** : au maximum 5 pour cent.

A 2 g de benjoin du Laos broyé, ajoutez 25 mL d'*éthanol à 90 pour cent V/V R*. Chauffez à ébullition jusqu'à dissolution presque complète. Filtrez sur filtre de verre fritté (16) (*2.1.2*) préalablement taré et lavez avec 3 fois 5 mL d'*éthanol à 90 pour cent V/V R* bouillant. Chauffez à l'étuve à 100-105 °C le filtre de verre et son contenu pendant 2 h. Pesez après refroidissement.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 5,0 pour cent, déterminé sous vide pendant 4 h sur 2,00 g de benjoin du Laos grossièrement broyé.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 2,0 pour cent.

DOSAGE

Dans une fiole de verre borosilicaté de 250 mL, introduisez 0,750 g de benjoin du Laos finement broyé et ajoutez 15,0 mL d'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M*. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Laissez refroidir et rincez le réfrigérant avec 20 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Titrez l'excès d'hydroxyde de potassium par l'*acide chlorhydrique 0,5 M*. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (*2.2.20*). Effectuez un titrage à blanc.

1 mL d'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M* correspond à 61,05 mg d'acide benzoïque ($C_7H_6O_2$).

**01/2008:2157**

# BENJOIN DU LAOS (TEINTURE DE)

## Benzois tonkinensis tinctura

DÉFINITION

Teinture produite à partir de *Benjoin du Laos (2158)*.

*Teneur* : au minimum 5,0 pour cent *m/m* d'acides totaux calculés en acide benzoïque ($C_7H_6O_2$ ; $M_r$ 122,1).

PRODUCTION

La teinture de benjoin du Laos est produite à partir de 1 partie de drogue et de 5 parties d'éthanol (75 pour cent *V/V* à 96 pour cent *V/V*) par une méthode appropriée.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide jaune-orangé.

La teinture à examiner présente une odeur caractéristique de vanilline.

IDENTIFICATION

A. Dans un tube à essai, introduisez 10 mL de teinture à examiner ; ajoutez 0,5 mL d'une solution de *chlorure ferrique R* à 50 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*. Il apparaît une coloration verte.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de la teinture de benjoin de Sumatra.

   *Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Cinnamate de méthyle : une bande d'atténuation de fluorescence très marquée | |
| Acide benzoïque : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence (acide benzoïque) |
| Acide cinnamique : une bande d'atténuation de fluorescence marquée | |
| _______ | _______ |
| | Une bande d'atténuation de fluorescence |
| | Une bande d'atténuation de fluorescence très marquée |
| Vanilline : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence (vanilline) |
| | Série de bandes non résolues dont une bande d'atténuation de fluorescence |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Teinture de benjoin de Sumatra**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. La teinture à examiner.

*Solution témoin*. Dissolvez 20 mg d'*acide benzoïque R*, 10 mg d'*acide trans-cinnamique R*, 4 mg de *vanilline R* et 20 mg de *cinnamate de méthyle R* dans 20 mL d'éthanol à la même concentration que celle utilisée dans la production de la teinture.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (5-40 μm) [ou *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (2-10 μm)].

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R*, *éther isopropylique R*, *hexane R* (10:40:60 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 μL [ou 8 μL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 12 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente aucune bande au même niveau que les bandes dues à l'acide cinnamique et au cinnamate de méthyle dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

**Ethanol** (*2.9.10*) : 95 pour cent à 105 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

DOSAGE

Dans une fiole de verre borosilicaté de 250 mL, introduisez 3,50 g de teinture à examiner ; ajoutez 15,0 mL d'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M*. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Laissez refroidir et rincez le réfrigérant avec 20 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Titrez l'excès d'hydroxyde de potassium par l'*acide chlorhydrique 1 M*. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (*2.2.20*). Effectuez un titrage à blanc.

1 mL d'*hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M* correspond à 61,05 mg d'acide benzoïque ($C_7H_6O_2$).

**01/2008:2384**

# BISTORTE (RHIZOME DE)

## Bistortae rhizoma

DÉFINITION

Rhizome, entier ou fragmenté, sans racines adventives, séché, de *Persicaria bistorta* (L.) Samp. (syn. *Polygonum bistorta* L.).

*Teneur* : au minimum 3,0 pour cent de tanins, exprimés en pyrogallol ($C_6H_6O_3$ ; $M_r$ 126,1) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Le rhizome entier mesure jusqu'à 13 cm de long et 2,5 cm de diamètre. Les racines dont les restes persistent ont une longueur qui n'excède pas 1 cm et un diamètre d'environ 1 mm.

IDENTIFICATION

A. Le rhizome entier, brun-rouge ou brun-noir, est épais, tortueux, et contourné sur lui-même. La surface externe est striée transversalement et marquée de taches noirâtres. Il est aplati et quelque peu déprimé sur la face supérieure, convexe sur la face inférieure. Il présente à sa surface les cicatrices des racines adventives. La cassure, beige rosé, présente une zone elliptique de ponctuations blanchâtres qui correspondent aux vaisseaux libéro-ligneux. Le rhizome de bistorte peut également se présenter en fragments plus ou moins cylindriques, d'environ 0,3 cm de diamètre et pouvant atteindre 1 cm de longueur, à surface externe brun-rouge, marquée de cicatrices des racines adventives et à cassure beige rosé.

B. Réduisez le rhizome de bistorte en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-rouge. Examinez au microscope en utilisant la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de parenchyme ; de très nombreuses macles d'oxalate de calcium libres ou incluses dans des cellules de parenchyme ; quelques vaisseaux lignifiés réticulés ; de rares fragments de suber. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente des grains d'amidon arrondis à ovoïdes, simples, d'un diamètre d'environ 10 µm.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de rhizome de bistorte pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL d'un mélange à volumes égaux d'*eau R* et de *méthanol R*, chauffez au bain-marie à environ 65 °C pendant 30 min et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *fructose R* et 5 mg de *catéchine R* dans 5 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm).

*Phase mobile* : *eau R, acide formique anhydre R, acétate d'éthyle R* (5:10:85 *V/V/V*).

*Dépôt* : 2 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 7 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5 min ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme de la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Catéchine : une bande brune | Une bande brune (catéchine) |
| _______ | _______ |
| | Une bande brune |
| | Une bande violette |
| | Une bande brune |
| | Une bande orangée |
| _______ | _______ |
| Fructose : une bande verte | Une bande verte (fructose) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

***Paris polyphylla* ou *Paris quadrifolia***. Examinez le rhizome de bistorte pulvérisé (355) (*2.9.12*) au microscope en utilisant la *solution d'hydrate de chloral R*. La présence de raphides d'oxalate de calcium en paquets ou libres indique la falsification par le rhizome de *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz ou *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara ou *Paris quadrifolia* L.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de rhizome de bistorte pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 9,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 1,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des tanins dans les drogues végétales (*2.8.14*). Utilisez 1,000 g de rhizome de bistorte pulvérisé (180) (*2.9.12*).

**01/2008:1396**

# BOLDO (FEUILLE DE)

## Boldi folium

DÉFINITION

Feuille entière ou fragmentée séchée de *Peumus boldus* Molina.

*Teneur* : au minimum 0,1 pour cent d'alcaloïdes totaux, exprimés en boldine ($C_{19}H_{21}NO_4$ ; $M_r$ 327,4) (drogue anhydre).

CARACTÈRES

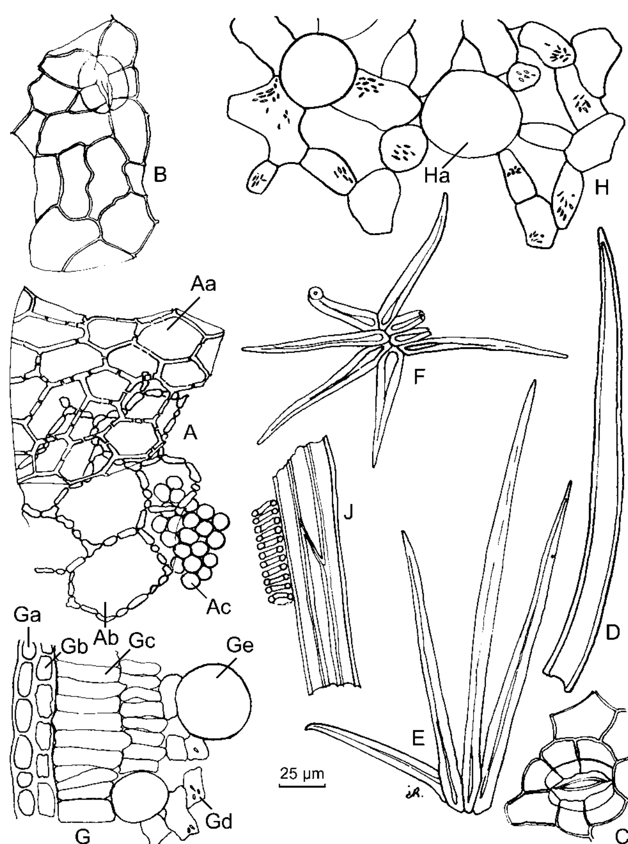
Odeur caractéristique, surtout lorsque la feuille de boldo est froissée.

IDENTIFICATION

A. La feuille, ovale ou elliptique, a généralement une longueur de 5 cm ; elle possède un court pétiole, un apex obtus ou légèrement émarginé ou mucroné et une base symétrique et arrondie, un bord entier légèrement ondulé, épaissi et plus ou moins révoluté. Le limbe gris-vert est épais, coriace et cassant. La face supérieure est rugueuse et présente de nombreuses petites protubérances ainsi qu'une nervation déprimée. La face inférieure, finement pubescente, présente des protubérances moins marquées et une nervation pennée à nervures saillantes.

B. Réduisez la feuille de boldo en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est gris-vert. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente des fragments de l'épiderme de la face supérieure et de l'hypoderme sous-jacent, à parois cellulaires droites ou légèrement sinueuses, épaissies en chapelet ; des fragments de l'épiderme de la face inférieure comportant de nombreux stomates entourés de 4-7 cellules annexes ; des poils tecteurs unicellulaires simples, bifurqués ou en bouquets à parois plus ou moins épaisses et lignifiées ; des fragments du limbe présentant 2 assises palissadiques ; des débris de parenchyme lacuneux renfermant de nombreuses cellules à huile essentielle arrondies de grande taille ; des fragments de parenchyme contenant de fins cristaux en aiguilles, des fibres à paroi épaisse et des cellules parenchymateuses lignifiées et ponctuées associées à du tissu vasculaire provenant des nervures.

Drogues végétales




A. Fragment de limbe, vu de face, montrant l'épiderme supérieur (Aa), l'hypoderme à cellules à paroi épaissie en chapelet (Ab) et le parenchyme palissadique (Ac)

B et C. Epiderme inférieur comportant des stomates entourés de 4-7 cellules annexes

D. Poil tecteur unicellulaire, simple

E et F. Poil tecteur unicellulaire, en bouquet

G. Fragment de limbe, vu en section transversale, montrant l'épiderme supérieur (Ga), l'hypoderme (Gb), le parenchyme palissadique (Gc) et le parenchyme lacuneux (Gd) contenant des cellules à huile essentielle (Ge)

H. Parenchyme lacuneux à cellules contenant de fins cristaux et à cellules à huile essentielle (Ha)

J. Vaisseaux de bois accompagnés de fibres

Figure 1396.-1. – *Dessin pour l'identification de la feuille de boldo (voir Identification B)*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Mélangez 1,5 g de feuille de boldo pulvérisée (355) (*2.9.12*) et 5 mL de *méthanol R* et traitez aux ultrasons pendant 10 min. Filtrez le surnageant sur une colonne de *cellulose pour chromatographie R1* de 3 cm × 0,5 cm. Utilisez le premier millilitre de l'éluat comme solution à examiner.

*Solution témoin*. Dissolvez 2 mg de *boldine R* et 10 mg de *bromhydrate de scopolamine R* dans 5 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *diéthylamine R, méthanol R, toluène R* (10:10:80 *V/V/V*).

*Dépôt* : 40 µL [ou 6 µL] de solution à examiner et 20 µL [ou 2 µL] de solution témoin, en bandes de 15 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'iodobismuthate de potassium R2,* laissez séchez à l'air pendant 5 min et pulvérisez de la *solution de nitrite de sodium R*. Examinez à la lumière du jour après 30 min.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| | Une bande brun-jaune |
| Scopolamine : une bande brun pâle | |
| | Une bande jaune |
| | Une bande brune |
| | Une bande brune |
| ——— | ——— |
| Boldine : une bande brune | Une bande brune (boldine) |
| | Plusieurs bandes |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Huile essentielle** (*2.8.12*) : au maximum 40 mL/kg (drogue anhydre).

Utilisez 10,0 g de feuille de boldo récemment fragmentée, un ballon de 1000 mL et 300 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 3 h.

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 4 pour cent de rameaux et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Eau** (*2.2.13*) : au maximum 100 mL/kg, déterminé par entraînement sur 20,0 g de feuille de boldo pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 13,0 pour cent.

DOSAGE

**Alcaloïdes**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* A 1,000 g de feuille de boldo pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 50 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*. Agitez dans un bain-marie à 80 °C pendant 30 min. Filtrez, reprenez le résidu par 50 mL d'*acide chlorhydrique dilué R,* puis agitez dans un bain-marie à 80 °C pendant 30 min. Filtrez, renouvelez une fois l'opération sur le résidu obtenu. Filtrez. Réunissez les filtrats refroidis et agitez-les avec 100 mL d'un mélange à volumes égaux d'*acétate d'éthyle R* et d'*hexane R*. Eliminez la phase organique. Ajustez la phase aqueuse à pH 9,5 avec de l'*ammoniaque diluée R1.* Agitez successivement avec 100 mL, 50 mL et 50 mL de *chlorure de méthylène R,* puis réunissez les phases inférieures et évaporez à siccité sous pression réduite. Dissolvez le résidu dans la phase mobile et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin.* Dissolvez 12 mg de *boldine SCR* dans la phase mobile et complétez à 100,0 mL avec la phase mobile. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Solution A.* Mélangez 0,2 mL de *diéthylamine R* et 99,8 mL d'*acétonitrile R.*

*Solution B.* Mélangez 0,2 mL de *diéthylamine R* et 99,8 mL d'*eau R* puis ajustez à pH 3 avec de l'*acide formique anhydre R.*

*Phase mobile* : solution A, solution B (16:84 *V/V*).

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 304 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Rétention relative* par rapport à la boldine (temps de rétention = environ 6 min) : isoboldine = environ 0,9 ; *N*-oxyde d'isocorydine = environ 1,8 ; laurotétanine = environ 2,2 ; isocorydine = environ 2,8 ; *N*-méthyllaurotétanine = environ 3,2. Des pics supplémentaires peuvent être présents.

*Conformité du système* : solution à examiner :

– *résolution* : au minimum 1 entre les pics dus à l'isoboldine et à la boldine.

Calculez la teneur pour cent en alcaloïdes totaux exprimés en boldine à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{(\sum A_1) \times m_2 \times p}{A_2 \times m_1 \times 100}$$

$m_1$ = masse de la prise d'essai, en grammes,

$m_2$ = masse de *boldine SCR* dans la solution témoin, en grammes,

$\Sigma A_1$ = somme des surfaces des pics dus aux 6 alcaloïdes identifiés dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à la boldine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$p$ = teneur pour cent en boldine dans la *boldine SCR*.

**04/2008:1816**

# BOLDO (FEUILLE DE), EXTRAIT SEC DE

## Boldi folii extractum siccum

DÉFINITION

Extrait produit à partir de *Feuille de Boldo (1396).*

*Teneur* :

– *pour les extraits aqueux* : au minimum 0,5 pour cent d'alcaloïdes totaux, exprimés en boldine ($C_{19}H_{21}NO_4$ ; $M_r$ 327,4) (extrait desséché) ;

– *pour les extraits hydroalcooliques* : au minimum 1,0 pour cent d'alcaloïdes totaux, exprimés en boldine ($C_{19}H_{21}NO_4$ ; $M_r$ 327,4) (extrait desséché).

PRODUCTION

L'extrait est obtenu à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, en utilisant de l'eau chaude au minimum à 65 °C ou un solvant hydroalcoolique équivalent en concentration à l'éthanol à 45-75 pour cent *V/V*.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre hygroscopique, brune ou brun-vert.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 0,5 g d'extrait à examiner, ajoutez 1 mL d'*acide chlorhydrique R* et 20 mL d'*eau R*. Traitez aux ultrasons pendant 10 min. Transvasez le liquide dans une ampoule à décantation et alcalinisez avec 2 mL d'*ammoniaque diluée R1*. Agitez avec 2 fois 20 mL de *chlorure de méthylène R*. Réunissez les phases organiques et évaporez-les à siccité. Dissolvez le résidu dans 1 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 2 mg de *boldine R* et 10 mg de *bromhydrate de scopolamine R* dans 5 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *diéthylamine R, méthanol R, toluène R* (10:10:80 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL [ou 3 µL], en bandes de 15 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'iodobismuthate de potassium R2*, laissez sécher à l'air pendant 5 min et pulvérisez de la *solution de nitrite de sodium R*. Examinez à la lumière du jour après 30 min.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de plus faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| | Une bande brun-jaune |
| | Une bande jaune-orange |
| Scopolamine : une bande brun pâle | |
| | Une bande orange |
| | Une bande orange |
| _______ | _______ |
| Boldine : une bande brune | Une bande brune (boldine) |
| | Plusieurs bandes oranges |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* A 1,000 g d'extrait à examiner, ajoutez 50 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*, puis traitez aux ultrasons pendant 10 min. Transvasez dans une ampoule à décantation et lavez avec 10 mL d'un mélange à volumes égaux d'*acétate d'éthyle R* et d'*hexane R*. Ajustez le pH de la phase aqueuse à 9,5 avec de l'*ammoniaque diluée R1*. Après refroidissement, agitez successivement avec 100 mL, 50 mL et à nouveau 50 mL de *chlorure de méthylène R*, en évitant la formation d'émulsion. Réunissez les phases inférieures et évaporez-les à siccité sous pression réduite. Dissolvez le résidu dans la phase mobile. Introduisez la solution dans un ballon jaugé, rincez et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin.* Dissolvez 12,0 mg de *boldine SCR* dans la phase mobile et complétez à 100,0 mL avec la phase mobile.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,

– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Solution A.* Mélangez 0,2 mL de *diéthylamine R* et 99,8 mL d'*acétonitrile R*.

*Solution B.* Mélangez 0,2 mL de *diéthylamine R* et 99,8 mL d'*eau R* puis ajustez à pH 3 avec de l'*acide formique anhydre R*.

*Phase mobile* : solution A, solution B (16:84 *V/V*).

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 304 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Rétention relative* par rapport à la boldine (temps de rétention = environ 6 min) : isoboldine = environ 0,9 ; *N*-oxyde d'isocorydine = environ 1,8 ; laurotétanine = environ 2,2 ; isocorydine = environ 2,8 ; *N*-méthyllaurotétanine = environ 3,2. Des pics supplémentaires peuvent être présents.

*Conformité du système* : solution à examiner :

– *résolution* : au minimum 1,0 entre les pics dus à l'isoboldine et à la boldine.

Drogues végétales

Calculez la teneur pour cent en alcaloïdes totaux, exprimés en boldine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{(\sum A_1) \times m_2 \times p}{A_2 \times m_1 \times 10}$$

$\Sigma A_1$ = somme des surfaces des pics dus aux 6 alcaloïdes identifiés dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à la boldine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse d'extrait à examiner, utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse de *boldine SCR* utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en boldine de la *boldine SCR*.

**01/2011:1853**

# BOUILLON BLANC (FLEUR DE)

## Verbasci flos

DÉFINITION

Fleur séchée, réduite à la corolle et à l'androcée, de *Verbascum thapsus* L., de *V. densiflorum* Bertol. (*V. thapsiforme* Schrad), et de *V. phlomoides* L.

IDENTIFICATION

A. La corolle de *V. thapsus* est jaune pâle, jaune ou brune, infundibuliforme, d'un diamètre d'environ 20 mm, et comporte 5 lobes étalés légèrement inégaux. Ces lobes sont fortement velus sur la face extérieure, glabres sur la face inférieure qui présente un fin réseau de nervures brun clair. Les étamines alternent avec les pétales et sont au nombre de 5 (2 longues à filet glabre, les 3 autres plus courtes à filet fortement tomenteux). Les anthères sont insérés transversalement. Chez *V. phlomoides*, la corolle, jaune vif ou orange, peut atteindre 30 mm de diamètre et les anthères sont insérés obliquement aux filets. La corolle de *V. densiflorum*, d'environ 30 mm de diamètre, est presque plate et nettement divisée en 5 lobes légèrement inégaux, aux extrémités arrondies.

B. Réduisez la fleur de bouillon blanc en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune ou brun-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants (figure 1853.-1) : de nombreux poils tecteurs, entiers ou fragmentés, provenant de la corolle, pluricellulaires, en candélabre, avec un axe central unisérié d'où naissent des ramifications cellulaires verticillées au niveau des parois transversales et à l'extrémité, vus de profil [A, B] ou de face [F] ; des poils tecteurs provenant des filets staminaux [G], unicellulaires, longs, tubulaires, à paroi fine et à surface nettement granuleuse ou striée, à extrémité effilée [Ga] ou parfois en massue [Gb, Gc] ; de nombreux grains de pollen ovoïdes à 3 pores et à exine finement granuleuse [D] ; des fragments de l'assise fibreuse de l'anthère, à paroi épaissie, donnant une forme étoilée caractéristique [C] ; des fragments de pétales jaunes, vus de face [E], dont les cellules épidermiques sont polygonales et isodiamétriques [Ea] ; des fragments du mésophylle sous-jacent constitué de cellules parenchymateuses irrégulières [Eb], parfois accompagnés de vaisseaux spiralés [Ec].

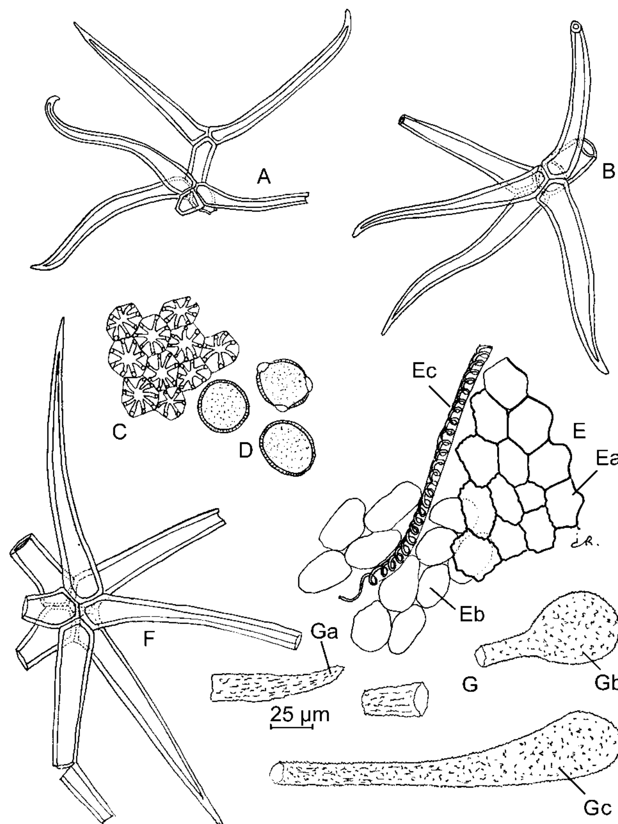



Figure 1853.-1.– *Dessin pour l'identification B de la fleur de bouillon blanc pulvérisée*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Chauffez dans un bain-marie à 60 °C pendant 5 min, en agitant, 1,0 g de fleur de bouillon blanc (355) (*2.9.12*) dans 10 mL de *méthanol R*. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 1 mg d'*acide caféique R*, 2,5 mg d'*hypéroside R* et 2,5 mg de *rutine R* dans du *méthanol R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, méthyléthylcétone R, acétate d'éthyle R* (10:10:30:50 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL de la solution témoin et 30 µL de la solution à examiner, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez la plaque encore chaude avec une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R*, puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R*. Laissez sécher à l'air pendant 30 min et examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Drogues végétales

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence jaune ou vert-jaune |
| Acide caféique : une bande de fluorescence bleu-vert | |
| | Une bande de fluorescence bleuâtre |
| | Une bande de fluorescence verdâtre |
| | Une bande de fluorescence vert-jaune |
| | Une bande de fluorescence bleuâtre |
| Hypéroside : une bande de fluorescence brun-jaune | |
| | Une bande de fluorescence verdâtre |
| Rutine : une bande de fluorescence brun-jaune | |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

D. Chauffez à ébullition 1,0 g de fleur de bouillon blanc pulvérisée (355) (*2.9.12*) avec 15 mL d'*eau R* pendant 1 min. Filtrez. Ajoutez 1 mL d'*acide chlorhydrique R* et chauffez à ébullition pendant 1 min. Il se développe une coloration bleu-vert et, après quelques minutes, il apparaît un trouble, puis un précipité noirâtre (iridoïdes).

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent de pétales bruns et au maximum 2 pour cent de fragments du calice et d'autres éléments étrangers, déterminé sur 20 g.

**Indice de gonflement** (*2.8.4*) : au minimum 9, déterminé sur la fleur de bouillon blanc pulvérisée (710) (*2.9.12*), humidifiée avec 2 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de fleur de bouillon blanc pulvérisée (710) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 6,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 2,0 pour cent.

CONSERVATION

En récipient étanche.

**07/2008:1174**

# BOULEAU (FEUILLE DE)

## Betulae folium

DÉFINITION

Feuille, entière ou fragmentée, séchée, de *Betula pendula* Roth et/ou de *Betula pubescens* Ehrh. ou des hybrides des 2 espèces.

*Teneur* : au minimum 1,5 pour cent de flavonoïdes, exprimés en hypéroside ($C_{21}H_{20}O_{12}$ ; $M_r$ 464,4) (drogue desséchée).

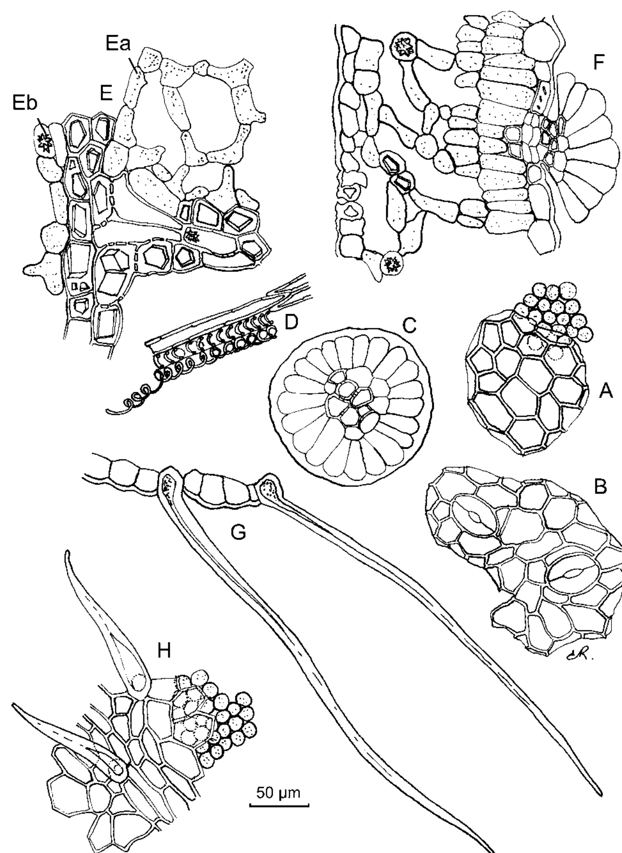
IDENTIFICATION

A. La feuille des 2 espèces est vert foncé à la face supérieure, et d'un gris-vert plus clair à la face inférieure. Elle présente une nervation réticulée serrée et caractéristique. Les nervures sont brun clair ou sensiblement blanches.

La feuille de *B. pendula* est glabre et présente sur les 2 faces des ponctuations serrées des glandes. La feuille de *B. pendula* mesure 3-7 cm de long et 2-5 cm de large ; le pétiole est long, le limbe, à denture double, est triangulaire ou rhomboïdal, largement cunéiforme ou tronqué à la base. Les angles latéraux sont peu ou pas arrondis, la pointe est longue et acuminée.

La feuille de *B. pubescens* porte peu de poils glanduleux et est légèrement velue sur les 2 faces. La face inférieure présente de petits faisceaux de poils gris-jaune dans les angles des nervures. La feuille de *B. pubescens*, légèrement plus petite, est de forme ovale ou rhomboïdale plus arrondie. Elle est plus grossièrement et plus régulièrement dentée. Sa pointe n'est ni allongée, ni acuminée.

B. Réduisez la feuille de bouleau en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est gris-vert. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : de nombreux fragments du limbe avec cellules épidermiques à bords droits, ainsi que des cellules de l'épiderme inférieur entourant des stomates de type anomocytique (*2.8.3*) ; des glandes peltées de grande taille, mesurant le plus souvent 100-120 µm, à la surface des épidermes supérieur et inférieur, des fragments du mésophylle renfermant des macles d'oxalate de calcium, des files de cellules cristallifères accompagnant les fragments des faisceaux libéro-ligneux et les fibres sclérenchymateuses. En présence de *B. pubescens*, la poudre contient en outre des poils tecteurs, unicellulaires, à parois très épaissies, d'environ 80-600 µm de longueur, le plus souvent 100-200 µm.




| | |
|---|---|
| A. Epiderme supérieur du limbe accompagné de parenchyme palissadique | E. Files de cellules contenant des cristaux prismatiques d'oxalte de calcium, parenchyme lacuneux (Ea) et cellules à macle d'oxalate de calcium (Eb) |
| B. Epiderme inférieur du limbe et stomates anomocytiques | F. Section transversale du limbe, montrant une glande peltée vue de profil |
| C. Glande peltée, vue de face | G. Poils tecteurs sur le bord du limbe (*B. pubescens*) |
| D. Vaisseaux de bois accompagnés de fibres sclérenchymateuses | H. Poils tecteurs sur l'épiderme supérieur du limbe (*B. pubescens*) |

Figure 1174.-1. – *Dessin pour l'identification de la feuille de bouleau (voir Identification B)*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Agitez 1 g de feuille de bouleau pulvérisée (355) (*2.9.12*) avec 10 mL de *méthanol R*. Chauffez dans un bain-marie à 60 °C pendant 5 min. Après refroidissement, filtrez la solution.

*Solution témoin.* Dissolvez 1 mg d'*acide chlorogénique R*, 1 mg d'*acide caféique R*, 2,5 mg d'*hypéroside R* et 2,5 mg de *rutine R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, méthyléthylcétone R, acétate d'éthyle R* (10:10:30:50 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : dans un courant d'air chaud.

*Détection* : pulvérisez de la solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R*, puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R* ; laissez sécher à l'air pendant 30 min ; examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente 3 bandes dans la partie inférieure : par ordre de $R_F$ croissant, une bande de fluorescence brun-jaune (rutine), une bande de fluorescence bleu clair (acide chlorogénique) et une bande de fluorescence brun-jaune (hypéroside), et dans le tiers supérieur, il présente une bande de fluorescence bleu clair (acide caféique). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente 3 bandes semblables quant à leur position et leur fluorescence à celles dues à la rutine, à l'acide chlorogénique et à l'hypéroside dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin ; la bande due à la rutine, étant de très faible intensité et celle due à l'hypéroside intense. Il présente également d'autres bandes de fluorescence brun-jaune d'intensité moindre situées entre les bandes dues à l'acide caféique et à l'acide chlorogénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Vers le front du chromatogramme, la fluorescence rouge de la bande due aux chlorophylles est visible. Entre celle-ci et la bande due à l'acide caféique du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande de fluorescence jaune-brun due à la quercétine.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3 pour cent de fragments de châtons femelles et au maximum 3 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de feuille de bouleau pulvérisée (355).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 5,0 pour cent.

DOSAGE

*Solution mère.* Placez 0,200 g de feuille de bouleau pulvérisée (355) (*2.9.12*) dans un ballon à fond rond de 100 mL. Ajoutez 1 mL d'une solution d'*hexaméthylènetétramine R* à 5 g/L, 20 mL d'*acétone R* et 2 mL d'*acide chlorhydrique R1.* Chauffez à ébullition à reflux pendant 30 min. Filtrez le mélange sur un peu de coton hydrophile dans une fiole de 100 mL. Portez à ébullition à reflux le résidu et le coton hydrophile pendant 10 min avec 2 fois 20 mL d'*acétone R*. Après refroidissement à la température ambiante, filtrez la solution sur un peu de coton hydrophile puis sur un papier filtre dans la fiole jaugée et complétez à 100,0 mL avec de l'*acétone R* en rinçant la fiole et le filtre. Transvasez 20,0 mL de solution dans une ampoule à décantation, ajoutez 20 mL d'*eau R* et agitez avec 1 fois 15 mL et 3 fois 10 mL d'*acétate d'éthyle R.* Réunissez les extraits d'acétate d'éthyle dans une ampoule à décantation, et lavez-les avec 2 fois 50 mL d'*eau R.* Filtrez les extraits sur 10 g de *sulfate de sodium anhydre R* dans une fiole jaugée de 50 mL et complétez à 50,0 mL avec de l'*acétate d'éthyle R.*

*Solution à examiner.* A 10,0 mL de solution mère, ajoutez 1 mL de *réactif au chlorure d'aluminium R* et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide acétique glacial R* à 5 pour cent *V/V* dans du *méthanol R.*

*Liquide de compensation.* Prélevez 10,0 mL de solution mère et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide acétique glacial R* à 5 pour cent *V/V* dans du *méthanol R.*

Après 30 min, mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner à 425 nm par comparaison au liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en flavonoïdes, exprimés en hypéroside, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

en prenant 500 comme valeur de l'absorbance spécifique de l'hypéroside.

$A$ = absorbance à 425 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2008:0025**
**corrigé 6.0**

# BOURDAINE

## Frangulae cortex

DÉFINITION

Ecorce séchée, entière ou fragmentée, de la tige et des branches de *Rhamnus frangula* L. (*Frangula alnus* Miller).

*Teneur* : au minimum 7,0 pour cent de glucofrangulines, exprimées en glucofranguline A ($C_{27}H_{30}O_{14}$ ; $M_r$ 578,5) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. L'écorce se présente en fragments cintrés, presque plats ou enroulés ou en tuyaux simples ou doubles, généralement d'une épaisseur de 0,5-2 mm et de longueur et largeur variables. La surface externe brun-gris ou brun foncé est ridée longitudinalement et recouverte de nombreuses lenticelles grisâtres, étirées transversalement ; débarrassée des assises externes, elle laisse apparaître une couche rouge foncé. La face interne brun orangé ou brun-rouge est lisse et striée finement en longueur ; elle se colore en rouge par addition d'alcalis. La cassure est courte, mais fibreuse au niveau de la face interne.

B. Réduisez la bourdaine en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaunâtre ou brun-rouge. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R.* La poudre présente les éléments suivants : de nombreuses fibres libériennes, partiellement lignifiées, groupées et accompagnées de tubes oxalifères à prismes ; des fragments brun-rouge du suber ; des fragments de parenchyme renfermant des macles d'oxalate de calcium. La poudre ne contient pas de cellules scléreuses.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai B « Autres espèces de *Rhamnus* ; anthrones » à la lumière du jour.

   *Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente 2 bandes brun-orangé (glucofrangulines) dans son tiers inférieur et 2-4 bandes rouges (frangulines, plus ou moins bien séparées et, au-dessus, frangula-émodine) dans son tiers supérieur.

D. A environ 50 mg de bourdaine pulvérisée (180) (*2.9.12*), ajoutez 25 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et chauffez au bain-marie pendant 15 min. Laissez refroidir, agitez la solution avec 20 mL d'*éther R* et rejetez la phase aqueuse. Agitez ensuite la phase éthérée avec 10 mL d'*ammoniaque diluée R1.* Il se développe une coloration violet-rouge dans la phase aqueuse.

ESSAI

**Autres espèces de *Rhamnus* ; anthrones**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Chauffez à ébullition 0,5 g de bourdaine pulvérisée (180) (*2.9.12*) avec 5 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Refroidissez et centrifugez. Décantez immédiatement le liquide surnageant. Utilisez cette solution dans les 30 min.

*Solution témoin*. Dissolvez 20 mg de *barbaloïne R* dans de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaques* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (2 plaques).

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R, acétate d'éthyle R* (13:17:100 *V/V/V*).

A. *Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air pendant 5 min.

*Détection* : pulvérisez une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 50 g/L dans l'*éthanol à 50 pour cent V/V R* et chauffez à 100-105 °C pendant 15 min. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente en son milieu une bande jaune-brun due à la barbaloïne. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente ni bande de fluorescence jaune intense ni bande de fluorescence orange ou rougeâtre semblable quant à sa position à celle due à la barbaloïne dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

B. *Dépôt* : 10 µL de solution à examiner, en bande.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air pendant au maximum 5 min.

*Détection* : pulvérisez immédiatement une solution de *bleu de nitrotétrazolium R* à 5 g/L dans le *méthanol R*. Examinez immédiatement.

*Résultats* : il n'apparaît aucune bande violette ou bleu-gris.

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 1 pour cent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 6,0 pour cent.

DOSAGE

*Effectuez le dosage à l'abri d'une lumière vive.*

Dans un ballon taré, à fond rond et à col rodé, pesez 0,250 g de bourdaine pulvérisée (180) (*2.9.12*). Ajoutez 25,0 mL d'une solution de *méthanol R* à 70 pour cent *V/V*, mélangez et pesez. Placez le ballon dans un bain-marie et chauffez à reflux pendant 15 min. Laissez refroidir, pesez et rétablissez la masse avec une solution de *méthanol R* à 70 pour cent *V/V*. Filtrez. Dans une ampoule à décantation, introduisez 5,0 mL du filtrat. Ajoutez 50 mL d'*eau R* et 0,1 mL d'*acide chlorhydrique R*. Agitez avec 5 fois 20 mL d'*éther de pétrole R*. Laissez les phases se séparer et introduisez la phase aqueuse dans un ballon jaugé de 100 mL. Réunissez les phases d'éther de pétrole et lavez-les avec 2 fois 15 mL d'*eau R*. Rincez l'ampoule à décantation avec la même eau de lavage et versez-la dans le ballon jaugé. Ajoutez 5 mL d'une solution de *carbonate de sodium R* à 50 g/L et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Rejetez la phase d'éther de pétrole. Dans un ballon à fond rond et à col rodé de 200 mL, introduisez 40,0 mL de la solution aqueuse. Ajoutez 20 mL d'une solution de *chlorure ferrique R* à 200 g/L. Placez le ballon dans un bain-marie de façon que le niveau de l'eau soit au-dessus de celui du liquide dans le ballon et chauffez à reflux pendant 20 min. Ajoutez 2 mL d'*acide chlorhydrique R* et prolongez le chauffage pendant 20 min en agitant fréquemment jusqu'à dissolution du précipité. Laissez refroidir et introduisez le mélange dans une ampoule à décantation. Agitez avec 3 fois 25 mL d'*éther R* utilisés au préalable pour rincer le ballon. Réunissez les 3 phases éthérées et lavez-les avec 2 fois 15 mL d'*eau R*. Dans un ballon jaugé, introduisez la phase éthérée et complétez à 100,0 mL avec de l'*éther R*. Evaporez soigneusement à siccité 20,0 mL de la solution éthérée, dissolvez le résidu dans 10,0 mL d'une solution d'*acétate de magnésium R* à 5 g/L dans le *méthanol R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 515 nm en utilisant le *méthanol R* comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en glucofrangulines, exprimées en glucofrangruline A, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 3,06}{m}$$

en prenant 204 comme valeur de l'absorbance spécifique de la glucofrangruline A.

$A$ = absorbance à 515 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**07/2009:1214**

# BOURDAINE (EXTRAIT SEC TITRÉ DE)

## Frangulae corticis extractum siccum normatum

DÉFINITION

Extrait sec titré obtenu à partir de *Bourdaine (0025)*.

*Teneur* : 15,0 pour cent à 30,0 pour cent de glucofrangulines, exprimées en glucofrangruline A ($C_{27}H_{30}O_{14}$ ; $M_r$ 578,5) (extrait desséché) ; la teneur mesurée ne s'écarte pas de plus de 10 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec de l'éthanol à 50-90 pour cent *V/V*.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre fine, brun-jaune.

IDENTIFICATION

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Chauffez à ébullition 0,05 g d'extrait à examiner avec 5 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Refroidissez, puis centrifugez. Décantez immédiatement le surnageant et utilisez-le dans les 30 min.

*Solution témoin*. Dissolvez 20 mg de *barbaloïne R* dans de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R, acétate d'éthyle R* (13:17:100 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air pendant 5 min.

*Détection* : pulvérisez une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 50 g/L dans l'*éthanol à 50 pour cent V/V R*, chauffez à 100-105 °C pendant 15 min et examinez immédiatement.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente une bande brun-rouge due à la barbaloïne dans son tiers médian. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente 2 bandes brun orangé (glucofrangulines) dans son tiers inférieur et 2-4 bandes rouges (frangulines, plus ou moins bien séparées et, au-dessus, frangula-émodine) dans son tiers supérieur.

B. A environ 25 mg d'extrait à examiner, ajoutez 25 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et chauffez le mélange au bain-marie pendant 15 min. Laissez refroidir, agitez avec 20 mL d'*éther R* et rejetez la phase aqueuse. Agitez la phase éthérée avec 10 mL d'*ammoniaque diluée R1*. Il se développe une coloration violet-rouge dans la phase aqueuse.

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.8.17*) : au maximum 5,0 pour cent.

**Contamination microbienne**

DGAT : critère d'acceptation $10^4$ UFC/g (*2.6.12*).

DMLT : critère d'acceptation $10^2$ UFC/g (*2.6.12*).

Absence d'*Escherichia coli* (*2.6.13*).

Absence de salmonelles (*2.6.13*).

DOSAGE

*Effectuez le dosage à l'abri d'une lumière vive.*

Dans un ballon à fond rond et à col rodé, taré, introduisez 0,100 g d'extrait à examiner. Ajoutez 25,0 mL d'une solution de *méthanol R* à 70 pour cent *V/V*, mélangez et pesez à nouveau. Placez le ballon dans un bain-marie et chauffez à reflux à 70 °C pendant 15 min. Laissez refroidir, pesez et rétablissez la masse avec une solution de *méthanol R* à 70 pour cent *V/V*. Filtrez et introduisez 5,0 mL du filtrat dans une ampoule à décantation. Ajoutez 50 mL d'*eau R* et 0,1 mL d'*acide chlorhydrique R*. Agitez avec 5 fois 20 mL d'*éther de pétrole R1*. Laissez séparer les phases et transférez la phase aqueuse dans une fiole jaugée de 100 mL. Réunissez les phases d'éther de pétrole et lavez avec 2 fois 15 mL d'*eau R*. Rincez l'ampoule à décantation avec la même eau de lavage et versez-la dans la fiole jaugée. Ajoutez 5 mL d'une solution de *carbonate de sodium R* à 50 g/L et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Rejetez la phase d'éther de pétrole. Dans un ballon de 200 mL, à fond rond et à col rodé, introduisez 40,0 mL de solution aqueuse. Ajoutez 20 mL d'une solution de *chlorure ferrique R* à 200 g/L. Placez le ballon dans un bain-marie et chauffez à reflux pendant 20 min en veillant à ce que le niveau de l'eau reste constamment supérieur à celui du liquide contenu dans le ballon. Ajoutez 2 mL d'*acide chlorhydrique R* et continuez à chauffer pendant 20 min, en agitant fréquemment jusqu'à dissolution du précipité. Laissez refroidir. Transvasez le mélange dans une ampoule à décantation. Agitez avec 3 fois 25 mL d'*éther R*, préalablement utilisé pour rincer le ballon. Réunissez les 3 phases éthérées et lavez avec 2 fois 15 mL d'*eau R*. Transvasez la phase éthérée dans un ballon jaugé et complétez à 100,0 mL avec de l'*éther R*. Prélevez 20,0 mL de cette solution et évaporez à siccité avec précaution, puis dissolvez le résidu dans 10,0 mL d'une solution d'*acétate de magnésium R* à 5 g/L dans du *méthanol R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 515 nm en utilisant du *méthanol R* comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en glucofrangulines, exprimées en glucofranguline A, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 3,06}{m}$$

en prenant 204 comme valeur de l'absorbance spécifique de la glucofranguline A, calculée par rapport à l'absorbance spécifique de la barbaloïne.

$A$ = absorbance à 515 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique la teneur en glucofrangulines.

**01/2008:1879**
**corrigé 6.0**

# BUGRANE (RACINE DE)

## Ononidis radix

DÉFINITION

Racine séchée, entière ou coupée, d'*Ononis spinosa* L.

IDENTIFICATION

A. La racine est plus ou moins aplatie, tordue et ramifiée, profondément ridée, brune avec des sillons longitudinaux. La surface en coupe transversale fait apparaître une écorce fine et un cylindre ligneux à structure radiée très visible. La cassure de la racine est courte et fibreuse.

B. Réduisez la racine de bugrane en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun clair ou brune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de suber bruns composés de cellules polygonales à paroi fine ; des groupes de fibres étroites à parois épaisses, souvent accompagnées de files de cellules parenchymateuses cristallifères à prismes d'oxalate de calcium ; des fragments vasculaires avec de nombreuses petites ponctuations aréolées ; des cellules parenchymateuses avec des prismes simples d'oxalate de calcium. Examinez au microscope en utilisant un mélange à volumes égaux de *glycérol R* et d'*eau R*. La poudre présente de nombreux grains d'amidon simples et arrondis, d'un diamètre de 5-10 µm.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 1,0 g de racine de bugrane pulvérisée (180) (*2.9.12*), ajoutez 15,0 mL de *méthanol R* et chauffez à reflux pendant 30 min. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 10 mg de *résorcinol R* et 50 mg de *vanilline R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R.*

*Phase mobile* : *éthanol à 96 pour cent R, chlorure de méthylène R, toluène R* (10:45:45 *V/V/V*).

*Dépôt :* 20 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage :* à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm et 365 nm.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence sont présentes dans le tiers médian du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Vanilline : une bande visible à 254 nm<br>_______ | <br>_______ |
| Résorcinol : une bande visible à 254 nm<br>_______ | Une bande de fluorescence bleue intense visible à 365 nm<br>_______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R*. Chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Vanilline : une bande violet-gris | |
| | Une bande violette (onocol) |
| Résorcinol : une bande rouge | |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de racine de bugrane pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 8,0 pour cent.

Drogues végétales

**Matières extractibles** : au minimum 15,0 pour cent.

A 2,00 g de racine de bugrane pulvérisée (250) (*2.9.12*), ajoutez un mélange de 8 g d'*eau R* et de 12 g d'*éthanol à 96 pour cent R*. Laissez macérer pendant 2 h. Agitez fréquemment. Filtrez, prélevez 5 g du filtrat et évaporez-le au bain-marie à siccité, puis desséchez à l'étuve à 100-105 °C pendant 2 h. La masse du résidu est au minimum de 75 mg.

**04/2008:1054**

# BUSSEROLE (FEUILLE DE)

## Uvae ursi folium

DÉFINITION

Feuille entière ou fragmentée, séchée, de *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.

*Teneur* : au minimum 7,0 pour cent d'arbutoside anhydre ($C_{12}H_{16}O_7$ ; $M_r$ 272,3) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La feuille de busserole, de couleur vert foncé brillant sur la face adaxiale, plus claire sur la face abaxiale, a généralement une longueur de 7-30 mm et une largeur de 5-12 mm. La feuille entière est obovale, à bords lisses, un peu réfléchie en dessous, atténuée à la base en un court pétiole. Elle est obtuse ou rétuse au sommet. Le limbe est épais et coriace. La nervation, pennée et finement réticulée, est nettement visible sur les 2 faces. La face adaxiale est marquée de veinules creuses qui lui donnent un aspect chagriné caractéristique. Seule la feuille jeune est ciliée sur les bords. La feuille âgée est glabre.

B. Réduisez la feuille de busserole en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est verte à gris-vert ou vert-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments d'épidermes qui, vus de face, présentent des cellules polygonales, recouvertes d'une cuticule épaisse et lisse, à parois droites, épaisses et irrégulièrement ponctuées ; des stomates de type anomocytique (*2.8.3*) entourés de 5-11 cellules annexes et de cicatrices des bases de poils seulement à l'épiderme abaxial ; des fragments de parenchyme palissadique, à 3 ou 4 assises de cellules de longueur inégale, et de parenchyme lacuneux ; des groupes de fibres lignifiées du péricycle accompagnées de files de cellules contenant des prismes d'oxalate de calcium ; de rares poils tecteurs, coniques, unicellulaires.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 0,5 g de feuille de busserole pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 5 mL d'un mélange à volumes égaux de *méthanol R* et d'*eau R* et chauffez à reflux pendant 10 min. Filtrez à chaud. Lavez la fiole et le filtre avec un mélange à volumes égaux de *méthanol R* et d'*eau R* et complétez à 5 mL avec le même mélange de solvants.

*Solution témoin*. Dissolvez 25 mg d'*arbutoside R*, 25 mg d'*acide gallique R* et 25 mg d'*hydroquinone R* dans du *méthanol R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, acétate d'éthyle R* (6:6:88 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL de solution témoin et 20 µL de solution à examiner, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à 105-110 °C jusqu'à disparition complète de la phase mobile.

*Détection* : pulvérisez une solution de *dichloroquinonechlorimide R* à 10 g/L dans le *méthanol R*. Pulvérisez ensuite une solution de *carbonate de sodium anhydre R* à 20 g/L.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, 2 à 3 bandes bleues et plusieurs bandes brunes à gris-brun peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Hydroquinone : une bande bleue | Une bande bleue |
| Acide gallique : une bande brunâtre | Une bande brunâtre |
| _______ | _______ |
| _______ | _______ |
| Arbutoside : une bande bleu clair | Une bande bleu clair (arbutoside) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent de tiges et au maximum 3 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Feuilles de couleur différente** : au maximum 10 pour cent de feuilles de couleur différente, déterminé selon la méthode des éléments étrangers (*2.8.2*).

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 5,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Dans un ballon de 100 mL à col rodé, introduisez 0,800 g de drogue pulvérisée (250) (*2.9.12*). Ajoutez 20 mL d'*eau R* et chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Laissez refroidir, puis filtrez le liquide sur un tampon de coton hydrophile. Ajoutez le coton hydrophile au résidu contenu dans le ballon de 100 mL, puis chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min avec 20 mL d'*eau R*. Laissez refroidir et filtrez sur un filtre en papier. Réunissez les filtrats et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R*. Filtrez sur un filtre en papier et jetez les 10 premiers millilitres de filtrat.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 50,0 mg d'*arbutoside SCR* dans la phase mobile et complétez à 50,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 2,5 mg d'*hydroquinone R* dans la phase mobile et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile. Prélevez 5,0 mL de cette solution, ajoutez 2,5 mL de solution témoin (a) et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie désactivé pour les bases R* (5 µm).

*Phase mobile* : *méthanol R, eau R* (10:90 *V/V*).

*Débit* : 1,2 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 280 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Conformité du système* :

– *résolution* : au minimum 4,0 entre les pics dus à l'arbutoside et à l'hydroquinone dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b).

Drogues végétales

Calculez la teneur pour cent en arbutoside à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{F_1 \times m_2 \times p}{F_2 \times m_1}$$

$F_1$ = surface du pic dû à l'arbutoside dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_2$ = surface du pic dû à l'arbutoside dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de drogue à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse d'*arbutoside SCR* utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en arbutoside de l'*arbutoside SCR*.

**01/2008:1516**
**corrigé 6.0**

# CAMOMILLE (GRANDE)

## Tanaceti parthenii herba

DÉFINITION

Parties aériennes, entières ou fragmentées, séchées, de *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip.

*Teneur* : au minimum 0,20 pour cent de parthénolide ($C_{15}H_{20}O_3$ ; $M_r$ 248,3) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Odeur camphrée.

IDENTIFICATION

A. La tige feuillée, plus ou moins ramifiée, a un diamètre atteignant 5 mm. Elle est presque quadrangulaire, cannelée longitudinalement et légèrement pubescente. Les feuilles ovales, vert-jaune, mesurant 2-5 cm de long et parfois jusqu'à 10 cm, sont pétiolées et alternes. Elles sont pennées ou bipennées, profondément divisées en 5-9 segments dont le limbe est grossièrement crénelé aux bords avec un apex obtus. Elles sont plus ou moins pubescentes sur les 2 faces et la nervure centrale est proéminente à la face inférieure. Si des capitules sont présents, ils sont groupés en large corymbe de 5-30 capitules longuement pédicellés et ont un diamètre de 12-22 mm. L'involucre en forme de demi-sphère est d'une largeur de 6-8 mm et composé de nombreuses bractées qui se recouvrent les unes les autres et qui sont assez étroites, obtuses, scarieuses et membraneuses sur les bords. Les fleurs du centre sont jaunes, hermaphrodites, en tube terminé par 5 dents, possédant 5 étamines insérées sur la corolle ; les filets staminaux sont libres entre eux, mais les anthères sont soudées les unes aux autres en un tube au travers duquel passe le style à 2 branches stigmatiques. Les fleurs périphériques, femelles, ont une ligule blanche à 3 dents, mesurant 2-7 mm de long. Le fruit est un akène de 1,2-1,5 mm de long, brun quand il est mûr, présentant 5-10 côtes blanches longitudinales. Il est glanduleux et surmonté d'une courte couronne membraneuse, crénelée.

B. Réduisez la grande camomille en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : de nombreux poils tecteurs, de grande taille, pluricellulaires, unisériés, constitués d'une cellule basale rhomboïdale, puis de 3-5 cellules plus petites, rectangulaires, à paroi épaisse, et enfin d'une cellule terminale très longue, plate, effilée, souvent courbée à angle droit par rapport à l'axe de la cellule basale ; des poils sécréteurs à pédicelle court bisérié, bicellulaire ou quadricellulaire et à tête bisériée composée de 4 cellules autour desquelles la cuticule forme une vésicule ; des cellules épidermiques à parois anticlinales très sinueuses, à cuticule striée et avec des stomates anomocytiques (*2.8.3*) ; de nombreux vaisseaux épaissis spiralés ou annelés ; des cellules stratifiées de parenchyme ou de collenchyme. La poudre présente parfois des fragments de fleurs centrales contenant des masses amorphes jaune pâle et de petits cristaux d'oxalate de calcium formant des rosettes ; des grains de pollen sphériques, d'environ 25 µm de diamètre, à 3 pores et à exine échinulée peuvent être présents.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1 g de grande camomille pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 20 mL de *méthanol R*. Chauffez dans un bain-marie à 60 °C pendant 15 min. Laissez refroidir et filtrez. Evaporez à siccité sous pression réduite, puis dissolvez le résidu dans 2 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *parthénolide R* dans du *méthanol R* et complétez à 5 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétone R*, *toluène R* (15:85 *V/V*).

*Dépôt* : 20 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution de *vanilline R* à 5 g/L dans un mélange de 20 volumes d'*éthanol anhydre R* et de 80 volumes d'*acide sulfurique R* ; après 5 min, examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente en son milieu une bande principale bleue, semblable quant à sa position, sa coloration et ses dimensions à la bande principale du chromatogramme obtenu avec la solution témoin ; un peu au-dessous de celle-ci, une 2e bande bleue peut apparaître. Il présente également 1 ou 2 bandes bleues dans le tiers inférieur. D'autres bandes violettes peuvent être présentes.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 10,0 pour cent de tiges de diamètre supérieur à 5 mm et au maximum 2,0 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de grande camomille pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 12,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Prélevez environ 50 g de grande camomille et pulvérisez-les complètement (355) (*2.9.12*). Après homogénéisation, introduisez 1,00 g de grande camomille pulvérisée dans un ballon, ajoutez 40 mL de *méthanol R*. Chauffez dans un bain-marie à 60 °C pendant 10 min. Laissez refroidir. Filtrez. Rincez le filtre avec 15 mL de *méthanol R*. Reprenez le résidu avec 40 mL de *méthanol R*. Traitez comme précédemment. Réunissez et évaporez à siccité sous pression réduite les filtrats et les solutions de rinçage. Reprenez le résidu avec du *méthanol R* et complétez à 20,0 mL avec le même solvant. Prélevez 10,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec la phase mobile. Filtrez (0,45 µm).

*Solution témoin*. Dissolvez 5,0 mg de *parthénolide R* dans du *méthanol R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant. Prélevez 2,0 mL de solution et complétez à 50,0 mL avec la phase mobile.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : *acétonitrile R*, *eau R* (40:60 *V/V*).

*Débit* : 1 mL/min.

*Détecteur* : spectrophotomètre à 220 nm.

*Injection* : 20 μL.

*Temps de rétention* : parthénolide = environ 11,5 min.

Calculez la teneur pour cent en parthénolide à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times 40}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû au parthénolide dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû au parthénolide dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de grande camomille dans la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse de parthénolide dans la solution témoin, en grammes.

**01/2008:0380**
**corrigé 6.0**

# CAMOMILLE ROMAINE (FLEUR DE)

## Chamomillae romanae flos

DÉFINITION

Capitules floraux séchés de la variété double cultivée de *Chamaemelum nobile* (L.) All. (*Anthemis nobilis* L.).

*Teneur* : au minimum 7 mL/kg d'huile essentielle (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Les capitules floraux sont blanc ou gris-jaune, hémisphériques, solitaires, formés d'un réceptacle conique et plein, sur lequel sont insérés les fleurons mêlés de petites paillettes transparentes.

Odeur pénétrante et caractéristique.

Caractères macroscopiques et microscopiques décrits dans les identifications A et B.

IDENTIFICATION

A. Les capitules ont un diamètre de 8-20 mm ; le réceptacle est plein ; la base du réceptacle est entourée par un involucre formé de 2-3 rangées de bractées serrées et imbriquées, scarieuses sur les bords. Les fleurons sont en majorité ligulés ; au centre, quelques fleurons jaune pâle sont tubulés. Les fleurons ligulés sont blancs, ternes, lancéolés et réfléchis, avec un ovaire infère, brun foncé, un style filiforme et un stigmate bifide ; les fleurons tubulés sont composés d'une corolle à 5 dents ; leur androcée comporte 5 étamines épipétales synanthérées ; leur gynécée est semblable à celui des fleurons ligulés.

B. Séparez le capitule en ses différentes parties. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. Toutes les parties des capitules présentent de nombreux trichomes glanduleux courts, luisants et jaunes. Les bractées de l'involucre et les paillettes présentent des cellules épidermiques en rangées longitudinales sclérifiées à la base et couvertes de trichomes coniques d'une longueur d'environ 500 μm, composés chacun de 3-4 cellules basales très courtes et d'une longue cellule terminale recourbée, d'une largeur d'environ 20 μm. Les corolles des fleurons ligulés sont composées de cellules papilleuses à stries cuticulaires. Les ovaires des 2 sortes de fleurons comportent à la base, un anneau scléreux composé d'une rangée unique de cellules. Le réceptacle et les ovaires contiennent de petites macles d'oxalate de calcium. Les grains de pollen d'un diamètre d'environ 35 μm, ronds ou triangulaires, présentent 3 pores germinatifs et une exine échinulée.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 0,5 g de drogue pulvérisée (710) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Chauffez le mélange dans un bain-marie à 60 °C pendant 5 min, en agitant. Laissez refroidir et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 2,5 mg d'*apigénine R* et 2,5 mg d'*apigénine-7-glucoside R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, eau R, butanol R* (17:17:66 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 μL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C pendant 5 min.

*Détection* : pulvérisez sur la plaque encore chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R* à raison d'environ 10 mL pour une plaque de 200 mm de côté ; pulvérisez ensuite le même volume d'une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R* ; laissez reposer pendant environ 30 min et examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente, dans son tiers supérieur, une bande de fluorescence vert-jaune (apigénine) et, dans son tiers médian, une bande de fluorescence jaunâtre (apigénine-7-glucoside). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande de fluorescence vert-jaune et une bande de fluorescence jaunâtre semblables quant à leur position et leur fluorescence aux bandes dues à l'apigénine et à l'apigénine-7-glucoside du chromatogramme obtenu avec la solution témoin ; il présente également, au-dessus de la bande due à l'apigénine-7-glucoside, une bande de fluorescence brunâtre (lutéoline) et, immédiatement au-dessous de la bande due à l'apigénine-7-glucoside, une bande de fluorescence brun clair (apiine) ; immédiatement au-dessous de la bande due à l'apiine apparaît une bande de fluorescence bleu vif et, au-dessous de cette bande, une autre bande de fluorescence bleu vif. Il peut présenter également d'autres faibles bandes de fluorescence.

ESSAI

**Diamètre des capitules floraux** : au maximum 3 pour cent de capitules floraux de diamètre inférieur à 8 mm.

**Capitules altérés** : la drogue ne contient pas de capitules floraux bruns ou noirâtres.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 11,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 8,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez 20,0 g de drogue entière, un ballon à fond rond de 500 mL et 250 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Ajoutez 0,50 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 3-3,5 mL/min pendant 3 h.

**01/2008:1608**
**corrigé 7.0**

# CANNELIER DIT DE CEYLAN (FEUILLE DE), HUILE ESSENTIELLE DE

## Cinnamomi zeylanici folii aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau des feuilles de *Cinnamomum verum* J.S. Presl.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide mobile, limpide, brun-rouge ou brun foncé.

Odeur caractéristique rappelant celle de l'eugénol.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Diluez 1 mL de substance à examiner dans de l'*acétone R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Diluez environ 50 µL d'*aldéhyde trans-cinnamique R*, 10 µL d'*eugénol R*, 10 µL de *linalol R* et 10 µL de *β-caryophyllène R* dans de l'*alcool R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *méthanol R, toluène R* (10:90 *V/V*)

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R*. Examinez à la lumière du jour en chauffant la plaque pendant 5-10 min à 100-105 °C.

*Résultats* : les bandes obtenues avec la solution à examiner sont semblables quant à leur position et leur coloration à celles du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. La bande correspondant à l'aldéhyde *trans*-cinnamique peut être très faible ou absente.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Les pics du cinéole, du safrole, de l'aldéhyde *trans*-cinnamique, de l'acétate de cinnamyle et de la coumarine peuvent être absents dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 1,030 à 1,059.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,527 à 1,540.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : – 2,5° à + 2,0°.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. La substance à examiner.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 µL de *cinéole R*, 10 µL de *linalol R*, 10 µL de *β-caryophyllène R*, 10 µL de *safrole R*, 10 µL d'*aldéhyde trans-cinnamique R*, 10 µL d'*acétate de cinnamyle R*, 100 µL d'*eugénol R* et 10 mg de *coumarine R* dans 1 mL d'*acétone R*.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : $l$ = 60 m, Ø = 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R*.

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Rapport de division* : 1/100.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 10 | 45 |
| | 10 - 78 | 45 → 180 |
| | 78 - 88 | 180 |
| Chambre à injection | | 200 |
| Détecteur | | 240 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 0,2 µL.

*Ordre d'élution* : ordre donné pour la préparation de la solution témoin. Enregistrez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au linalol et au β-caryophyllène.

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les composants de la solution témoin.

Déterminez la teneur pour cent de chacun de ces composants.

Ces pourcentages sont compris entre les valeurs suivantes :

– *cinéole* : au maximum 1,0 pour cent
– *linalol* : 1,5 pour cent à 3,5 pour cent
– *β-caryophyllène* : 1,5 pour cent à 7,0 pour cent
– *safrole* : au maximum 3,0 pour cent
– *aldéhyde trans-cinnamique* : au maximum 3,0 pour cent
– *acétate de cinnamyle* : au maximum 2,0 pour cent
– *eugénol* : 70 pour cent à 85 pour cent
– *coumarine* : au maximum 1,0 pour cent

CONSERVATION

A l'abri de la chaleur.

**01/2008:1496**
**corrigé 7.0**

# CANNELIER (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Cinnamomi cassiae aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau des feuilles et jeunes rameaux de *Cinnamomum cassia* Blume (*C. aromaticum* Nees).

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, mobile, jaune ou brun-rouge.

Odeur caractéristique rappelant celle de l'aldéhyde cinnamique.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,5 mL d'huile essentielle de cannelier dans de l'*acétone R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 50 µL d'*aldéhyde trans-cinnamique R*, 10 µL d'*eugénol R* et 50 mg de *coumarine R* dans de l'*acétone R*, puis complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *méthanol R, toluène R* (10:90 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats A* : la bande de fluorescence bleue du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à sa position et sa coloration à la bande du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (coumarine).

*Détection B* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* ; examinez à la lumière du jour en chauffant à 100-105 °C pendant 5-10 min.

Drogues végétales

*Résultats B* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente dans sa partie supérieure une bande violacée (eugénol) et au-dessus de cette bande une bande bleu-vert (aldéhyde *trans*-cinnamique). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande semblable quant à sa position et sa coloration à la bande de l'aldéhyde *trans*-cinnamique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin et peut présenter une bande de très faible intensité due à l'eugénol. D'autres bandes de faible coloration sont présentes.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics principaux du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. L'eugénol peut être absent dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 1,052 à 1,070.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,600 à 1,614.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : – 1° à + 1°.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. Huile essentielle de cannelier.

*Solution témoin*. Dissolvez 100 µL d'*aldéhyde trans-cinnamique R*, 10 µL d'*acétate de cinnamyle R*, 10 µL d'*eugénol R*, 10 µL de *trans-2-méthoxycinnamaldéhyde R* et 20 mg de *coumarine R* dans 1 mL d'*acétone R*.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 60 m, Ø = environ 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* à phase greffée.

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Rapport de division* : 1:100.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 10 | 60 |
| | 10 - 75 | 60 → 190 |
| | 75 - 160 | 190 |
| Chambre à injection | | 200 |
| Détecteur | | 240 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 0,2 µL.

*Ordre d'élution* : ordre donné pour la préparation de la solution témoin ; selon les conditions opératoires et l'état de la colonne, la coumarine peut éluer avant ou après le *trans*-2-méthoxycinnamaldéhyde. Enregistrez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au *trans*-2-méthoxycinnamaldéhyde et à la coumarine.

*Identification des composants* : à l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les composants de la solution témoin.

Déterminez la teneur pour cent de chacun de ces composants. Ces teneurs sont comprises entre les valeurs suivantes :

– *aldéhyde trans-cinnamique* : 70 pour cent à 90 pour cent,
– *acétate de cinnamyle* : 1,0 pour cent à 6,0 pour cent,
– *eugénol* : au maximum 0,5 pour cent,
– *trans-2-méthoxycinnamaldéhyde* : 3,0 pour cent à 15 pour cent,
– *coumarine* : 1,5 pour cent à 4,0 pour cent.

CONSERVATION

A l'abri de la chaleur.

**01/2008:0387**

# CANNELLE DITE DE CEYLAN

## Cinnamomi cortex

DÉFINITION

Ecorce desséchée, privée du liège externe et du parenchyme sous-jacent, et rejets développés sur les souches taillées de *Cinnamomum zeylanicum* Nees.

*Teneur* : au minimum 12 mL/kg d'huile essentielle.

CARACTÈRES

Odeur aromatique caractéristique.

IDENTIFICATION

A. L'écorce, d'une épaisseur d'environ 0,2-0,8 mm, se présente en tuyaux isolés ou emboîtés les uns dans les autres. La face externe est lisse, brun-jaune, faiblement marquée de cicatrices correspondant aux insertions des feuilles et des bourgeons axillaires, avec de fines stries, longitudinales, blanchâtres et sinueuses. La face interne est un peu plus sombre et également pourvue de stries longitudinales. La cassure est courte et fibreuse.

B. Réduisez la drogue à examiner en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaunâtre ou brun-rouge. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des groupes de cellules scléreuses arrondies, à parois ponctuées, canaliculées et d'épaisseur modérée ; de nombreuses fibres incolores isolées, souvent entières, à lumen étroit et à parois épaisses, lignifiées et légèrement ponctuées ; de petits cristaux aciculaires d'oxalate de calcium. Les fragments de suber sont absents ou très rares. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente d'abondants grains d'amidon.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Agitez 0,1 g de drogue pulvérisée (500) (*2.9.12*) avec 2 mL de *chlorure de méthylène R* pendant 15 min. Filtrez et évaporez prudemment le filtrat au bain-marie presque à siccité. Reprenez le résidu par 0,4 mL de *toluène R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 50 µL d'*aldéhyde cinnamique R* et 10 µL d'*eugénol R* dans du *toluène R*, puis complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice* $GF_{254}$ *pour CCM R*.

*Phase mobile* : *chlorure de méthylène R*.

*Dépôt* : 10 µL en bandes de 20 mm sur 3 mm.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm et marquez les bandes d'atténuation de fluorescence. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm et marquez les bandes fluorescentes.

*Résultats A* : examinés en lumière ultraviolette à 254 nm, les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et la solution témoin présentent en leur milieu une bande d'atténuation de fluorescence due à l'aldéhyde cinnamique et, immédiatement au-dessus, une bande d'atténuation de fluorescence moins prononcée due à l'eugénol. Examiné en lumière ultraviolette à 365 nm, le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente, immédiatement

Drogues végétales

au-dessous de la bande due à l'aldéhyde cinnamique, une bande de fluorescence bleu clair due à l'aldéhyde *o*-méthoxycinnamique.

*Détection B* : pulvérisez de la *solution de phloroglucine R*.

*Résultats B* : la bande due à l'aldéhyde cinnamique se colore en brun-jaune et la bande due à l'aldéhyde *o*-méthoxycinnamique en violet.

ESSAI

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 6,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez un ballon de 500 mL et 200 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* comme liquide d'entraînement. Introduisez 0,50 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Réduisez la cannelle en poudre (710) (*2.9.12*). Procédez immédiatement à la détermination sur 20,0 g de la drogue en poudre en distillant à un débit de 2,5-3,5 mL/min pendant 3 h.

**01/2008:1501**
**corrigé 7.0**

# CANNELLE DITE DE CEYLAN (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Cinnamomi zeylanicii corticis aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau de l'écorce de jeunes tiges de *Cinnamomum zeylanicum* Nees (*C. Verum* J.S. Presl.).

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, mobile, jaune clair, devenant rougeâtre en vieillissant.

Odeur caractéristique rappelant celle de l'aldéhyde cinnamique.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 1 mL d'huile essentielle à examiner dans de l'*acétone R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 50 µL d'*aldéhyde trans-cinnamique R*, 10 µL d'*eugénol R*, 10 µL de *linalol R* et 10 µL de *β-caryophyllène R* dans de l'*éthanol à 96 pour cent R*, puis complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *méthanol R, toluène R* (10:90 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R*, examinez à la lumière du jour en chauffant à 100-105 °C pendant 5-10 min.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente des bandes semblables quant à leur position et leur coloration à celles du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics principaux du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Le safrole, la coumarine et le cinéole peuvent être absents dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 1,000 à 1,030.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,572 à 1,591.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : – 2° à + 1°.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. L'huile essentielle à examiner.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 µL de *cinéole R*, 10 µL de *linalol R*, 10 µL de *β-caryophyllène R*, 10 µL de *safrole R*, 100 µL d'*aldéhyde trans-cinnamique R*, 10 µL d'*eugénol R*, 20 mg de *coumarine R*, 10 µL de *trans-2-méthoxycinnamaldéhyde R* et 10 µL de *benzoate de benzyle R* dans 1 mL d'*acétone R*.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 60 m, Ø = 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* à phase greffée.

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R.*

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Rapport de division* : 1:100.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 10 | 60 |
| | 10 - 75 | 60 → 190 |
| | 75 - 200 | 190 |
| Chambre à injection | | 200 |
| Détecteur | | 240 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 0,2 µL.

*Ordre d'élution* : ordre donné pour la préparation de la solution témoin ; selon les conditions opératoires et l'état de la colonne, la coumarine peut éluer avant ou après le *trans*-2-méthoxycinnamaldéhyde ; notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au linalol et au β-caryophyllène.

*Identification des composants* : à l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les composants de la solution témoin.

Déterminez la teneur pour cent de chacun de ces composants. Ces teneurs sont comprises dans les valeurs suivantes :

– *cinéole* : au maximum 3,0 pour cent,
– *linalol* : 1,0 pour cent à 6,0 pour cent,
– *β-caryophyllène* : 1,0 pour cent à 4,0 pour cent,
– *safrole* : au maximum 0,5 pour cent,
– *aldéhyde trans-cinnamique* : 55 pour cent à 75 pour cent,
– *eugénol* : au maximum 7,5 pour cent,
– *coumarine* : au maximum 0,5 pour cent,
– *trans-2-méthoxycinnamaldéhyde* : 0,1 pour cent à 1,0 pour cent,
– *benzoate de benzyle* : au maximum 1,0 pour cent.

CONSERVATION

A l'abri de la chaleur.

**01/2008:1819**

# CANNELLE DITE DE CEYLAN (TEINTURE DE)

## Cinnamomi corticis tinctura

DÉFINITION

Teinture produite à partir de *Cannelle dite de Ceylan (0387).*

PRODUCTION

La teinture est produite à partir de 1 partie de drogue et de 5 parties d'éthanol à 70 pour cent *V/V*, par une méthode appropriée.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, rouge-brun, d'odeur caractéristique.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Introduisez 10 mL de teinture à examiner, 10 mL d'une *solution saturée de chlorure de sodium R* et 5 mL de *toluène R* dans un tube de verre à bouchon rodé. Mélangez pendant 2 min et centrifugez pendant 10 min. Utilisez la couche organique.

*Solution témoin.* Dissolvez 5 µL d'*eugénol R*, 25 µL d'*aldéhyde trans-cinnamique R* et 5 µL de *trans-2-méthoxycinnamaldéhyde R* dans du *toluène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R.*

*Phase mobile* : *chlorure de méthylène R.*

*Dépôt* : 20 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| *Trans*-2-méthoxycinnamaldéhyde : une bande de fluorescence bleu clair | Une bande de fluorescence bleu clair (*trans*-2-méthoxycinnamaldéhyde) |
| ——— | ——— |
| | Une bande de fluorescence verdâtre (au-dessus de la ligne de dépôt) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez une solution d'*acide phosphomolybdique R* à 200 g/L dans l'*éthanol R*. Examinez à la lumière du jour en chauffant à 100-105 °C pendant 5-10 min.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | 1 bande bleue (hydrocarbures terpéniques) |
| ——— | ——— |
| Eugénol : une bande bleue | Une bande bleue (eugénol) |
| Aldéhyde *trans*-cinnamique : une bande bleue | Une bande bleue (aldéhyde *trans*-cinnamique) |
| *Trans*-2-methoxycinnamaldéhyde : une bande brun-orangé (la couleur s'atténue) | Une bande brun-orangé de faible intensité (*trans*-2-méthoxycinnamaldéhyde) |
| ——— | ——— |
| | 2 ou 3 bandes bleues au-dessus de la ligne de dépôt |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Ethanol** (*2.9.10*) : 64 pour cent *V/V* à 70 pour cent *V/V*.

**Méthanol et 2-propanol** (*2.9.11*) : au maximum 0,05 pour cent *V/V* de méthanol et au maximum 0,05 pour cent *V/V* de 2-propanol.

**Résidu sec** (*2.8.16*) : au minimum 1,5 pour cent *m/m*, déterminé sur 5,0 g de teinture.

**01/2008:2386**
**corrigé 7.0**

# CARTHAME (FLEUR DE)

## Carthami flos

DÉFINITION

Fleur séchée de *Carthamus tinctorius* L.

*Teneur* : au minimum 1,0 pour cent de flavonoïdes totaux, exprimés en hypéroside ($C_{21}H_{20}O_{12}$ ; $M_r$ 464,4) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Les fleurons de carthame jaune-orange ou orange-rouge, tubulés, gamopétales et actinomorphes, sont séparés du capitule. Chacun est composé d'un tube long, filiforme, d'environ 1 cm de long et de 5 lobes égaux, effilés, lancéolés, d'environ 0,5 cm de long. De la gorge du tube s'élève le cylindre creux, formé par les anthères jaunes, soudées, dans lequel persiste le style filiforme, épaissi vers le sommet.

B. Réduisez la fleur de carthame en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune-orange. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente des fragments du tube de la corolle à épiderme formé de cellules allongées, polygonales, à parois minces ; des fragments des lobes de la corolle présentant à leur sommet un grand nombre de petites papilles arrondies très saillantes ; des fragments de parenchyme contenant des faisceaux libéro-ligneux bordés de canaux sécréteurs à contenu brun-rouge ; des fragments d'anthères constitués de cellules de forme irrégulière et à parois présentant des épaississements en bandes caractéristiques ; des fragments de style, formé dans sa partie inférieure de cellules allongées, et se terminant par un stigmate hérissé de papilles assez longues, coniques et confluentes ; des grains de pollen à exine échninulée, triporés, arrondis ou elliptiques, atteignant 60 µm de diamètre ; des prismes d'oxalate de calcium isolés ou contenus dans des cellules de parenchyme.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 1,0 g de fleur de carthame pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Traitez aux ultrasons pendant 10 min et centrifugez.

*Solution témoin.* Dissolvez 1 mg de *rutine R* et 5 mg de *quercétine dihydratée R* dans 50 mL de *méthanol R*.

Drogues végétales

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide acétique R, acide formique anhydre R, eau R, acétate d'éthyle R* (11:11:27:100 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 25 µL en bandes de 15 mm [ou 10 µL en bandes de 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 12 cm [ou 7 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez à la lumière du jour.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Quercétine : une bande jaune clair | |
| _______ | _______ |
| _______ | _______ |
| Rutine : une bande jaune clair | |
| | Une bande rouge |
| | Une bande jaune |
| | Une bande jaune |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : chauffez à 100 °C pendant 3 min. Pulvérisez la plaque encore chaude avec une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R* puis avec une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R*. Laissez sécher à l'air pendant environ 30 min. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Quercétine : une bande de fluorescence orange | |
| | Une bande de fluorescence bleue |
| _______ | _______ |
| | Une bande de fluorescence verte |
| | Une bande de fluorescence brune |
| | Une bande de fluorescence verte |
| _______ | _______ |
| Rutine : une bande de fluorescence jaune | |
| | Une bande de fluorescence jaune |
| | Une bande de fluorescence verte |
| | Une bande de fluorescence brune |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Absorbance** (*2.2.25*).

A. *Pigment jaune* : faites macérer 0,1 g de fleur de carthame pulvérisée (355) (*2.9.12*) dans 150 mL d'*eau R*, agitez pendant 1 h, filtrez sur verre fritté (40) (*2.1.2*) et complétez à 500,0 mL en lavant le résidu avec de l'*eau R*. L'absorbance est au minimum de 0,40 à 401 nm.

B. *Pigment rouge* : à 0,25 g de fleur de carthame pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 50 mL d'un mélange de 20 volumes d'*eau R* et de 80 volumes d'*acétone R*. Chauffez au bain-marie à 50 °C pendant 90 min. Laissez refroidir, filtrez sur verre fritté (40) (*2.1.2*) et complétez à 100,0 mL, en lavant le résidu avec un mélange de 20 volumes d'*eau R* et de 80 volumes d'*acétone R*. L'absorbance est au minimum de 0,40 à 518 nm.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 11,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de fleur de carthame pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 3,0 pour cent.

DOSAGE

*Solution A*. Dans un ballon de 250 mL, introduisez 0,250 g de fleur de carthame pulvérisée (180) (*2.9.12*) et ajoutez 95 mL de *méthanol R*. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Laissez refroidir et filtrez. Rincez le filtre avec 5 mL de *méthanol R*. Réunissez le filtrat et la solution de rinçage dans une fiole jaugée et complétez à 100,0 mL avec du *méthanol R*.

*Solution à examiner*. Dans une fiole jaugée, introduisez 5,0 mL de solution A et complétez à 20,0 mL avec une *solution de chlorure d'aluminium R* à 20 g/L dans du *méthanol R*.

*Solution de compensation*. Dans une fiole jaugée, introduisez 5,0 mL de solution A et complétez à 20,0 mL avec du *méthanol R*.

Après exactement 15 min, mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner à 420 nm, par rapport à la solution de compensation. Calculez la teneur pour cent en flavonoïdes totaux, exprimés en hypéroside, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A}{m}$$

en prenant 400 comme valeur de l'absorbance spécifique de l'hypéroside à 420 nm.

$A$ = absorbance de la solution à examiner à 420 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2008:1080**

# CARVI

## Carvi fructus

DÉFINITION

Méricarpe entier, sec de *Carum carvi* L.

*Teneur* : au minimum 30 mL/kg d'huile essentielle (drogue anhydre).

CARACTÈRES

Odeur qui rappelle celle de la carvone.

IDENTIFICATION

A. Le fruit de carvi est un crémocarpe, de forme pratiquement cylindrique, généralement d'une longueur de 3-6,5 mm et d'une largeur de 1-1,5 mm. Les méricarpes, généralement libres, sont brun-gris ou bruns, glabres, pratiquement falciformes avec 2 parois abruptes. Chacun d'eux porte 5 minces côtes saillantes. La coupe transversale du profil

révèle un pentagone pratiquement régulier, 4 bandelettes sur la surface dorsale et 2 sur la surface commissurale, qui peuvent être observées à la loupe.

B. Réduisez le carvi en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments des cellules sécrétrices composés de cellules sécrétrices polygonales à parois fines brunes ou brun-jaune, souvent associées à une couche de cellules allongées transversalement de 8-12 µm de large et à parois fines ; des fragments d'épicarpe à parois épaisses et occasionnellement des stomates du type anomocytique (*2.8.3*) ; de très nombreux fragments d'albumen contenant des grains d'aleurone, des gouttelettes d'huile grasse et de très petits cristaux d'oxalate de calcium formant des micro-rosettes ; des vaisseaux en forme de spirale accompagnés de fibres sclérenchymateuses ; rarement quelques faisceaux de fibres provenant du carpophore. La poudre peut présenter des scléréides rectangulaires ou sub-rectangulaires du mésocarpe à paroi modérément épaissie et ponctuée.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Agitez 0,5 g de carvi pulvérisé (710) (*2.9.12*) avec 5,0 mL d'*acétate d'éthyle R* pendant 2-3 min. Filtrez sur 2 g de *sulfate de sodium anhydre R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 2 µL de *carvone R* et 5 µL d'*huile d'olive R* dans 1,0 mL d'*acétate d'éthyle R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 20 µL de solution à examiner et 10 µL de solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et la solution témoin présentent, sur un fond clair, au milieu de la plaque, une bande d'atténuation de fluorescence (carvone).

*Détection B* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R*. Chauffez en observant à 100-105 °C pendant 2-4 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats B* : les bandes dues à la carvone apparaissent en brun orangé foncé. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente au-dessus de la bande due à la carvone une bande violette semblable quant à sa position et sa coloration à la bande due aux triglycérides de l'huile d'olive dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande violette de faible intensité proche du front du solvant due aux hydrocarbures terpéniques, et sur la partie inférieure, quelques bandes de faible intensité, pour la plupart gris-violet ou brunes.

## ESSAI

**Eau** (*2.2.13*) : au maximum 100 mL/kg, déterminé sur 10,0 g de carvi pulvérisé.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 7,0 pour cent.

## DOSAGE

Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez 10,0 g de carvi pulvérisé (710) (*2.9.12*) immédiatement avant la détermination, un ballon à fond rond de 500 mL, 200 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Ajoutez 0,50 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 90 min.

**01/2008:1817**

# CARVI (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Carvi aetheroleum

## DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau, à partir des fruits secs de *Carum carvi* L.

## CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, incolore ou jaune.

## IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 40 µL d'huile essentielle de carvi dans 1,0 mL de *toluène R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 µL de *carvone R* et 5 µL de *carvéol R* dans 1,0 mL de *toluène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 2 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 5 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| Carvone : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence (carvone) |
| ——— | ——— |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min. Examinez immédiatement à la lumière du jour.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité sont présentes particulièrement dans le tiers inférieur du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande violet-rouge |
| ——— | ——— |
| | Une bande violet-rouge |
| Carvone : une bande rouge à brun-orange | Une bande rouge intense à brun-orange (carvone) |
| ——— | ——— |
| Carvéol : une bande violet-rouge | Une bande violet-rouge (carvéol) |
| | Une bande bleu-violet |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.
   *Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables, quant à leur temps de rétention, aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,904 à 0,920.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,484 à 1,490.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : + 65° à + 81°.

**Indice d'acide** (*2.5.1*) : au maximum 1,0, déterminé sur 5,00 g d'huile essentielle de carvi.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,200 g d'huile essentielle de carvi dans de l'*heptane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 5 µL de *β-myrcène R*, 80 µL de *limonène R*, 5 µL de *dihydrocarvone R*, 100 µL de *carvone R* et 5 µL de *carvéol R* dans de l'*heptane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 10 µL de *carvone R* dans de l'*heptane R* et complétez à 10 mL avec le même solvant. Prélevez 0,1 mL de cette solution et complétez à 10 mL avec de l'*heptane R*.

*Colonne* :
- *matériau* : silice fondue,
- *dimensions* : *l* = 30 m, Ø = 0,53 mm,
- *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur de film 1 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Rapport de division* : 1:50.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 5 | 60 |
| | 5 - 68 | 60 → 250 |
| | 68 - 75 | 250 |
| Chambre à injection | | 250 |
| Détecteur | | 260 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1,0 µL.

*Ordre d'élution* : ordre indiqué pour la préparation de la solution témoin (a). Notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin (a) :
- *résolution* : au minimum 4,5 entre les pics dus au β-myrcène et au limonène.

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les composants de la solution témoin.

*Limites* :
- *β-myrcène* : 0,1 pour cent à 1,0 pour cent,
- *limonène* : 30,0 pour cent à 45,0 pour cent,
- *trans-dihydrocarvone* : au maximum 2,5 pour cent,
- *carvone* : 50,0 pour cent à 65,0 pour cent,
- *trans-carvéol* : au maximum 2,5 pour cent.
- *limite d'exclusion* : la surface du pic du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b).

**Pureté chirale**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 20 mg d'huile essentielle de carvi dans de l'*heptane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg de *(–)-carvone R* et 10 mg de *carvone R1* dans de l'*heptane R* puis complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :
- *matériau* : silice fondue,
- *dimensions* : *l* = 30 m, Ø = 0,25 mm,
- *phase stationnaire* : *β-cyclodextrine modifiée pour chromatographie chirale R1* (épaisseur du film 0,25 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 2,0 mL/min.

*Rapport de division* : 1:30.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 80 | 50 → 170 |
| Chambre à injection | | 230 |
| Détecteur | | 230 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL.

*Conformité du système* : solution témoin :
- *résolution* : au minimum 2,4 entre les pics dus à la (–)-carvone (1[er] pic) et à la carvone R1 (2[e] pic).

Calculez la teneur pour cent en (–)-carvone à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1}{A_1 + A_2} \times 100$$

$A_1$ = surface du pic dû à la (–)-carvone,

$A_2$ = surface du pic dû à la carvone R1.

*Limite* :
- *(–)-carvone* : au maximum 1 pour cent.

CONSERVATION

A une température ne dépassant 25 °C.

**01/2008:0105**
**corrigé 6.0**

# CASCARA

## Rhamni purshianae cortex

DÉFINITION

Ecorce séchée, entière ou fragmentée, de *Rhamnus purshianus* D.C. (*Frangula purshiana* (D.C.) A. Gray ex J. C. Cooper).

*Teneur* : au minimum 8,0 pour cent d'hétérosides hydroxyanthracéniques, dont au minimum 60 pour cent sont constitués par des cascarosides, les 2 groupes étant exprimés en cascaroside A ($C_{27}H_{32}O_{14}$ ; $M_r$ 580,5) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. L'écorce se présente en fragments légèrement incurvés ou presque plats, généralement d'une épaisseur de 1-5 mm, de longueur et de largeur très variables. La surface externe, grise ou brun foncé-gris, présente des lenticelles peu fréquentes et orientées transversalement. Elle est habituellement plus ou moins recouverte de lichens blanchâtres, de mousses épiphytes et d'hépatiques foliacées. La face interne est jaune ou brun-rouge ou presque noire ; elle présente des stries fines, longitudinales ; elle se colore

en rouge par addition d'alcalis. La cassure jaune est courte et granuleuse sur la face externe, un peu fibreuse sur la face interne.

B. Réduisez le cascara en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fibres libériennes groupées, partiellement lignifiées, accompagnées de files de cellules cristallifères à prismes d'oxalate de calcium ; des groupes de cellules scléreuses entourées de cellules cristallifères ; des macles d'oxalate de calcium ; des cellules parenchymateuses contenant une matière colorante jaune qui se colore en rouge foncé par addition d'alcalis ; des cellules du suber et souvent des éléments d'épiphytes. Ces derniers peuvent être des feuilles d'hépatiques, entières ou en fragments, dont le limbe dépourvu de nervure médiane comporte une seule assise de cellules isodiamétriques, ou des feuilles de mousses à limbe d'une seule assise de cellules allongées avec une nervure médiane à plusieurs assises cellulaires.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai A « Autres espèces de *Rhamnus* ; anthrones ».

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente plusieurs bandes brun-rouge d'intensité différente : 4 sont peu apparentes, 3 d'entre elles sont situées environ au milieu du chromatogramme et 1 dans le tiers inférieur, alors qu'une bande fortement colorée apparaît dans le tiers supérieur du chromatogramme. Examinez la plaque en lumière ultraviolette à 365 nm. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente plusieurs bandes de même fluorescence situées au-dessus et surtout au-dessous (cascarosides) de celle due à la barbaloïne dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

D. Chauffez au bain-marie 0,2 g de cascara pulvérisé (180) (*2.9.12*) avec 50 mL d'*eau R* pendant 15 min. Laissez refroidir et filtrez. A 10 mL du filtrat, ajoutez 20 mL d'*acide chlorhydrique R1* et chauffez au bain-marie pendant 15 min. Laissez refroidir et transvasez la solution dans une ampoule à décantation, puis agitez avec 3 fois 20 mL d'*éther R*. Conservez la phase aqueuse (solution A). Rassemblez les 3 phases éthérées et agitez avec 10 mL d'*ammoniaque diluée R2*. Il se développe une coloration violet-rouge dans la phase aqueuse. Dans un petit ballon, introduisez la solution A, ajoutez 5 g de *chlorure ferrique R* et chauffez au bain-marie pendant 30 min. Laissez refroidir, transvasez cette solution dans une ampoule à décantation et agitez avec 15 mL d'*éther R*. Lavez la phase éthérée avec 10 mL d'*eau R*, rejetez la phase aqueuse et agitez la phase éthérée avec 5 mL d'*ammoniaque diluée R2*. Il se développe une coloration rouge dans la phase aqueuse.

## ESSAI

**Autres espèces de *Rhamnus* ; anthrones**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Chauffez à ébullition 0,5 g de cascara pulvérisé (180) (*2.9.12*) avec 5 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Refroidissez et centrifugez. Décantez immédiatement le liquide surnageant. Utilisez cette solution dans les 30 min.

*Solution témoin*. Dissolvez 20 mg de *barbaloïne R* dans de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaques* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (2 plaques).

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R, acétate d'éthyle R* (13:17:100 *V/V/V*).

A. *Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air pendant 5 min.

*Détection* : pulvérisez environ 10 mL d'une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 50 g/L dans l'*éthanol à 50 pour cent V/V R* et chauffez à 100-105 °C pendant 15 min. Examinez immédiatement après le chauffage.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente en son milieu une bande brun-rouge due à la barbaloïne. Examinez la plaque en lumière ultraviolette à 365 nm. La bande due à la barbaloïne présente une fluorescence brun-jaune intense. Dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, il n'apparaît pas de bande fluorescente brun-orangé entre la bande due à la barbaloïne et celles dues aux cascarosides.

B. *Dépôt* : 10 µL de solution à examiner, en bande.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air pendant maximum 5 min.

*Détection* : pulvérisez immédiatement une solution de *bleu de nitrotétrazolium R* à 5 g/L dans le *méthanol R*. Examinez immédiatement.

*Résultats* : il n'apparaît aucune bande violette ou bleu-gris.

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 1 pour cent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (180) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 7,0 pour cent.

## DOSAGE

*Effectuez le dosage en 24 h, à l'abri d'une lumière vive.*

A 100 mL d'*eau R* bouillante, ajoutez en agitant 1,00 g de cascara pulvérisé (180) (*2.9.12*). Maintenez l'ébullition et l'agitation pendant 5 min. Laissez refroidir et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Agitez, filtrez et jetez les 20 premiers millilitres du filtrat. Transvasez 10,0 mL du filtrat dans une ampoule à décantation, ajoutez 0,1 mL d'*acide chlorhydrique 1 M* et agitez avec 2 fois 20 mL d'un mélange de 1 volume d'*éther R* et de 3 volumes d'*hexane R*. Réunissez les phases organiques, lavez-les avec 5 mL d'*eau R* et jetez la phase organique. Ajoutez l'eau de lavage à la phase aqueuse et agitez avec 4 fois 30 mL d'*acétate d'éthyle R* extemporanément saturé d'*eau R* (à 150 mL d'*acétate d'éthyle R*, ajoutez 15 mL d'*eau R*, agitez pendant 3 min, puis laissez reposer). Laissez reposer chaque fois jusqu'à ce que la phase organique soit limpide. Réunissez les solutions d'acétate d'éthyle. Utilisez la phase aqueuse pour le dosage des cascarosides et la phase organique pour le dosage des hétérosides hydroxyanthracéniques autres que les cascarosides.

**Hétérosides hydroxyanthracéniques autres que les cascarosides**. Dans un ballon approprié, introduisez la phase organique, éliminez le solvant par distillation, puis évaporez presque à siccité. Dissolvez le résidu dans 0,3-0,5 mL de *méthanol R*. Transvasez dans un ballon jaugé, lavez le 1$^{er}$ ballon à l'*eau R* chaude, ajoutez l'eau de lavage à la solution méthanolique. Laissez refroidir et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R*. Dans un ballon de 100 mL à col rodé et à fond rond contenant 2 g de *chlorure ferrique R* et 12 mL d'*acide chlorhydrique R*, introduisez 20,0 mL de cette solution. Adaptez un réfrigérant à reflux et placez le ballon dans un bain-marie de façon que le niveau de l'eau soit au-dessus de celui du liquide dans le ballon et chauffez pendant 4 h. Laissez refroidir. Dans une ampoule à décantation, introduisez la solution, lavez successivement le ballon avec 3-4 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M* et 3-4 mL d'*eau R* et ajoutez les eaux de lavage au contenu de l'ampoule à décantation. Agitez le contenu de l'ampoule à décantation avec 3 fois 30 mL d'un mélange de 1 volume d'*éther R* et de 3 volumes d'*hexane R*. Réunissez les phases organiques, lavez avec 2 fois 10 mL d'*eau R* et rejetez les eaux de lavage. Complétez la phase organique à 100,0 mL avec le mélange d'éther et d'hexane. Prélevez-en 20,0 mL et évaporez avec précaution au bain-marie à siccité. Dissolvez le résidu dans 10,0 mL d'une solution d'*acétate de magnésium R* à 5 g/L dans le *méthanol R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à

Drogues végétales

440 nm et à 515 nm en utilisant le *méthanol R* comme liquide de compensation. Si le rapport entre l'absorbance mesurée à 515 nm et l'absorbance mesurée à 440 nm est inférieur à 2,4, le dosage n'est pas valide.

Calculez la teneur pour cent en hétérosides hydroxyanthracéniques autre que les cascarosides, exprimés en cascaroside A à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 6,95}{m}$$

en prenant 180 comme valeur de l'absorbance spécifique.

$A$ = absorbance à 515 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**Cascarosides**. Prélevez la phase aqueuse et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R*. Traitez 20,0 mL de cette solution comme décrit ci-dessus dans le dosage des hétérosides hydroxyanthracéniques autres que les cascarosides. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 440 nm et à 515 nm. Si le rapport entre l'absorbance mesurée à 515 nm et l'absorbance mesurée à 440 nm est inférieur à 2,7, le dosage n'est pas valide.

Calculez la teneur pour cent en cascarosides, exprimés en cascaroside A, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 6,95}{m}$$

en prenant 180 comme valeur de l'absorbance spécifique.

$A$ = absorbance à 515 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2008:1844**

# CASCARA (EXTRAIT SEC TITRÉ DE)

## Rhamni purshianae extractum siccum normatum

DÉFINITION

Extrait sec titré obtenu à partir de *Cascara (0105).*

*Teneur* : 90 pour cent à 110 pour cent de la teneur nominale en hétérosides hydroxyanthracéniques, exprimés en cascaroside A ($C_{27}H_{32}O_{14}$ ; $M_r$ 580,5), indiquée sur l'étiquette ; au minimum 60 pour cent des hétérosides hydroxyanthracéniques sont des cascarosides, exprimés en cascaroside A. La teneur nominale en hétérosides hydroxyanthracéniques est comprise entre 8,0 pour cent et 25,0 pour cent *m/m* (extrait desséché).

PRODUCTION

L'extrait sec titré de cascara est produit à partir de la drogue par une méthode appropriée, avec de l'eau bouillante ou un solvant hydroalcoolique au moins équivalent en concentration à l'éthanol à 60 pour cent *V/V*.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre fluide brune.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 0,2 g d'extrait à examiner, ajoutez 5 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Chauffez à ébullition, puis refroidissez et centrifugez. Recueillez immédiatement le surnageant et utilisez-le dans les 30 min.

*Solution témoin.* Dissolvez 20 mg de *barbaloïne R* et 2 mg d'*émodine R* dans de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R*, puis complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R, acétate d'éthyle R* (13:17:100 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 2 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air pendant 5 min.

*Détection* : pulvérisez une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 50 g/L dans l'*éthanol à 50 pour cent V/V R* et chauffez à 100-105 °C pendant 15 min. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Emodine : une bande de fluorescence rouge | Une faible bande de fluorescence rouge |
| _______ | _______ |
| Barbaloïne : une bande de fluorescence brun-jaune | Une bande de fluorescence brun-jaune<br>Une bande de fluorescence bleue |
| _______ | _______ |
| | Une intense bande de fluorescence brun-jaune<br>3 bandes de fluorescence brun-jaune |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.8.17*) : au maximum 5,0 pour cent.

DOSAGE

*Effectuez le dosage dans les 24 h, à l'abri de la lumière vive.*

A 0,500 g d'extrait à examiner, ajoutez 80 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Agitez, puis laissez reposer à l'obscurité pendant au moins 8 h. Complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Agitez, puis filtrez en jetant les 20 premiers millilitres de filtrat. Transvasez 10,0 mL du filtrat dans une ampoule à décantation, ajoutez 0,1 mL d'*acide chlorhydrique 1 M* et agitez avec 2 fois 20 mL d'un mélange de 1 volume d'*éther R* et de 3 volumes d'*hexane R*. Réunissez les phases organiques et lavez-les avec 5 mL d'*eau R*. Jetez la phase organique et ajoutez l'eau de lavage à la phase hydroalcoolique. Agitez avec 4 fois 30 mL d'*acétate d'éthyle R* extemporanément saturé d'*eau R* (préparé comme suit : à 150 mL d'*acétate d'éthyle R*, ajoutez 15 mL d'*eau R*, agitez pendant 3 min et laissez reposer), en laissant à chaque fois les phases se séparer jusqu'à limpidité de la phase organique. Réunissez les extraits d'acétate d'éthyle. Utilisez la phase aqueuse pour le dosage des cascarosides, et la phase organique pour le dosage des hétérosides hydroxyanthracéniques autres que les cascarosides.

**Hétérosides hydroxyanthracéniques autres que les cascarosides**. Transférez la phase organique dans un ballon à fond rond et éliminez le solvant par distillation, en évaporant presque à siccité. Dissolvez le résidu dans 0,5 mL de *méthanol R*, ajoutez 10 mL d'*eau R* à 40 °C et transvasez dans une fiole jaugée de 50 mL. Rincez le ballon à fond rond avec de l'*eau R* à 40 °C et ajoutez l'eau de rinçage à la solution hydrométhanolique. Laissez refroidir et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R*. Transférez 20,0 mL de cette solution dans un ballon de 100 mL à fond rond et à col rodé contenant 2 g de *chlorure ferrique R* et 12 mL d'*acide chlorhydrique R*. Adaptez un réfrigérant à reflux et placez le ballon dans un bain-marie, de façon que le niveau de l'eau dépasse celui du liquide contenu dans le ballon, puis chauffez pendant 4 h. Laissez refroidir. Transvasez la solution dans une ampoule à décantation et rincez le ballon successivement avec 4 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M*

et 4 mL d'*eau R*, et ajoutez les liquides de rinçage au contenu de l'ampoule à décantation. Agitez le contenu de l'ampoule à décantation avec 3 fois 30 mL d'un mélange de 1 volume d'*éther R* et de 3 volumes d'*hexane R*. Réunissez les phases organiques, lavez-les avec 2 fois 10 mL d'*eau R* et jetez les eaux de lavage. Complétez la phase organique à 100,0 mL avec un mélange de 1 volume d'*éther R* et de 3 volumes d'*hexane R*. Prélevez 20,0 mL de cette solution et évaporez au bain-marie à siccité, avec précaution. Dissolvez le résidu dans 10,0 mL d'une solution d'*acétate de magnésium R* à 5 g/L dans le *méthanol R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 440 nm et à 515 nm en utilisant du *méthanol R* comme liquide de compensation. Si le rapport entre l'absorbance à 515 nm et l'absorbance à 440 nm est inférieur à 2,4, le dosage n'est pas valable.

Calculez la teneur pour cent en hétérosides hydroxyanthracéniques autres que les cascarosides, exprimés en cascaroside A, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 6,95}{m}$$

en prenant 180 comme valeur de l'absorbance spécifique.

$A$ = absorbance à 515 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**Cascarosides**. Prélevez la phase aqueuse et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R*. Traitez 20,0 mL de cette solution comme décrit ci-dessus dans le dosage des hétérosides hydroxyanthracéniques autres que les cascarosides. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 440 nm et à 515 nm. Si le rapport entre l'absorbance à 515 nm et l'absorbance à 440 nm est inférieur à 2,7, le dosage n'est pas valable.

Calculez la teneur pour cent en cascarosides, exprimés en cascaroside A, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 6,95}{m}$$

en prenant 180 comme valeur de l'absorbance spécifique.

$A$ = absorbance à 515 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique la teneur nominale en hétérosides hydroxyanthracéniques, exprimés en cascaroside A.

**01/2008:1301**
**corrigé 6.0**

# CENTAURÉE (PETITE)

## Centaurii herba

## DÉFINITION

Parties aériennes fleuries, séchées, entières ou fragmentées de *Centaurium erythraea* Rafn s. l. comprenant *C. majus* (H. et L.) Zeltner et *C. suffruticosum* (Griseb.) Ronn. (syn. : *Erythraea centaurium* Persoon ; *C. umbellatum* Gilibert ; *C. minus* Gars.).

## CARACTÈRES

Saveur amère.

## IDENTIFICATION

A. La tige, vert clair à brun foncé, est cylindrique et creuse ; elle porte des crêtes longitudinales et ne se ramifie que dans sa partie supérieure. Les feuilles, sessiles, sont entières, décussées et présentent un limbe de forme ovale à lancéolée ; leur longueur atteint 3 cm. Les 2 faces de la feuille sont glabres et vertes à vert-brun. L'inflorescence est disposée en cyme bipare. Le calice tubuleux est vert et comporte 5 dents lancéolées acuminées. La corolle se compose d'un tube blanchâtre se divisant en 5 lobes lancéolés rose à rouge, d'une longueur d'environ 5-8 mm. L'androcée renferme 5 étamines attachées au sommet de la corolle tubulaire. Le gynécée présente un ovaire supère, un style court, un large stigmate bifide et contient de nombreux ovules. Des capsules cylindriques d'une longueur d'environ 7-10 mm, contenant de petites graines brunes fortement ridées, sont souvent présentes.

B. Réduisez la petite centaurée en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune-vert ou brunâtre. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de la tige comprenant des groupes de fibres lignifiées associés à des vaisseaux étroits, à des trachéides et parfois à des vaisseaux à épaississement spiralé, ainsi que des cellules parenchymateuses ponctuées provenant de la moelle et des rayons médullaires ; des fragments du limbe foliaire à cellules épidermiques sinueuses et cuticule striée, notamment sur les bords et autour des stomates, avec de nombreux stomates généralement anisocytiques (*2.8.3*) et des fragments du mésophylle à cellules palissadiques contenant chacune un prisme unique ou, plus rarement, une macle d'oxalate de calcium ; des fragments du calice, à épiderme formé de cellules à paroi droite, et des fragments de la corolle, à épiderme interne présentant des papilles obtuses et une cuticule à stries radiales ; des fragments de l'endothécium, dont les parois cellulaires présentent des épaississements réticulés ou nervurés ; des grains de pollen jaunes, de forme triangulaire arrondie ou elliptique, d'un diamètre d'environ 30 µm, à exine distinctement ponctuée et à 3 pores germinatifs ; des fragments de la paroi des capsules, composés d'assises entrecroisées de cellules fusiformes ; des gouttelettes huileuses provenant des graines, fragments d'épiderme des téguments montrant de larges saillies brunes et une surface ponctuée.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de petite centaurée pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 25 mL de *méthanol R* puis agitez pendant 15 min et filtrez. Evaporez le filtrat à siccité, sous pression réduite et à une température ne dépassant pas 50 °C. Reprenez le résidu par de petites quantités de *méthanol R* de façon à obtenir 5 mL de solution ; celle-ci peut présenter un sédiment.

*Solution témoin*. Dissolvez 1 mg de *rutine R* et 1 mg de *swertiamarine R* dans du *méthanol R* puis complétez à 1 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice* $F_{254}$ *pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice* $F_{254}$ *pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *eau R, acide formique anhydre R, formiate d'éthyle R* (4:8:88 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 5 µL] en bandes.

*Développement* : dans une cuve non saturée sur un parcours de 12 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes moins intenses d'atténuation de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| ——— | ——— |
| Swertiamarine : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence marquée (swertiamarine) |
| Rutine : une bande d'atténuation de fluorescence | |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes colorées, moins intenses peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| ——— | ——— |
| Swertiamarine : une bande brune | Une bande brune (swertiamarine) |
| Rutine : une bande jaune | |
| | Une bande gris-brun |
| | Une bande jaune |
| | Une bande grise |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3 pour cent.

**Indice d'amertume** (*2.8.15*) : au minimum 2000.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de petite centaurée pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 6,0 pour cent.

**01/2008:1860**
**corrigé 6.0**

# CHARDON MARIE

## Silybi mariani fructus

DÉFINITION

Fruit mûr, dépourvu de pappus, de *Silybum marianum* L. Gaertner.

*Teneur* : au minimum 1,5 pour cent de silymarine, exprimée en silibinine ($C_{25}H_{22}O_{10}$ ; $M_r$ 482,4) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Absence d'odeur rance.

IDENTIFICATION

A. L'akène est obovale allongé, fortement comprimé, il mesure environ 6-8 mm de longueur, 3 mm de largeur et 1,5 mm d'épaisseur ; la surface externe est lisse et luisante, à fond gris ou brun pâle plus ou moins strié de bandes longitudinales brun foncé de sorte que la couleur d'ensemble va du gris pâle au brun ; le fruit est fuselé à la base et surmonté à l'apex d'une extension jaune pâle, brillante, formant une collerette d'environ 1 mm de hauteur autour des restes du style. En coupe transversale, le fruit présente une étroite zone externe brune et 2 grands cotylédons huileux blancs et denses.

B. Réduisez le chardon marie en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune-brun avec des particules plus sombres. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de l'épicarpe composé de cellules incolores, de forme polygonale en vue de dessus, à lumen apparaissant selon l'orientation, soit assez grand, soit petit et en fente ; des groupes de cellules parenchymateuses de l'assise pigmentée, dont certaines contiennent une matière colorante d'aspect rouge vif ; de très nombreux groupes de grandes scléréides du tégument, à paroi ponctuée jaune vif et lumen étroit ; quelques fragments de parenchyme constitué de petites cellules à paroi ponctuée et épaissie en chapelet ; de nombreuses cellules parenchymateuses à paroi mince provenant des cotylédons, contenant des globules huileux et des macles d'oxalate de calcium dispersées ; quelques rares cristaux d'oxalate de calcium prismatiques de plus grande taille.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de chardon marie pulvérisé (500) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Chauffez à reflux dans un bain-marie à 70 °C pendant 5 min. Refroidissez et filtrez. Evaporez le filtrat à siccité et reprenez le résidu dans 1,0 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 2 mg de *silibinine R* et 5 mg de *taxifoline R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, acétone R, chlorure de méthylène R* (8,5:16,5:75 *V/V/V*).

*Dépôt* : 30 µL de solution à examiner et 10 µL de solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez sur la plaque chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R*, puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R*. Laissez sécher pendant 30 min et examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence orange et vert-jaune sont présentes entre les bandes de la silibinine et de la taxifoline dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| Silibinine : une bande de fluorescence vert-jaune | Une bande de fluorescence vert-jaune (silibinine) |
| ——— | ——— |
| Taxifoline : une bande de fluorescence orange | Une bande de fluorescence orange (taxifoline) |
| | Une bande de fluorescence vert-jaune (silicristine) |
| ——— | ——— |
| | Une bande de fluorescence bleu clair (ligne de dépôt) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 8,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de chardon marie pulvérisé (500) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 8,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Dans un appareil à extraction continue, introduisez 5,00 g de chardon marie pulvérisé (500) (*2.9.12*). Ajoutez 100 mL d'*éther de pétrole R* et chauffez au bain-marie pendant 8 h. Laissez sécher la drogue dégraissée à température ambiante. Procédez à une nouvelle extraction dans un appareil à extraction continue, au bain-marie, avec 100 mL de *méthanol R* pendant 5 h. Evaporez l'extrait méthanolique sous vide jusqu'à obtention d'un volume d'environ 30 mL. Filtrez dans une fiole jaugée de 50 mL et complétez à 50,0 mL avec du *méthanol R* en rinçant l'appareil à extraction et le filtre. Prélevez 5,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec du *méthanol R*.

*Solution témoin.* Dissolvez une quantité d'*extrait sec titré de chardon marie SCR* correspondant à 5,0 mg de silibinine ($m_1$ g) dans du *méthanol R* et complétez à 50,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,125 m, Ø = 4 mm,

– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acide phosphorique R, méthanol R, eau R* (0,5:35:65 *V/V/V*),

– *phase mobile B* : *acide phosphorique R, méthanol R, eau R* (0,5:50:50 *V/V/V*).

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 28 | 100 → 0 | 0 → 100 |
| 28 - 35 | 0 | 100 |
| 35 - 36 | 0 → 100 | 100 → 0 |
| 36 - 51 | 100 | 0 |

*Débit* : 0,8 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 288 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Temps de rétention* : silibinine B = environ 30 min. Si nécessaire, ajustez les intervalles de temps dans la programmation du gradient.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,8 entre les pics dus à la silibinine A et à la silibinine B,

– le chromatogramme obtenu est semblable au chromatogramme fourni avec l'*extrait sec titré de chardon marie SCR*.

Localisez les pics dus à la silicristine, à la silidianine, à la silibinine A, à la silibinine B, à l'isosilibiline A et à l'isosilibinine B en comparant avec le chromatogramme fourni avec l'*extrait sec titré de chardon marie SCR*. Dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, le pic dû à la silidianine peut être de taille variable, être absent ou constituer le pic principal. Déterminez la surface des pics dus à la silicristine, la silidianine, la silibinine A, la silibinine B, l'isosilibinine A et l'isosilibinine B.

Calculez la teneur pour cent en silymarine, exprimée en silibinine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{(A1 + A2 + A3 + A4 + A5 + A6) \times m_1 \times p \times 1000}{(A7 + A8) \times m_2 \times (100 - d)}$$

*A1* = surface du pic dû à la silicristine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

*A2* = surface du pic dû à la silidianine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

*A3* = surface du pic dû à la silibinine A dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

*A4* = surface du pic dû à la silibinine B dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

*A5* = surface du pic dû à l'isosilibinine A dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

*A6* = surface du pic dû à l'isosilibinine B dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

*A7* = surface du pic dû à la silibinine A dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

*A8* = surface du pic dû à la silibinine B dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse d'*extrait sec titré de chardon marie SCR* utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,

$m_2$ = masse de la prise d'essai, en grammes,

*p* = teneur pour cent totale en silibinine A et silibinine B dans l'*extrait sec titré de chardon marie SCR,*

*d* = perte à la dessiccation du chardon marie, en pourcentage.

**01/2008:2071**

# CHARDON MARIE (EXTRAIT SEC PURIFIÉ ET TITRÉ DE)

## Silybi mariani extractum siccum raffinatum et normatum

DÉFINITION

Extrait sec purifié et titré produit à partir de *Chardon marie (1860).*

*Teneur* : 90 pour cent à 110 pour cent de la teneur nominale en silymarine, exprimée en silibine ($C_{25}H_{22}O_{10}$ ; $M_r$ 482,4), indiquée sur l'étiquette. La teneur nominale en silymarine est comprise entre 30 pour cent *m/m* et 65 pour cent *m/m* (extrait desséché).

La teneur en silymarine se décompose comme suit :

– *somme des teneurs en silicristine et silidianine* (chacun $C_{25}H_{22}O_{10}$ ; $M_r$ 482,4) : 20 pour cent à 45 pour cent de la teneur en silymarine totale,

Drogues végétales

– *somme des teneurs en silibinine A et silibinine B* (chacun $C_{25}H_{22}O_{10}$ ; $M_r$ 482,4) : 40 pour cent à 65 pour cent de la teneur en silymarine totale,
– *somme des teneurs en isosilibinine A et isosilibinine B* (chacun $C_{25}H_{22}O_{10}$ ; $M_r$ 482,4) : 10 pour cent à 20 pour cent de la teneur en silymarine totale.

PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec un ou plusieurs des solvants suivants :

– acétate d'éthyle,
– acétone ou mélange d'acétone et d'eau,
– éthanol ou mélange d'éthanol et d'eau,
– méthanol ou mélange de méthanol et d'eau.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre amorphe brun-jaune.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Dissolvez 0,250 g d'extrait à examiner dans 5 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 2 mg de *silibinine R* et 5 mg de *taxifoline R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, acétone R, chlorure de méthylène R* (8,5:16,5:75 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 8 µL] de solution à examiner et 10 µL [ou 2 µL] de solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R*, puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R*. Laissez sécher la plaque à l'air pendant environ 30 min et examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence vert-jaune peuvent être présentes entre les bandes dues à la silibinine et à la taxifoline dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Silibinine : une bande de fluorescence vert-jaune | Une bande de fluorescence vert-jaune (silibinine) |
| _____ | _____ |
| Taxifoline : une bande de fluorescence orange | Une bande de fluorescence orange (taxifoline)<br>Une bande de fluorescence vert-jaune |
| _____ | _____ |
| | Une bande de fluorescence (ligne de dépôt) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.8.17*) : au maximum 5,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Dissolvez 60,0 mg d'extrait à examiner dans du *méthanol R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin.* Dissolvez une quantité d'*extrait sec titré de chardon marie SCR* correspondant à 10,0 mg ($m_1$ g) de silibinine dans du *méthanol R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,125 m, Ø = 4 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acide phosphorique R, méthanol R, eau R* (0,5:35:65 *V/V/V*),
– *phase mobile B* : *acide phosphorique R, méthanol R, eau R* (0,5:50:50 *V/V/V*),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 28 | 100 → 0 | 0 → 100 |
| 28 - 35 | 0 | 100 |
| 35 - 36 | 0 → 100 | 100 → 0 |
| 36 - 51 | 100 | 0 |

*Débit* : 0,8 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 288 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Temps de rétention* : silibinine B = environ 30 min ; si nécessaire, ajustez les intervalles de temps dans la programmation du gradient.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,8 entre les pics dus à la silibinine A et à la silibinine B,
– le chromatogramme obtenu est semblable au chromatogramme fourni avec l'*extrait sec titré de chardon marie SCR*.

Localisez les pics dus à la silicristine, à la silidianine, à la silibinine A, à la silibinine B, à l'isosilibinine A et à l'isosilibinine B en utilisant le chromatogramme fourni avec l'*extrait sec titré de chardon marie SCR*. Dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, le pic dû à la silidianine peut être de taille variable ou être absent.

Calculez la teneur pour cent en silymarine totale, exprimée en silibinine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{(F_1 + F_2 + F_3 + F_4 + F_5 + F_6) \times m_1}{(F_7 + F_8) \times m_2}$$

Calculez la teneur pour cent totale en silicristine et silidianine, par rapport à la teneur en silymarine totale, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{(F_1 + F_2) \times 100}{F_1 + F_2 + F_3 + F_4 + F_5 + F_6}$$

Calculez la teneur pour cent totale en silibinine A et silibinine B, par rapport à la teneur en silymarine totale, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{(F_3 + F_4) \times 100}{F_1 + F_2 + F_3 + F_4 + F_5 + F_6}$$

Calculez la teneur pour cent totale en isosilibinine A et isosilibinine B, par rapport à la teneur en silymarine totale, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{(F_5 + F_6) \times 100}{F_1 + F_2 + F_3 + F_4 + F_5 + F_6}$$

$F_1$ = surface du pic dû à la silicristine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_2$ = surface du pic dû à la silidianine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_3$ = surface du pic dû à la silibinine A dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_4$ = surface du pic dû à la silibinine B dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_5$ = surface du pic dû à l'isosilibinine A dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_6$ = surface du pic dû à l'isosilibinine B dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_7$ = surface du pic dû à la silibinine A dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$F_8$ = surface du pic dû à la silibinine B dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de silibinine dans la solution témoin, en grammes,

$m_2$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2008:1861**
**corrigé 6.0**

# CHÉLIDOINE

## Chelidonii herba

DÉFINITION

Parties aériennes, séchées, entières ou fragmentées, de *Chelidonium majus* L, récoltées pendant la floraison.

*Teneur* : au minimum 0,6 pour cent d'alcaloïdes totaux, exprimés en chélidonine ($C_{20}H_{19}NO_5$ ; $M_r$ 353,4) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Les tiges, jaunâtres ou brun-vert, sont arrondies, cannelées, creuses et souvent collabées, faiblement pubescentes ; elles ont un diamètre de 3-7 mm. Les feuilles sont minces, irrégulièrement pennées, les folioles ovales ou oblongues avec des bords grossièrement dentés, le foliole terminal souvent trilobé ; leur face adaxiale est vert-bleu et glabre, leur face abaxiale plus pâle et pubescente, surtout dans les veines. Les fleurs ont 2 sépales profonds concavo-convexes, se détachant facilement et 4 pétales jaunes écartés, approximativement ovales, de 8-10 mm de long ; les étamines sont nombreuses, jaunes et le style court s'élève de l'ovaire supérieur ; les fruits immatures, longs et capsulaires sont rarement présents.

B. Réduisez la chélidoine en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-gris sombre ou vert-brun. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : de nombreux fragments de feuille en vue de surface et des cellules épidermiques avec des parois sinueuses ; des stomates de type anomocytiques (*2.8.3*) sont uniquement présents sur leur face abaxiale ; de longs poils tecteurs, unisériés, avec des parois fines et habituellement fragmentées ; du tissu vasculaire des feuilles et des tiges avec des groupes de fibres, des vaisseaux ponctués et épaissis en spirale et des tubes laticifères associés à contenu brun-jaune ; des fragments occasionnels de corolle composés de cellules à paroi mince, partiellement papilleuses contenant de nombreuses gouttelettes d'huile jaune pâle ; des grains de pollen sphériques d'un diamètre d'environ 30-40 µm avec 3 pores et à exine finement ponctuée.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 0,4 g de chélidoine pulvérisée (710) (*2.9.12*), ajoutez 50 mL d'*acide acétique dilué R*. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Refroidissez et filtrez. Ajoutez au filtrat de l'*ammoniaque concentrée R* jusqu'à l'obtention d'une réaction fortement alcaline. Agitez avec 30 mL de *chlorure de méthylène R*. Desséchez la phase organique sur du *sulfate de sodium anhydre R*, filtrez et évaporez à siccité sous vide. Dissolvez le résidu dans 1,0 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 2 mg de *chlorhydrate de papavérine R* et 2 mg de *rouge de méthyle R* dans 10 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, propanol R* (1:9:90 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'iodobismuthate de potassium R* et laissez sécher à l'air ; pulvérisez de la *solution de nitrite de sodium R* et laissez sécher à l'air ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de plus faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Rouge de méthyle : une bande rouge | Une bande brune |
| | Une bande brune |
| Papavérine : une bande brun-gris | Une bande brun-gris |
| _______ | _______ |
| | 2 bandes brunes |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 10,0 pour cent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de chélidoine pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 13,0 pour cent.

DOSAGE

*Solution à examiner*. A 0,750 g de chélidoine pulvérisée (710) (*2.9.12*), ajoutez 200 mL d'*acide acétique dilué R* et chauffez au bain-marie pendant 30 min, en agitant fréquemment. Refroidissez et complétez à 250,0 mL avec de l'*acide acétique dilué R*. Filtrez. Jetez les 20 premiers millilitres de filtrat. A 30,0 mL du filtrat restant, ajoutez 6,0 mL d'*ammoniaque concentrée R* et 100,0 mL de *chlorure de méthylène R*. Agitez pendant 30 min. Recueillez séparément la phase organique et transférez-en 50,0 mL dans un ballon à fond rond de 100 mL, puis évaporez à siccité sous vide à une température ne dépassant pas 40 °C. Dissolvez le résidu dans environ 2-3 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*, en chauffant modérément. Transvasez la

Drogues végétales

solution dans une fiole jaugée de 25 mL, en rinçant le ballon avec de l'*acide sulfurique dilué R*, puis complétez à 25,0 mL avec le même solvant. Transvasez 5,0 mL de cette solution dans une fiole jaugée de 25 mL, ajoutez 5,0 mL d'une solution de *sel sodique d'acide chromotropique R* à 10 g/L dans l'*acide sulfurique R*. Bouchez la fiole et mélangez soigneusement, puis complétez à 25,0 mL avec de l'*acide sulfurique R* et rebouchez la fiole.

*Liquide de compensation*. Préparez le liquide de compensation simultanément et dans les mêmes conditions que la solution à examiner : dans une fiole jaugée de 25 mL, introduisez 5,0 mL d'*acide sulfurique dilué R* et 5,0 mL d'une solution de *sel sodique d'acide chromotropique R* à 10 g/L dans l'*acide sulfurique R*. Bouchez la fiole et mélangez soigneusement, puis complétez à 25,0 mL avec de l'*acide sulfurique R* et rebouchez la fiole.

Placez les 2 solutions au bain-marie pendant 10 min. Refroidissez à environ 20 °C et complétez si nécessaire à 25,0 mL avec de l'*acide sulfurique R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner à 570 nm par comparaison au liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en alcaloïdes totaux, exprimés en chélidonine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 2,23}{m}$$

en prenant 933 comme valeur de l'absorbance spécifique de la chélidonine.

$A$ = absorbance à 570 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2008:1887**
**corrigé 6.0**

# CHÊNE (ÉCORCE DE)

## Quercus cortex

DÉFINITION

Ecorce séchée et coupée des rejets et des jeunes branches fraîches de *Quercus robur* L., *Q. petraea* (Matt.) Liebl. et de *Q. pubescens* Willd.

*Teneur* : au minimum 3,0 pour cent de tanins, exprimés en pyrogallol ($C_6H_6O_3$ ; $M_r$ 126,1) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Les morceaux d'écorce, canaliculés ou en tuyaux, atteignent au maximum une épaisseur de 3 mm. La surface externe est gris clair ou gris-vert, assez lisse et elle comporte de rares lenticelles. La surface interne est brun sombre ou brun-rouge et présente des stries longitudinales légèrement saillantes, en général de 0,5-1 mm de large. La cassure est en esquille et fibreuse.

B. Réduisez l'écorce de chêne en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun clair ou brun-rouge et fibreuse. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des groupes de fibres à parois épaisses entourés par du parenchyme modérément épais contenant des cristaux prismatiques d'oxalate de calcium ; des fragments de suber composés de cellules rectangulaires aplaties à paroi mince et à contenu brunâtre ou rougeâtre ; d'abondantes cellules scléreuses, isolées et en groupes, certaines étant larges avec des parois stratifiées épaisses et des ponctuations ramifiées, d'autres étant plus petites, à paroi plus mince, avec des ponctuations simples, souvent avec un contenu brun dense ; des fragments de parenchyme contenant des macles d'oxalate de calcium, des fragments occasionnels de tissu criblé, à paroi fine, certains présentant des plaques criblées sur les parois obliques.

C. A 1 g d'écorce de chêne pulvérisée (710) (*2.9.12*) ajoutez 10 mL d'*éthanol à 30 pour cent V/V R* et chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Refroidissez et filtrez. Prélevez 1 mL de cette solution et ajoutez 2 mL d'une solution de *vanilline R* à 10 g/L dans l'*acide chlorhydrique R*. Il se développe une coloration rouge.

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g d'écorce de chêne pulvérisée (710) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 8,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des tanins dans les drogues végétales (*2.8.14*). Utilisez 0,700 g d'écorce de chêne pulvérisée (710) (*2.9.12*).

**01/2008:1306**
**corrigé 6.0**

# CHIENDENT (RHIZOME DE)

## Graminis rhizoma

DÉFINITION

Rhizome débarrassé des racines adventives, lavé et séché, entier ou fragmenté, d'*Agropyron repens* (L.) Beauv. (*Elymus repens* (L.) Gould).

IDENTIFICATION

A. Les fragments de rhizome sont jaunâtres, brun pâle ou brun-jaune, luisants, d'une épaisseur de 2-3 mm, et striés longitudinalement. Ils présentent des noeuds portant les restes de racines grêles, plus ou moins ramifiées et les restes d'écailles foliacées blanchâtres à brunâtres ; les entre-noeuds jusqu'à 6 cm de long sont sillonnés et creux à l'intérieur. La section transversale des noeuds fait apparaître une moelle jaunâtre.

B. Réduisez le rhizome de chiendent en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est blanc-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments d'épiderme revêtu d'une cuticule épaisse et constitué de cellules rectangulaires allongées à paroi épaisse, ponctuée et légèrement sinueuse, alternant avec de petites cellules de forme arrondie à presque carrée ; des cellules de l'endoderme à épaississement en fer à cheval ; de nombreux fragments de fibres modérément épaissies et des groupes de vaisseaux à ponctuation en fente ou à épaississement spiralé ou annelé.

ESSAI

***Cynodon dactylon*, *Imperata cylindrica***. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'iode R1*. Aucun grain d'amidon coloré en bleu n'est observé.

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 15 pour cent de fragments gris-noir dans le rhizome de chiendent fragmenté.

**Matières extractibles par l'eau** : au minimum 25 pour cent.

A 5,0 g de rhizome de chiendent pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 200 mL d'*eau R* bouillante. Laissez reposer pendant 10 min en agitant de temps à autre. Laissez refroidir et complétez à 200,0 mL avec de l'*eau R*. Filtrez, évaporez 20,0 mL de filtrat au bain-marie à siccité et desséchez le résidu à l'étuve à 100-105 °C. La masse du résidu est au minimum de 0,125 g.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de rhizome de chiendent pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 5,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 1,5 pour cent.

**01/2008:0620**

# CITRON (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Limonis aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par des moyens mécaniques appropriés, sans chauffage, à partir du péricarpe frais de *Citrus limon* (L.) Burman fil.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, mobile, jaune clair ou jaune-vert. L'huile essentielle de citron peut devenir trouble à basse température.

Odeur caractéristique.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Mélangez 1 mL d'huile essentielle de citron avec 1 mL de *toluène R.*

*Solution témoin.* Dissolvez 10 mg de *citroptène R* et 50 μL de *citral R* dans du *toluène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *gel de silice* $GF_{254}$ *pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (15:85 *V/V*).

*Dépôt* : 10 μL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande d'atténuation de fluorescence (bergamotine) |
| Citral : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence (citral) |
| | Une bande bleu foncé (5-géranyloxy-7-méthoxycoumarine) |
| Citroptène : une bande de fluorescence bleu clair | Une bande de fluorescence bleu clair (citroptène) |
| | Une bande d'atténuation de fluorescence (dérivé du psoralène) |
| | Une bande d'atténuation de fluorescence (biakangélicine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence jaune (bergamotine) |
| Citral : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence (citral) |
| | Une bande de fluorescence bleu brillant (5-géranyloxy-7-méthoxycoumarine) |
| Citroptène : une bande de fluorescence bleu brillant | Une bande de fluorescence bleu-violet brillant (citroptène) |
| | Une bande de fluorescence jaune (dérivé du psoralène) |
| | Une bande orange (biakangélicine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables, quant à leur temps de rétention, aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,850 à 0,858.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,473 à 1,476.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : + 57° à + 70°.

**Absorbance** (*2.2.25*). Dissolvez 0,250 g d'huile essentielle de citron dans de l'*alcool R,* mélangez et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Mesurez l'absorbance de 260 nm à 400 nm. Si le spectrophotomètre utilisé n'est pas à enregistrement automatique, effectuez les mesures d'absorbance à des intervalles de 5 nm à partir de 260 nm jusqu'à environ 12 nm avant le maximum d'absorption escompté. Effectuez ensuite 3 mesures à des intervalles de 3 nm, puis des mesures successives à des intervalles de 1 nm jusqu'à environ 5 nm au-delà du maximum et finalement à des intervalles de 10 nm jusqu'à 400 nm. Tracez la courbe du spectre d'absorption en portant en ordonnée les valeurs de l'absorbance et en abscisse les longueurs d'onde. Tracez la tangente qui constitue la ligne de base entre les points *A* et *B* du diagramme (figure 0620.-1). Le maximum d'absorption *C* est à 315 ± 3 nm. En partant du point *C*, abaissez, perpendiculairement à l'axe des abscisses, une ligne verticale qui intercepte la tangente *AB* en *D*. Déduisez l'absorbance au point *D* de l'absorbance au point *C*. La valeur *C – D* est de 0,20 à 0,96. Pour l'huile essentielle de citron de type Italie, cette valeur n'est pas inférieure à 0,45.

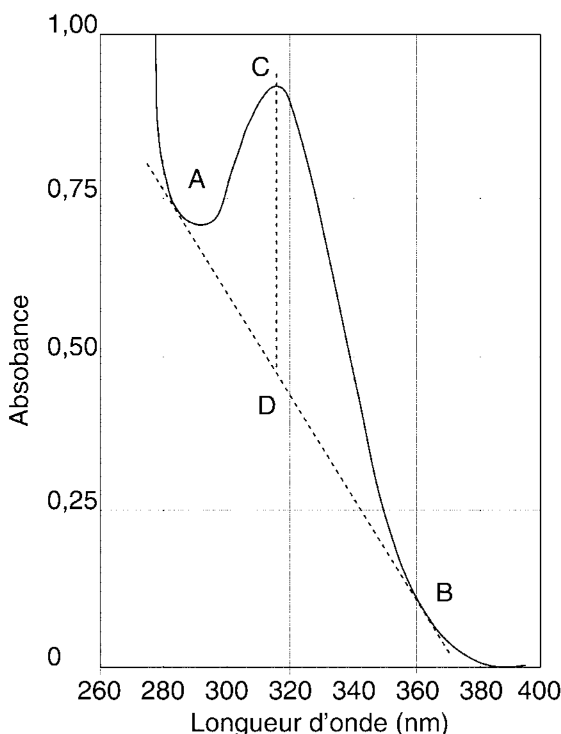



Figure 0620.-1. – *Diagramme caractéristique de l'huile essentielle de citron pour l'essai de l'absorbance*

**Huiles grasses et huiles essentielles résinifiées** (*2.8.7*). La substance à examiner satisfait à l'essai des huiles grasses et huiles essentielles résinifiées.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner.* Huile essentielle de citron.

*Solution témoin.* Dissolvez 20 µL de *β-pinène R,* 10 µL de *sabinène R,* 100 µL de *limonène R,* 10 µL de *γ-terpinène R,* 5 µL de *β-caryophyllène R,* 20 µL de *citral R,* 5 µL d'*α-terpinéol R,* 5 µL d'*acétate de néryle R* et 5 µL d'*acétate de géranyle R* dans 1 mL d'*acétone R.*

*Colonne* :

- *matériau* : silice fondue,
- *dimensions* : *l* = 30 m (une épaisseur du film de 1 µm peut être utilisée) à 60 m (une épaisseur du film de 0,2 µm peut être utilisée), Ø = 0,25-0,53 mm,
- *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R.*

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R.*

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Rapport de division* : 1:100.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 6 | 45 |
| | 6 - 21 | 45 → 90 |
| | 21 - 39 | 90 → 180 |
| | 39 - 55 | 180 |
| Chambre à injection | | 220 |
| Détecteur | | 220 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 0,5 µL de la solution témoin et 0,2 µL de la solution à examiner.

*Ordre d'élution* : ordre indiqué pour la préparation de la solution témoin. Notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin :

- *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au β-pinène et au sabinène et au minimum 1,5 entre les pics dus au géranial et à l'acétate de géranyle.

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez les composants de la solution témoin sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Déterminez la teneur pour cent de chacun de ces composants. Ces teneurs sont comprises dans les limites suivantes :

- *β-pinène* : 7,0 pour cent à 17,0 pour cent,
- *sabinène* : 1,0 pour cent à 3,0 pour cent,
- *limonène* : 56,0 pour cent à 78,0 pour cent,
- *γ-terpinène* : 6,0 pour cent à 12,0 pour cent,
- *β-caryophyllène* : au maximum 0,5 pour cent,
- *néral* : 0,3 pour cent à 1,5 pour cent,
- *α-terpinéol* : au maximum 0,6 pour cent,
- *acétate de néryle* : 0,2 pour cent à 0,9 pour cent,
- *géranial* : 0,5 pour cent à 2,3 pour cent,
- *acétate de géranyle* : 0,1 pour cent à 0,8 pour cent.

**Résidu à l'évaporation** (*2.8.9*) : 1,8 pour cent à 3,6 pour cent, déterminé après chauffage au bain-marie pendant 4 h.

## CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique s'il s'agit d'huile essentielle de citron de type Italie.

**01/2008:1609**
**corrigé 7.0**

# CITRONNELLE (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Citronellae aetheroleum

## DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau à partir des parties aériennes fraîches ou partiellement desséchées de *Cymbopogon winterianus* Jowitt.

## CARACTÈRES

*Aspect* : liquide jaune pâle ou jaune-brun.

Très forte odeur de citronellal.

## IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Diluez 0,1 g d'huile essentielle de citronnelle dans 10,0 mL d'*alcool R.*

*Solution témoin.* Diluez 20 µL de *citronnellal R* dans 10,0 mL d'*alcool R.*

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (10:90 *V/V*).

*Dépôt* : 5 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la solution d'*aldéhyde anisique R* et séchez la plaque pendant 10 min à 100-105 °C. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Citronellal : une bande violette | Une bande orange (citronellol-géraniol) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Le néral et le géranial peuvent être absents dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

## ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,881 à 0,895.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,463 à 1,475.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : – 4° à + 1,5°.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner.* Huile essentielle de citronnelle.

*Solution témoin.* Diluez 25 µL de *limonène R,* 100 µL de *citronellal R,* 25 µL d'*acétate de citronellyle R,* 25 µL de *citral R,* 25 µL d'*acétate de géranyle R,* 25 µL de *citronellol R* et 100 µL de *géraniol R* dans 5 mL d'*hexane R.*

*Colonne* :

- *matériau* : silice fondue,
- *dimensions* : *l* = 60 m, Ø = 0,25 mm,

Drogues végétales

– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (0,2 μm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Rapport de division* : 1:100.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 2 | 80 |
| | 2 - 26 | 80 → 150 |
| | 26 - 42 | 150 → 185 |
| | 42 - 49 | 185 → 250 |
| Chambre à injection | | 260 |
| Détecteur | | 260 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 μL de la solution témoin et 0,2 μL de la solution à examiner.

*Ordre d'élution* : ordre donné pour la préparation de la solution témoin. Enregistrez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,2 entre les pics dus à l'acétate de géranyle et au citronellol.

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les composants de la solution témoin.

Déterminez la teneur pour cent de ces composants. Ces teneurs sont comprises entre les valeurs suivantes :

– *limonène* : 1,0 pour cent à 5,0 pour cent,
– *citronellal* : 30,0 pour cent à 45,0 pour cent,
– *acétate de citronellyle* : 2,0 pour cent à 4,0 pour cent,
– *néral* : au maximum 2,0 pour cent,
– *géranial* : au maximum 2,0 pour cent,
– *acétate de géranyle* : 3,0 pour cent à 8,0 pour cent,
– *citronellol* : 9,0 pour cent à 15.0 pour cent,
– *géraniol* : 20.0 pour cent à 25.0 pour cent.

**01/2008:0376**

# CLOU DE GIROFLE

## Caryophylli flos

DÉFINITION

Bouton floral entier de *Syzygium aromaticum* (L.) Merill et L. M. Perry [*Eugenia caryophyllus* (C. Spreng.) Bull. et Harr.], séché jusqu'à ce qu'il présente une coloration brun-rouge.

*Teneur* : au minimum 150 mL/kg d'huile essentielle.

CARACTÈRES

Odeur aromatique caractéristique.

IDENTIFICATION

A. Le bouton floral brun-rouge comporte une partie quadrangulaire, l'hypanthe, d'une longueur de 10-12 mm et d'un diamètre de 2-3 mm, surmontée par les 4 lobes divergents des sépales qui entourent une tête globuleuse d'un diamètre de 4-6 mm. Un ovaire biloculaire, contenant de nombreux ovules, est situé à la partie supérieure de l'hypanthe. La tête globuleuse forme une coiffe constituée de 4 pétales imbriqués, qui recouvre de nombreuses étamines recourbées et un style court, dressé sur un disque nectarifère à la base. L'huile essentielle exsude sous la pression de l'ongle à partir de l'hypanthe.

B. Réduisez le clou de girofle en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun foncé et a l'odeur et la saveur de la drogue entière. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de l'hypanthe, présentant un épiderme et un parenchyme sous-jacent, renfermant de grandes poches sécrétrices ; de courtes fibres isolées ou en petits groupes, à parois épaisses, lignifiées et légèrement ponctuées ; de nombreux fragments de parenchyme renfermant des macles d'oxalate de calcium ; de nombreux grains de pollen triangulaires, d'un diamètre d'environ 15 μm, avec 3 pores dans les angles. La poudre ne contient pas de grains d'amidon.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Agitez 0,1 g de drogue pulvérisée (500) (*2.9.12*) avec 2 mL de *chlorure de méthylène R* pendant 15 min. Filtrez et évaporez soigneusement le filtrat au bain-marie à siccité. Reprenez le résidu par 2 mL de *toluène R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 20 μL d'*eugénol R* dans 2 mL de *toluène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice* $GF_{254}$ *pour CCM R*.

*Phase mobile* : *toluène R*.

*Dépôt* : 10 μL de solution témoin et 20 μL de solution à examiner, en bandes de 20 mm sur 3 mm.

*Développement* : 2 fois, dans une cuve non saturée sur un parcours de 10 cm ; laissez reposer la plaque pendant 5 min entre les 2 développements.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm et marquez les bandes d'atténuation de fluorescence.

*Résultats A* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente dans sa partie médiane une bande d'atténuation de fluorescence due à l'eugénol semblable quant à sa position à la bande d'atténuation de fluorescence du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner peut présenter, immédiatement au-dessous de la bande due à l'eugénol, une faible bande d'atténuation de fluorescence due à l'acétyleugénol.

*Détection B* : pulvérisez 10 mL de *solution d'aldéhyde anisique R* pour une plaque de 200 mm de côté. Chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats B* : les bandes dues à l'eugénol dans les chromatogrammes obtenus respectivement avec la solution à examiner et la solution témoin sont fortement violet-brun et la bande due à l'acétyleugénol dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est faiblement bleu-violet. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente d'autres bandes colorées, en particulier une bande faiblement rouge dans la partie inférieure et une bande violet-rouge due au caryophyllène dans la partie supérieure.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 6 pour cent de pédoncules, pétioles et fruits, au maximum 2 pour cent de clous de girofle altérés et au maximum 0,5 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 7,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez un ballon de 250 mL et 100 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Introduisez 0,50 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Broyez 5,0 g de drogue avec 5,0 g de *terre d'infusoires R* en triturant finement jusqu'à obtention d'une poudre fine homogène. Procédez immédiatement à la détermination sur 4,0 g du mélange obtenu en distillant à un débit de 2,5-3,5 mL/min pendant 2 h.

**01/2008:1091**

# CLOU DE GIROFLE (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Caryophylli floris aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur à partir des boutons floraux séchés de *Syzygium aromaticum* (L.) Merill et L. M. Perry (*Eugenia caryophyllus* (C. Spreng.) Bull. et Harr.).

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, jaune, virant au brun lorsqu'il est exposé à l'air.

*Solubilité* : miscible au chlorure de méthylène, au toluène et aux huiles grasses.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 20 µL d'huile essentielle de clou de girofle dans 2,0 mL de *toluène R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 15 µL d'*eugénol R* et 15 µL d'*acétyleugénol R* dans 2,0 mL de *toluène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R.*

*Phase mobile* : *toluène R*.

*Dépôt* : 20 µL de solution à examiner et 15 µL de solution témoin, en bandes.

*Développement* : 2 fois dans une cuve non saturée sur un parcours de 10 cm ; laissez reposer pendant 5 min entre les 2 développements.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm et repérez les bandes d'atténuation de fluorescence.

*Résultats A* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente dans sa partie médiane une bande d'atténuation de fluorescence (eugénol) semblable quant à sa position à celle du chromatogramme obtenu avec la solution témoin et, juste au-dessous, une faible bande d'atténuation de fluorescence (acétyleugénol) semblable quant à sa position à la bande d'acétyleugénol dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

*Détection B* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et examinez à la lumière du jour en chauffant à 100-105 °C pendant 5-10 min.

*Résultats B* : dans les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et la solution témoin, la bande due à l'eugénol est brun-violet intense et la bande due à l'acétyleugénol dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est bleu-violet pâle. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente d'autres bandes colorées, en particulier une faible bande rouge dans la partie inférieure et une bande violet-rouge (β-caryophyllène) dans la partie supérieure.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les 3 pics principaux du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux 3 pics principaux du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 1,030 à 1,063.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,528 à 1,537.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : 0° à – 2°.

**Huiles grasses et huiles essentielles résinifiées** (*2.8.7*). L'huile essentielle de clou de girofle satisfait à l'essai.

**Solubilité dans l'alcool** (*2.8.10*). 1,0 mL d'huile de clou de girofle est soluble dans 2,0 mL, et plus, d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,2 g d'huile essentielle de clou de girofle dans 10 g d'*hexane R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 7 mg de *β-caryophyllène R*, 80 mg d'*eugénol R* et 4 mg d'*acétyleugénol R* dans 10 g d'*hexane R*.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 60 m, Ø = environ 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R*.

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Rapport de division* : 1:100.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 8 | 60 |
| | 8 - 48 | 60 → 180 |
| | 48 - 53 | 180 |
| Chambre à injection | | 270 |
| Détecteur | | 270 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1,0 µL.

*Ordre d'élution* : ordre indiqué pour la préparation de la solution témoin. Notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus à l'eugénol et à l'acétyleugénol,
– *nombre de plateaux théoriques* : au minimum 30 000, calculé pour le pic dû au β-caryophyllène à 110 °C.

*Identification des composants* : à l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les composants de la solution témoin.

Déterminez la teneur pour cent de chacun de ces composants. Ces teneurs sont comprises dans les limites suivantes :

– *β-caryophyllène* : 5,0 pour cent à 14,0 pour cent,
– *eugénol* : 75,0 pour cent à 88,0 pour cent,
– *acétyleugénol* : 4,0 pour cent à 15,0 pour cent.

CONSERVATION

A l'abri de la chaleur.

**01/2008:1862**

# COLOPHANE

## Colophonium

DÉFINITION

Résidu restant après distillation de l'huile volatile contenue dans l'oléorésine obtenue à partir de différentes espèces de *Pinus*.

IDENTIFICATION

A. Eclats translucides jaune pâle à jaune-brun, anguleux, cassants et vitreux, de forme irrégulière et de taille inégale, dont la surface porte des marques conchoïdales.

Drogues végétales

B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 1 g de colophane dans 10 mL de *méthanol R* en chauffant doucement.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg de *thymol R* et 10 mg de *linalol R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *chlorure de méthylène R*.

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 10 min ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes colorées sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande pourpre |
| | Une bande pourpre |
| _______ | _______ |
| | 2 bandes pourpres |
| Thymol : une bande orange | |
| _______ | _______ |
| Linalol : une bande pourpre | Séquence d'étroites bandes pourpres |
| | Bande pourpre s'étendant sur la ligne de base |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Indice d'acide** (*2.5.1*) : 145 à 180, déterminé sur 1,0 g.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 0,2 pour cent.

CONSERVATION

Ne pas réduire en poudre.

**01/2011:1881**

# COQUELICOT (PÉTALES DE)

## Papaveris rhoeados flos

DÉFINITION

Pétales séchés, entiers ou fragmentés, de *Papaver rhoeas* L.

IDENTIFICATION

A. Le pétale est rouge foncé ou brun-violet foncé, très fin, souple, froissé, souvent chiffonné en pelote et velouté au toucher. Il est approximativement ovale avec un bord entier, d'environ 6 cm de long et 4-6 cm de large, rétréci à la base où il porte une tache noire. Les faisceaux vasculaires rayonnent à partir de la base et s'anastomosent en un arc continu, toujours à courte et égale distance du bord.

B. Réduisez les pétales de coquelicot en poudre (355) (*2.9.12*). Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre prend une couleur rose-rouge intense et présente les éléments suivants (figure 1881.-1) : des fragments d'épiderme à cellules allongées, à parois sinueuses [B, D, G] avec de petits stomates anomocytiques (*2.8.3*) arrondis [Ba] ; de nombreux faisceaux vasculaires présents dans le parenchyme, à vaisseaux spiralés [E] ; parfois des fragments de l'assise fibreuse des anthères [F] ; des grains de pollen arrondis, d'environ 30 µm de diamètre, à 3 pores et à exine finement verruqueuse [A, C, H].

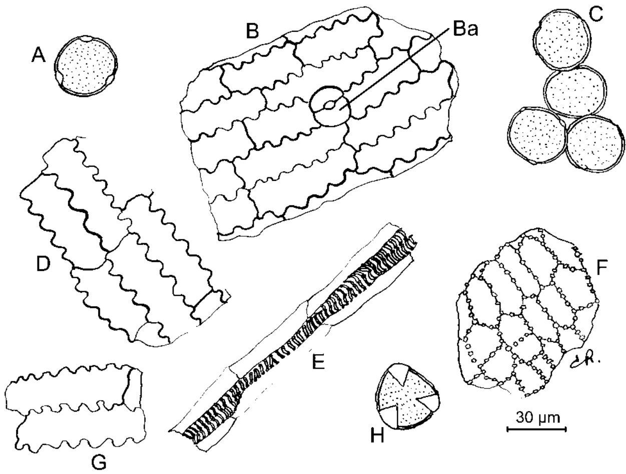



Figure 1881.-1.– *Dessin pour l'identification B des pétales de coquelicot pulvérisés*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL d'*éthanol à 60 pour cent V/V R*. Agitez pendant 15 min. Filtrez sur un papier filtre.

*Solution témoin*. Dissolvez 1 mg de *rouge de quinaldine R* et 1 mg de *bleu sulfan R* dans 2 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, butanol R* (10:12:40 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | 2 bandes jaunes |
| Rouge de quinaldine : une bande rouge-orange | |
| _______ | _______ |
| | Une bande principale violette |
| | Une bande violette |
| | Une bande jaune |
| Bleu sulfan : une bande bleue | |
| _______ | _______ |
| | Un ensemble compact de bandes violettes |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 2,0 pour cent de capsules et au maximum 1,0 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 11,0 pour cent.

**Pouvoir colorant**. Dans un flacon de 250 mL, introduisez 1,0 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*) et ajoutez 100 mL d'*éthanol à 30 pour cent V/V R*. Laissez macérer pendant 4 h en agitant fréquemment. Filtrez et éliminez les premiers 10 mL. A 10,0 mL du filtrat ajoutez 2 mL d'*acide chlorhydrique R* et complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 30 pour cent V/V R*. Laissez

Drogues végétales

reposer pendant 10 min. L'absorbance (*2.2.25*) mesurée à 523 nm en utilisant de l'*éthanol à 30 pour cent V/V R* comme liquide de compensation est au minimum de 0,6.

**01/2008:1304**
**corrigé 6.0**

# CORIANDRE

## Coriandri fructus

DÉFINITION

Diakènes secs de *Coriandrum sativum* L.

*Teneur* : au minimum 3 mL/kg d'huile essentielle (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Le diakène est brun ou brun clair ; il a une forme plus ou moins sphérique et un diamètre d'environ 1,5-5 mm, ou une forme ovale et une longueur de 2-6 mm.

IDENTIFICATION

A. Les méricarpes sont généralement adhérents. Le diakène est glabre, il présente 10 côtes primaires, ondulées, peu saillantes et 8 côtes secondaires, rectilignes, plus saillantes. L'apex est couronné par le stylopode. La face interne des méricarpes est concave. Un petit fragment du pédicelle est parfois présent.

B. Réduisez la coriandre en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : de nombreuses gouttelettes d'huile ; des fragments d'albumen à petites cellules régulières à paroi épaisse, contenant des microcristaux et microrosettes d'oxalate de calcium et des gouttelettes huileuses ; des fragments d'endocarpe à cellules très étroites alignées de façon régulière et habituellement associées à une assise de cellules scléreuses rectangulaires à paroi fine du mésocarpe ; des fragments de l'assise sclérenchymateuse du mésocarpe, à courtes cellules fusiformes, fortement épaissies, ponctuées, disposées en couches dont les cellules des couches adjacentes sont disposées à environ 90° les unes par rapport aux autres ; des fragments de parenchyme à petites cellules à paroi épaisse ; parfois quelques fragments de faisceaux libéro-ligneux.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Agitez 0,50 g de coriandre récemment pulvérisée (355) (*2.9.12*) avec 5,0 mL d'*hexane R* pendant 2-3 min, puis filtrez sur 2 g de *sulfate de sodium anhydre R*.

*Solution témoin*. Dissolvez extemporanément 15 µL de *linalol R* et 25 µL d'*huile d'olive R* dans 5,0 mL d'*hexane R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 20 µL de solution à examiner et 10 µL de solution témoin, en bandes.

*Développement* : 2 fois sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R*. Examinez à la lumière du jour, en chauffant à 100-105 °C pendant 5-10 min.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente, dans sa moitié inférieure, une bande violette ou violet-gris (linalol) et, dans sa moitié supérieure, une bande violet-bleu (triglycérides). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente des bandes semblables quant à leur position et leur coloration à celles du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Entre la ligne de dépôt et la bande due au linalol dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, plusieurs bandes gris-violet ou brunâtres, dont celle due au géraniol, sont présentes. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner peut également présenter entre la bande due aux triglycérides et celle due au linalol dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, plusieurs bandes gris-violet de faible intensité.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*). La coriandre satisfait à l'essai. Aucun diakène ne présente des perforations d'origine animale.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de coriandre pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 8,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez un ballon à fond rond de 500 mL et 200 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Réduisez la coriandre en poudre grossière. Procédez immédiatement à la détermination sur 30,0 g de poudre. Introduisez 0,5 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 2 h.

**01/2008:1820**

# CORIANDRE (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Coriandri aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau, à partir des fruits de *Coriandrum sativum* L.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, incolore ou jaune pâle.

Odeur caractéristique épicée.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 10 µL d'huile essentielle de coriandre dans 1,0 mL de *toluène R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 µL de *linalol R* et 2 µL d'*acétate de géranyle R* dans 1,0 mL de *toluène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 10-15 min ; examinez immédiatement à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| Acétate de géranyle : une bande bleu-violet | Une bande bleu-violet (acétate de géranyle) |
| Linalol : une bande violette intense | Une bande violette intense (linalol) |
| | Une bande bleu-violet (géraniol) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

Drogues végétales

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.
*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables, quant à leur temps de rétention, aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,860 à 0,880.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,462 à 1,470.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : + 7° à + 13°.

**Indice d'acide** (*2.5.1*) : au maximum 3,0, déterminé sur 5,00 g d'huile essentielle de coriandre.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner.* L'huile essentielle de coriandre.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 10 μL d'*α-pinène R*, 10 μL de *limonène R*, 10 μL de *γ-terpinène R*, 10 μL de *p-cymène R*, 10 mg de *camphre R*, 20 μL de *linalol R*, 10 μL d'*α-terpinéol R*, 10 μL d'*acétate de géranyle R* et 10 μL de *géraniol R* dans 1 mL d'*hexane R*.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 5 μL de *géraniol R* dans de l'*hexane R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Colonne* :
- *matériau* : silice fondue,
- *dimensions* : *l* = 60 m, Ø = 0,25 mm,
- *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur du film 0,25 μm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1 mL/min.

*Rapport de division* : 1:65.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 10 | 60 |
| | 10 - 75 | 60 → 190 |
| | 75 - 120 | 190 |
| Chambre à injection | | 220 |
| Détecteur | | 240 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 0,2 μL.

*Ordre d'élution* : ordre donné pour la préparation de la solution témoin (a). Notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin (a) :
- *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au linalol et au camphre.

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a), localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les composants de la solution témoin (a).

Déterminez la teneur pour cent de ces composants. Ces teneurs sont comprises entre les valeurs suivantes :
- *α-pinène* : 3,0 pour cent à 7,0 pour cent,
- *limonène* : 1,5 pour cent à 5,0 pour cent,
- *γ-terpinène* : 1,5 pour cent à 8,0 pour cent,
- *p-cymène* : 0,5 pour cent à 4,0 pour cent,
- *camphre* : 3,0 pour cent à 6,0 pour cent,
- *linalol* : 65,0 pour cent à 78,0 pour cent,
- *α-terpinéol* : 0,1 pour cent à 1,5 pour cent,
- *acétate de géranyle* : 0,5 pour cent à 4,0 pour cent,
- *géraniol* : 0,5 pour cent à 3,0 pour cent,
- *limite d'exclusion* : surface du pic du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,05 pour cent).

**Pureté chirale**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*).

*Solution à examiner.* Dissolvez 0,02 g d'huile essentielle de coriandre dans du *pentane R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin.* Dissolvez 10 μL de *linalol R* et 5 mg de *bornéol R* dans du *pentane R* puis complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Colonne* :
- *matériau* : silice fondue,
- *dimensions* : *l* = 25 m, Ø = 0,25 mm,
- *phase stationnaire* : *β-cyclodextrine modifiée pour chromatographie chirale R* (épaisseur du film 0,25 μm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,3 mL/min.

*Rapport de division* : 1:30.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 65 | 50 → 180 |
| Chambre à injection | | 230 |
| Détecteur | | 230 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 μL.

*Conformité du système* : solution témoin :
- *résolution* : au minimum 5,5 entre les pics dus au (*R*)-linalol (1[er] pic) et au (*S*)-linalol (2[e] pic) et au minimum 2,9 entre les pics dus au (*S*)-linalol et au bornéol (3[e] pic).

*Limite* : calculez la teneur pour cent en (*R*)-linalol à l'aide de l'expression :

$$\frac{A_R}{A_S + A_R} \times 100$$

$A_S$ = surface du pic dû au (*S*)-linalol,

$A_R$ = surface du pic dû au (*R*)-linalol.

- *(R)-linalol* : au maximum 14 pour cent.

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

**01/2008:1510**
**corrigé 6.0**

# CYNORRHODON

## Rosae pseudo-fructus

DÉFINITION

Réceptacle floral et reste des sépales, débarrassés des akènes, séchés, de *Rosa canina* L., *R. pendulina* L. et autres espèces de *Rosa*.

*Teneur* : au minimum 0,3 pour cent d'acide ascorbique ($C_6H_8O_6$ ; $M_r$ 176,1) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Le cynorrhodon est constitué par des fragments du réceptacle floral urcéolé, creux et charnu, surmonté par les restes réduits des sépales, rose pâle ou rose orangé, à surface externe convexe luisante et fortement ridée ; sa face interne, plus claire, porte de nombreux poils semblables à des soies.

B. Réduisez le cynorrhodon en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune orangé. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : de nombreux fragments du réceptacle dont l'épiderme externe a un contenu jaune orangé et une épaisse cuticule, et l'épiderme interne est composé de cellules à paroi mince contenant des macles et

Drogues végétales

quelques prismes d'oxalate de calcium ; des cellules lignifiées dispersées, isodiamétriques, à paroi épaissie et ponctuée, qui forment la base des poils ; de nombreux poils unicellulaires, d'une longueur pouvant atteindre 2 mm et d'une épaisseur de 30-45 µm, rétrécis aux 2 extrémités, à paroi fortement épaissie et cuticule cireuse pouvant présenter des fissures en spirale ; de nombreux globules huileux jaune orangé.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 5 g de cynorrhodon pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 25 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Agitez pendant 30 min puis filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg d'*acide ascorbique R* dans 5,0 mL d'*éthanol à 60 pour cent V/V R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide acétique R, acétone R, méthanol R, toluène R* (5:5:20:70 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL de solution à examiner et 2 µL de solution témoin.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande d'atténuation de fluorescence semblable quant à sa position à la bande principale du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

*Détection B* : pulvérisez une solution de *sel sodique de dichlorophénolindophénol R* à 0,2 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats B* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande blanche sur fond rose (acide ascorbique) semblable quant à sa position et sa coloration à la bande principale du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Le chromatogramme présente également une bande jaune orangé intense près du front du solvant et une bande jaune dans le tiers supérieur (caroténoïdes).

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 1 pour cent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de cynorrhodon pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 7,0 pour cent.

DOSAGE

*Solution à examiner*. Dans un ballon à fond rond, pesez 0,500 g de cynorrhodon récemment pulvérisé (710) (*2.9.12*). Ajoutez une solution de 1,0 g d'*acide oxalique R* dans 50,0 mL de *méthanol R*. Portez à ébullition et chauffez à reflux pendant 10 min, puis refroidissez dans de l'eau glacée jusqu'à une température de 15-20 °C. Filtrez. Transférez 2,0 mL du filtrat dans une fiole conique de 50 mL. Ajoutez successivement, en agitant doucement après chaque addition, 2,0 mL de *solution étalon de dichlorophénolindophénol R* puis, après exactement 60 s, 0,5 mL d'une solution de *thiourée R* à 100 g/L dans de l'*éthanol à 50 pour cent V/V R* et 0,7 mL de *solution sulfurique de dinitrophénylhydrazine R*. Chauffez à reflux à 50 °C pendant 75 min, puis placez immédiatement dans un bain d'eau glacée pendant 5 min. Ajoutez goutte à goutte 5,0 mL d'un mélange de 12 mL d'*eau R* et de 50 mL d'*acide sulfurique R*, en veillant à ce que l'addition dure au minimum 90 s et au maximum 120 s et en maintenant sous agitation énergique constante dans un bain d'eau glacée. Laissez reposer 30 min à température ambiante, puis mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 520 nm en utilisant la solution A comme liquide de compensation.

*Solution A*. Prélevez 2,0 mL du filtrat obtenu lors de la préparation de la solution à examiner et opérez comme décrit précédemment mais en ajoutant la *solution sulfurique de dinitrophénylhydrazine R* juste avant de procéder à la mesure.

*Solution témoin*. Dissolvez 40,0 mg d'*acide ascorbique R* dans une solution récemment préparée d'*acide oxalique R* à 20 g/L dans le *méthanol R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Prélevez 5,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec une solution récemment préparée d'*acide oxalique R* à 20 g/L dans le *méthanol R*. Prélevez 2,0 mL de solution et opérez comme décrit précédemment pour le filtrat obtenu lors de la préparation de la solution à examiner. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 520 nm en utilisant la solution B comme liquide de compensation.

*Solution B*. Prélevez 2,0 mL de solution témoin et traitez comme précédemment décrit pour la solution A.

Calculez la teneur pour cent en acide ascorbique à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{2,5 \times A_1 \times m_2}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = absorbance de la solution à examiner,

$A_2$ = absorbance de la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai de cynorrhodon, en grammes,

$m_2$ = masse de la prise d'essai d'acide ascorbique, en grammes.

**01/2008:0117**
**corrigé 6.0**

# DIGITALE POURPRÉE (FEUILLE DE)

## Digitalis purpureae folium

DÉFINITION

Feuille séchée de *Digitalis purpurea* L.

*Teneur* : au minimum 0,3 pour cent d'hétérosides cardénoliques, exprimés en digitoxine ($M_r$ 765) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Très faible odeur caractéristique.

La feuille entière a une longueur d'environ 10-40 cm et une largeur d'environ 4-15 cm. Le limbe est ovale ou ovale allongé. La longueur du pétiole ailé est comprise entre le 1/4 et la longueur totale du limbe.

IDENTIFICATION

A. La feuille de digitale pourprée est friable et fréquemment brisée. La face supérieure est verte et la face inférieure vert-gris. L'extrémité du limbe est subaiguë et les bords irrégulièrement crénelés dentés ou dentés en scie ; la base est décurrente. La nervation est pennée, à nervures latérales saillantes notamment à la face inférieure, formant un angle d'environ 45° avec la nervure médiane et anastomosée vers le bord ; une petite nervure aboutit à chaque dent du bord de la feuille et les nervures inférieures descendent le long du pétiole ailé. La face supérieure est rugueuse et pubescente ; la face inférieure est fortement pubescente et présente un réseau de petites nervures proéminentes.

B. Réduisez la feuille de digitale pourprée en poudre (355) (*2.9.12*). Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des cellules épidermiques à cuticule lisse et à parois anticlinales droites ou légèrement sinueuses à la face supérieure, nettement sinueuses à la face inférieure. Les poils sont de 2 types : poils tecteurs à pointe émoussée, unisériés, formés généralement de 3-5 cellules dont 1 ou plusieurs sont souvent collabées, à parois finement verruqueuses ou légèrement striées ; poils glanduleux à pédicelle unicellulaire, parfois pluricellulaire unisérié dont la tête est unicellulaire ou bicellulaire, exceptionnellement quadricellulaire. Les stomates anomocytiques (*2.8.3*) sont absents ou très rares sur la face supérieure et nombreux à la face inférieure. La feuille ne comporte pas de cristaux d'oxalate de calcium ni de sclérenchyme.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Introduisez 1,0 g de feuille de digitale pourprée pulvérisée (180) (*2.9.12*) dans un mélange de 20 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R* et de 10 mL de *solution d'acétate de plomb R*. Chauffez à ébullition pendant 2 min, laissez refroidir, puis centrifugez. Agitez le surnageant 2 fois avec 15 mL de *chloroforme R* et séparez les 2 phases par centrifugation si nécessaire. Séchez la phase chloroformique sur du *sulfate de sodium anhydre R* et filtrez. Evaporez 10 mL de la solution au bain-marie à siccité. Dissolvez le résidu dans 1 mL d'un mélange à volumes égaux de *chloroforme R* et de *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *purpuréa-glucoside A SCR*, 2 mg de *purpuréaglucoside B SCR*, 5 mg de *digitoxine R* et 2 mg de *gitoxine R* dans un mélange à volumes égaux de *chloroforme R* et de *méthanol R*, puis complétez à 10 mL avec le même mélange de solvants.

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R*.

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R, acétate d'éthyle R* (7,5:10:75 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL, en bandes de 2 cm sur 0,3 cm.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : jusqu'à évaporation complète des solvants.

*Détection* : pulvérisez un mélange de 2 volumes d'une solution de *chloramine R* à 10 g/L et de 8 volumes d'une solution d'*acide trichloracétique R* à 250 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*, puis chauffez à 100-105 °C pendant 10 min. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente dans sa partie inférieure une bande de fluorescence bleu clair due au purpuréaglucoside B, juste au-dessus, une bande de fluorescence jaune-brun due au purpuréaglucoside A, en son milieu, une bande de fluorescence bleu clair due à la gitoxine et au-dessus, une bande de fluorescence jaune-brun due à la digitoxine. Les bandes du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur position, leur coloration et leurs dimensions aux bandes du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Il peut apparaître d'autres bandes fluorescentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

D. Evaporez 5 mL de la solution chloroformique, obtenue dans l'identification C, au bain-marie à siccité. Au résidu, ajoutez 2 mL de *solution d'acide dinitrobenzoïque R* et 1 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M*. Il se développe une coloration violet-rouge dans les 5 min qui suivent.

E. Evaporez 5 mL de la solution chloroformique, obtenue dans l'identification C, au bain-marie à siccité. Au résidu, ajoutez 3 mL de *solution de xanthydrol R* et chauffez au bain-marie pendant 3 min. Il se développe une coloration rouge.



ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*). La drogue ne contient pas de feuilles glabres ou peu velues dont les cellules épidermiques, vues de face, présentent des parois anticlinales ayant l'aspect d'un chapelet (*Digitalis lanata*).

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 6 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de feuille de digitale pourprée pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 12,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 5,0 pour cent.

DOSAGE

Agitez 0,250 g de feuille de digitale pourprée pulvérisée (180) (*2.9.12*) avec 50,0 mL d'*eau R* pendant 1 h. Ajoutez 5,0 mL d'une solution d'*acétate de plomb R* à 150 g/L. Agitez et après quelques minutes, ajoutez 7,5 mL d'une solution de *phosphate disodique R* à 40 g/L. Filtrez sur un filtre plissé. A 50,0 mL de filtrat, ajoutez 5 mL d'acide chlorhydrique à 150 g/L de HCl et chauffez au bain-marie à reflux pendant 1 h. Transvasez dans une ampoule à décantation, rincez le ballon 2 fois avec 5 mL d'*eau R* et agitez 3 fois avec 25 mL de *chloroforme R*. Réunissez les solutions chloroformiques, desséchez sur du *sulfate de sodium anhydre R* et complétez à 100,0 mL avec du *chloroforme R*. Evaporez à siccité 40,0 mL de la solution chloroformique, dissolvez le résidu dans 7 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R*, puis ajoutez 2 mL de *solution d'acide dinitrobenzoïque R* et 1 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M*. Préparez simultanément la solution témoin de la façon suivante : dissolvez 50,0 mg de *digitoxine SCR* dans de l'*éthanol à 96 pour cent R*, puis complétez à 50,0 mL avec le même solvant. Prélevez 5,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec de l'*éthanol à 96 pour cent R*. Prélevez 5,0 mL de cette solution, ajoutez 25 mL d'*eau R* et 3 mL d'acide chlorhydrique à 150 g/L de HCl. Chauffez au bain-marie à reflux pendant 1 h, puis continuez l'opération en suivant les indications données plus haut. Mesurez à plusieurs reprises l'absorbance (*2.2.25*) des 2 solutions à 540 nm pendant les 12 premières minutes jusqu'à ce que le maximum soit atteint en utilisant comme liquide de compensation, un mélange de 7 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R*, de 2 mL de *solution d'acide dinitrobenzoïque R* et de 1 mL d'*hydroxyde de sodium 1 M*.

En tenant compte des absorbances mesurées et de la concentration des solutions, calculez la teneur en hétérosides cardénoliques exprimés en digitoxine.

CONSERVATION

A l'abri de l'humidité.

**01/2008:1821**
**corrigé 6.0**

# ECHINACEA ANGUSTIFOLIA (RACINE D')

## Echinaceae angustifoliae radix

DÉFINITION

Organes souterrains entiers ou coupés, séchés d'*Echinacea angustifolia* (D.C.).

*Teneur* : au minimum 0,5 pour cent d'échinacoside ($C_{35}H_{46}O_{20}$ ; $M_r$ 786,5) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

*Première identification : A, B, C.*

*Deuxième identification : A, B, D.*

A. La souche, d'un diamètre pouvant atteindre 30 mm, ne porte qu'un petit nombre de bases de tige. Les racines, peu nombreuses, d'un diamètre pouvant atteindre 15 mm, cylindriques ou légèrement fuselées et parfois tordues en

spirale, présentent des rides longitudinales et de profonds sillons ; la surface externe est brun pâle à brun-jaune. La section est courte, brun foncé à structure rayonnée.

B. Réduisez la drogue en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-gris. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments caractéristiques suivants : d'étroites fibres lignifiées (jusqu'à environ 800 µm de longueur et environ 50 µm de diamètre) réunies en longs faisceaux entourés de dépôts de phytomélanine ; des vaisseaux de bois (jusqu'à environ 60 µm de diamètre ) à épaississements réticulés ou scalariformes ; de nombreuses cellules scléreuses, isolées ou plus fréquemment groupées par 2 à 10, le plus souvent allongées à rectangulaires (jusqu'à environ 150 µm de long et 40 µm de large), avec des espaces intercellulaires remplis de dépôts de phytomélanine ; des fragments de canaux à oléorésine (80-150 µm de diamètre) à contenu jaune orangé à brun-rouge ; des fragments des assises externes à cellules carrées à rectangulaires (environ 30-45 µm) ; un abondant parenchyme à cellules à parois minces ponctuées, contenant des masses sphérocristallines d'inuline.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai d'*Echinacea purpurea*.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres faibles bandes bleu foncé fluorescentes peuvent être présentes entre celles dues à l'échinacoside et à la cynarine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Acide caféique : une intense bande de fluorescence bleue | |
| Cynarine : une intense bande de fluorescence verdâtre | Une bande de fluorescence verdâtre (cynarine) |
| Echinacoside : une intense bande de fluorescence verdâtre | Une intense bande de fluorescence verdâtre (échinacoside) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

D. Examinez les chromatogrammes obtenus dans le dosage.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente un pic principal dû à l'échinacoside et un pic mineur dû à la cynarine. Les pics dus à l'acide caféique, l'acide caftarique et l'acide chlorogénique sont des pics mineurs ou peuvent être absents.

## ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3 pour cent.

***Echinacea purpurea***. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R* puis traitez aux ultrasons pendant 5 min. Centrifugez et utilisez le surnageant.

*Solution témoin*. Dissolvez 1 mg d'*échinacoside R*, 1 mg de *cynarine R* et 0,5 mg d'*acide caféique R* dans 5,0 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, méthyléthylcétone R, acétate d'éthyle R* (3:3:9:15 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 25 µL [ou 5 µL] de solution à examiner et 10 µL [ou 2 µL] de solution témoin en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 5 cm].

*Séchage* : dans un courant d'air froid pendant environ 10 min puis à 100-105 °C pendant 2 min.

*Détection* : traitez la plaque chaude avec une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 5 g/L dans l'*acétate d'éthyle R* ; examinez en lumière ultraviolette à 365 nm après 30 min.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande de fluorescence verdâtre juste en dessous du niveau de la bande due à l'acide caféique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, ni de bande de fluorescence verdâtre en dessous du niveau de la bande due à la cynarine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, seules de faibles bandes bleu foncé fluorescentes sont présentes entre les bandes dues à l'échinacoside et à la cynarine.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 9,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 3,0 pour cent.

## DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Dans une fiole jaugée de 100 mL, introduisez 0,500 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*) et ajoutez 80 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Traitez aux ultrasons pendant 15 min puis complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Homogénéisez la suspension et laissez reposer pendant quelques minutes pour laisser se déposer les particules solides visibles. Avant injection, filtrez une quantité appropriée de solution sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm).

*Solution témoin*. Dissolvez 10,0 mg d'*acide chlorogénique SCR* et 10,0 mg d'*acide caféique R* dans de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R*, traitez aux ultrasons pendant 15 min et complétez à 10,0 mL avec le même solvant. Prélevez 4,0 mL de solution et complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R*.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
– *température* : 35 °C.

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acide phosphorique R, eau R* (1:999 *V/V*),
– *phase mobile B* : *acétonitrile R*,

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 | 90 | 10 |
| 0 - 13 | 90 → 78 | 10 → 22 |
| 13 - 14 | 78 → 60 | 22 → 40 |
| 14 - 14,5 | 60 | 40 |

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 330 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Rétention relative* par rapport à l'acide chlorogénique : acide caftarique = environ 0,8 ; acide caféique = environ 1,5 ; cynarine = environ 1,6 ; échinacoside = environ 1,7 ; acide cichorique = environ 2,3.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 10 entre les pics dus à l'acide caféique et à l'acide chlorogénique.

Drogues végétales

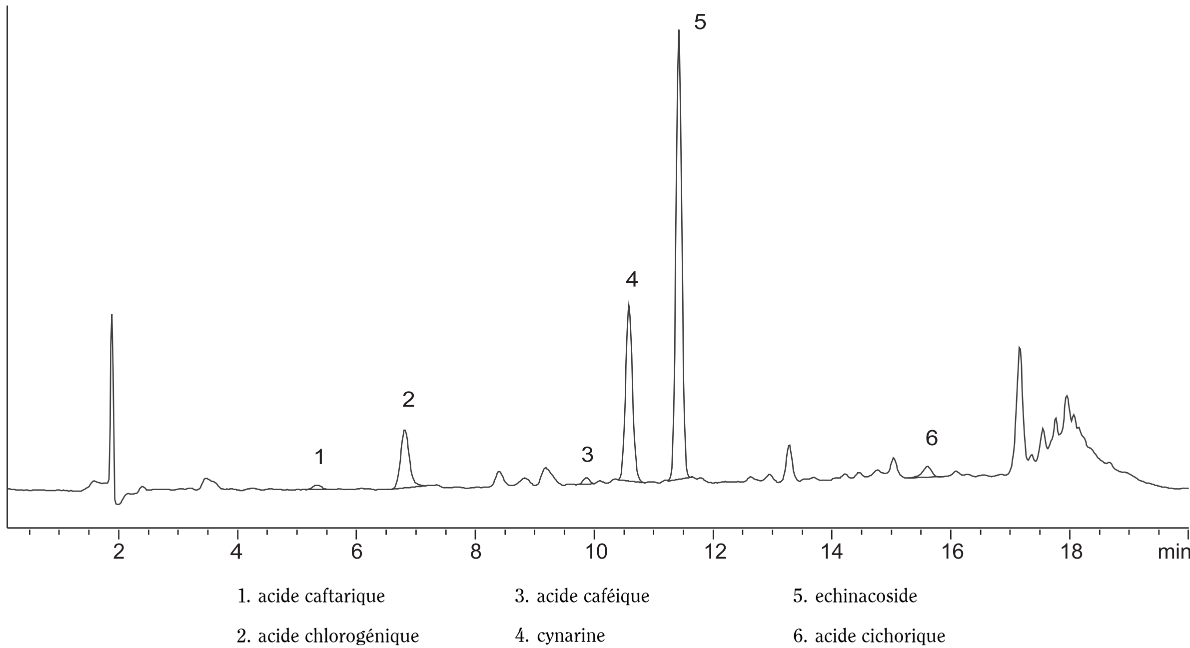



Figure 1821.-1. – *Chromatogramme pour le dosage de l'échinacoside dans la racine d'Echinacea angustifolia*

Localisez les pics dus à l'acide caféique et à l'acide chlorogénique en utilisant le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Localisez les pics dus à l'échinacoside et à la cynarine en utilisant le chromatogrammme de la figure 1821.-1.

Calculez la teneur pour cent en échinacoside à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times C_2 \times 100 \times 2,221}{A_2 \times C_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'échinacoside dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'acide chlorogénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$C_1$ = concentration de la solution à examiner, en milligrammes par millilitre,

$C_2$ = teneur en acide chlorogénique de la solution témoin, en milligrammes par millilitre,

2,221 = facteur de corrélation entre l'acide chlorogénique et l'échinacoside.

CONSERVATION

Sous forme non divisée.

**01/2008:1822**
**corrigé 6.0**

# ECHINACEA PALLIDA (RACINE D')

## Echinaceae pallidae radix

DÉFINITION

Organes souterrains séchés, entiers ou coupés, d'*Echinacea pallida* Nutt.

*Teneur* : au minimum 0,2 pour cent d'échinacoside ($C_{35}H_{46}O_{20}$ ; $M_r$ 786,5) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Le rhizome et les racines, d'un diamètre de 4-20 mm, de forme cylindrique et parfois tordus en spirale, présentent des rides longitudinales et de profonds sillons ; la surface externe est brun-rouge à brun-gris.

B. Réduisez la drogue en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-gris à jaune clair. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments caractéristiques suivants : de courtes fibres lignifiées (100-300 µm de long, et jusqu'à environ 80 µm de diamètre) isolées ou réunies en longs faisceaux parfois entourées de dépôts de phytomélanine ; des vaisseaux de bois (jusqu'à environ 70 µm de diamètre) à épaississements réticulés ou scalariformes ; de nombreuses cellules scléreuses, isolées ou en amas ne dépassant pas 10 cellules, toutes entourées de dépôts de phytomélanine noirs, de formes très variables, soit arrondies, soit rectangulaires à irrégulières, parfois très allongées et rappelant des fibres, mesurant jusqu'à 400 µm de long ; des fragments de canaux à oléorésine (jusqu'à 240 µm de diamètre) à contenu jaune orangé ; des fragments des assises externes à cellules presque carrées à rectangulaires (40 × 80 µm) : un abondant parenchyme à cellules à parois minces ponctuées, avec des sphérocristaux d'inuline.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai des autres espèces d'*Echinacea* et *Parthenium integrifolium*.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Une bande de faible intensité peut être présente près du front du solvant dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande brun-vert à brun |
| | Une bande jaune |
| | Une bande violette |
| β-Sitostérol : une bande violette à rose<br>*N*-Isobutyldodécatétraénamide : une bande bleu-gris | Une bande violette à rose (β-sitostérol) |
| | Une bande bleu-gris foncée |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

D. Examinez les chromatogrammes obtenus dans le dosage.

*Résultats* : le pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est dû à l'échinacoside. Les pics dus à l'acide caftarique, à l'acide caféique, à la cynarine, à l'acide chlorogénique et à l'acide cichorique sont des pics mineurs ou peuvent être absents.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3 pour cent.

**Autres espèces d'*Echinacea* et *Parthenium integrifolium*.** Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 1,0 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *chlorure de méthylène R* puis traitez aux ultrasons pendant 5 min. Centrifugez et utilisez le surnageant.

*Solution témoin.* Dissolvez 1 mg de *β-sitostérol R* et un volume de *solution de N-isobutyldodécatétraénamide R* correspondant à 1 mg de *N-isobutyldodécatétraénamide R* dans du *méthanol R* et complétez à 5,0 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, cyclohexane R, acétate d'éthyle R, toluène R* (0,9:3:6:24 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 25 µL [ou 5 µL] de solution à examiner et 10 µL [ou 4 µL] de solution témoin en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 5 cm].

*Séchage* : dans un courant d'air froid pendant environ 10 min.

*Détection* : traitez la plaque en utilisant de la *solution d'aldéhyde anisique R* ; chauffez à 105 °C pendant 3 min et examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande bleu-gris au niveau de la bande due au *N*-isobutyldodécatétraénamide dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, ni de bande bleue au lieu de la bande violette au niveau de la bande due au *β*-sitostérol dans le chromatogramme obtenu avec la solution de référence.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 7,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 2,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Dans une fiole jaugée de 100 mL, introduisez 0,500 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*) et ajoutez 80 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Traitez aux ultrasons pendant 15 min puis complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Homogénéisez la suspension et laissez reposer pendant quelques minutes pour laisser se déposer les particules solides visibles. Avant injection, filtrez une quantité appropriée de solution sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm).

*Solution témoin.* Dissolvez 10,0 mg d'*acide chlorogénique SCR* et 10,0 mg d'*acide caféique R* dans de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R*, traitez aux ultrasons pendant 15 min et complétez à 10,0 mL avec le même solvant. Prélevez 4,0 mL de solution et complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R*.

*Colonne* :

- *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
- *température* : 35 °C.

*Phase mobile* :

- *phase mobile A* : *acide phosphorique R, eau R* (1:999 *V/V*),
- *phase mobile B* : *acétonitrile R*,

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 | 90 | 10 |
| 0 - 13 | 90 → 78 | 10 → 22 |
| 13 - 14 | 78 → 60 | 22 → 40 |
| 14 - 20 | 60 | 40 |

*Débit* : 1,5 mL/min.

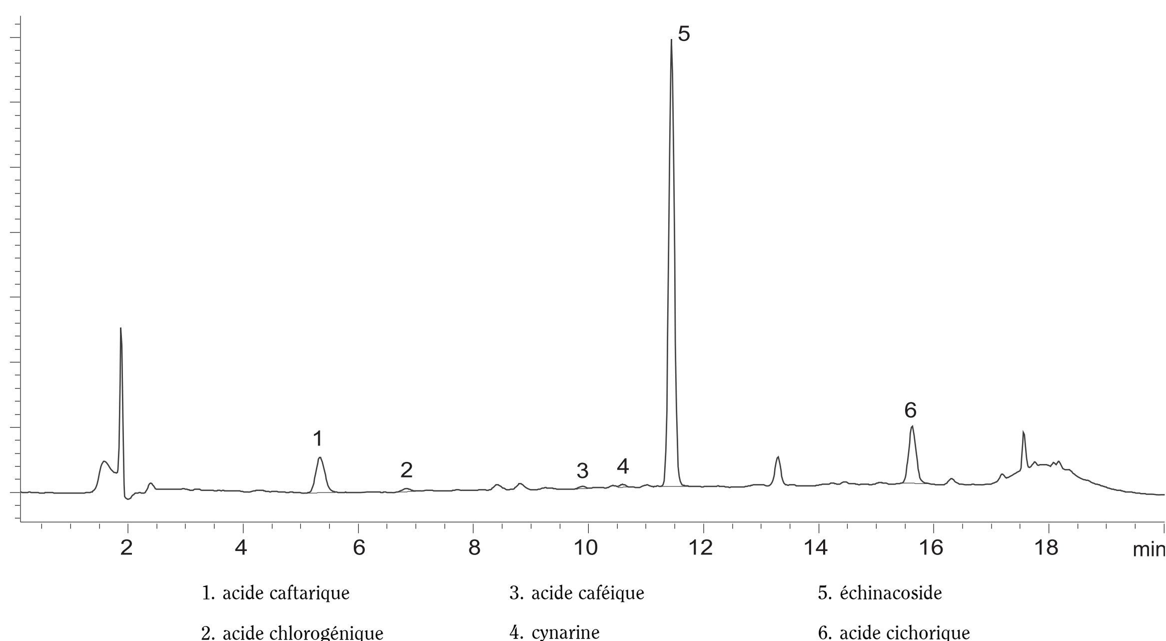
*Détection* : spectrophotomètre à 330 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Rétention relative* par rapport à l'acide chlorogénique (temps de rétention = environ 7 min) : acide caftarique = environ 0,8 ; acide caféique = environ 1,5 ; cynarine = environ 1,6 ; échinacoside = environ 1,7 ; acide cichorique = environ 2,3.

*Conformité du système* : solution témoin :

- *résolution* : au minimum 10 entre les pics dus à l'acide caféique et à l'acide chlorogénique.




1. acide caftarique
2. acide chlorogénique
3. acide caféique
4. cynarine
5. échinacoside
6. acide cichorique

Figure 1822.-1. – *Chromatogramme pour le dosage de l'échinacoside dans la racine d'Echinacea pallida*

Drogues végétales

Localisez les pics dus à l'acide caféique et à l'acide chlorogénique en utilisant le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Localisez les pics dus à l'échinacoside, à l'acide caftarique et à l'acide cichorique en utilisant le chromatogramme de la figure 1822.-1.

Calculez la teneur pour cent en échinacoside à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times C_2 \times 100 \times 2,221}{A_2 \times C_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'échinacoside dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'acide chlorogénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$C_1$ = concentration de la solution à examiner, en milligrammes par millilitre,

$C_2$ = teneur en acide chlorogénique de la solution témoin, en milligrammes par millilitre,

2,221 = facteur de corrélation entre l'acide chlorogénique et l'échinacoside.

CONSERVATION

Sous forme non divisée.

**01/2008:1823**
**corrigé 6.0**

# ECHINACEA PURPUREA (PARTIES AÉRIENNES FLEURIES D')

## Echinaceae purpureae herba

DÉFINITION

Parties aériennes fleuries, entières ou coupées, séchées, de *Echinacea purpurea* (L.) Moench.

*Teneur* : au minimum 0,1 pour cent pour la somme de l'acide caftarique ($C_{13}H_{12}O_9$ ; $M_r$ 312,2) et de l'acide cichorique ($C_{22}H_{18}O_{12}$ ; $M_r$ 474,3) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

*Première identification : A, B, C.*

*Seconde identification : A, B, D.*

A. La plante herbacée, vivace, mesure 60-150 cm, rarement 180 cm de haut. La tige est verte à rouge, dressée et peu ramifiée. Les feuilles, alternes, sont ovales à ovales-lancéolées, irrégulièrement dentées, rugueuses sur les 2 faces, de couleur vert foncé avec des nervures vert clair saillantes. Le limbe est épais et luisant. Le capitule, de grande taille, comporte un involucre formé de bractées disposées en 2 ou 3 rangées et un réceptacle plein, légèrement convexe. Les fleurons ligulés, périphériques, sont violets (4-6 cm), les fleurons tubulés, au centre, sont rose-violet. Chaque fleuron est situé à la base d'une bractée rougeâtre aiguë et coriace, plus longue que les fleurons tubulés. Le calice est réduit à une couronne très courte ; chaque sépale mesure environ 1 mm de long.

B. Réduisez la drogue en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est verte. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des faisceaux de fibres vert blanchâtre (longueur 150-200 µm, diamètre 10-15 µm), parfois entourés de dépôts noirs ; des fragments de feuilles à stomates de type anomocytique ou anisocytique (*2.8.3*) (longueur environ 35-40 µm) ; des poils ou fragments de poils tecteurs unisériés, composés principalement de 3 ou 4 cellules à parois épaisses, dont une cellule apicale nettement plus longue que les autres ; des fragments de feuilles à cellules épidermiques disposées en rosette autour de la base des poils tecteurs ; des poils sécréteurs unisériés formés de cellules à parois très minces ; des cellules parenchymateuses ponctuées provenant de la moelle de la tige ainsi que des cellules allongées, ponctuées, provenant du mésocarpe des akènes ; des fragments du parenchyme des graines, contenant des gouttelettes d'huile ; des fragments de l'épiderme des fleurs ligulées, composés de cellules papilleuses rouges à violettes ; des grains de pollen sphériques (30-40 µm de diamètre) à exine échinulée.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R*, puis traitez aux ultrasons pendant 5 min. Centrifugez et utilisez le surnageant.

*Solution témoin*. Dissolvez 0,5 mg d'*acide caféique R* et 0,5 mg d'*acide chlorogénique R* dans 5,0 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, méthyléthylcétone R, acétate d'éthyle R* (3:3:9:15 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 25 µL [ou 5 µL] de solution à examiner et 10 µL [ou 2 µL] de solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 5 cm].

*Séchage* : dans un courant d'air froid pendant environ 10 min, puis à 100 °C pendant 2 min.

*Détection* : pulvérisez la plaque encore chaude avec une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 5 g/L dans de l'*acétate d'éthyle R* ; après 30 min, examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres faibles bandes de fluorescence bleue peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande intense de fluorescence rouge |
| Acide caféique : une bande intense de fluorescence bleue | Une bande de fluorescence bleue |
| _______ | _______ |
| | Une bande de fluorescence bleue |
| Acide chlorogénique : une bande intense de fluorescence bleue | |
| | Une faible bande de fluorescence jaune-orangé |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

D. Examinez les chromatogrammes obtenus lors du dosage. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente un pic principal dû à l'acide cichorique et un pic de plus petite taille dû à l'acide caftarique. Les pics dus à l'acide caféique et à l'acide chlorogénique sont des pics mineurs ou peuvent être absents.

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

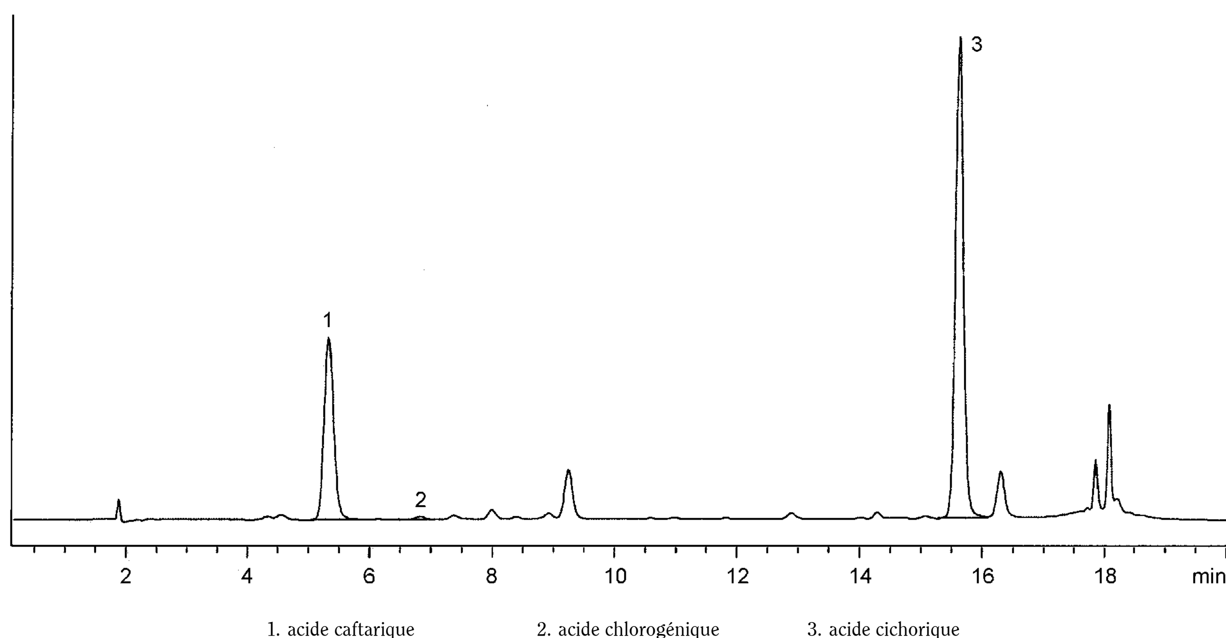
**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 12,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Dans une fiole jaugée de 100 mL, introduisez 0,500 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*) et ajoutez 80 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Traitez aux

Drogues végétales




1. acide caftarique 2. acide chlorogénique 3. acide cichorique

Figure 1823.-1. – *Chromatogramme pour le dosage de l'acide caftarique et de l'acide cichorique dans les parties aériennes fleuries d'Echinacea purpurea*

ultrasons pendant 15 min, puis complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Homogénéisez la suspension et laissez reposer pendant quelques minutes pour permettre le dépôt des particules solides visibles.

*Solution témoin.* Dissolvez 10,0 mg d'*acide chlorogénique SCR* et 10,0 mg d'*acide caféique R* dans de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Traitez aux ultrasons pendant 15 min et complétez à 10,0 mL avec de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Prélevez 4,0 mL de solution et complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R*.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
– température : 35 °C.

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acide phosphorique R, eau R* (1:999 *V/V*),
– *phase mobile B* : *acétonitrile R,*

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 | 90 | 10 |
| 0 - 13 | 90 → 78 | 10 → 22 |
| 13 - 14 | 78 → 60 | 22 → 40 |
| 14 - 20 | 60 | 40 |

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 330 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Rétention relative* par rapport à l'acide chlorogénique (temps de rétention = environ 7 min) : acide caftarique = environ 0,8 ; acide caféique = environ 1,5 ; cynarine = environ 1,6 ; échinacoside = environ 1,7 ; acide cichorique = environ 2,3.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 5 entre les pics dus à l'acide caféique et à l'acide chlorogénique.

Localisez les pics dus à l'acide caféique et à l'acide chlorogénique en utilisant le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Localisez les pic dus à l'acide caftarique et à l'acide cichorique en utilisant le chromatogramme de la figure 1823.-1.

Calculez la teneur pour cent en acide caftarique à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times C_2 \times 100 \times 0,881}{A_2 \times C_1}$$

Calculez la teneur pour cent en acide cichorique à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_3 \times C_2 \times 100 \times 0,695}{A_2 \times C_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'acide caftarique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'acide chlorogénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$A_3$ = surface du pic dû à l'acide cichorique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$C_1$ = concentration de la solution à examiner, en milligrammes par millilitre,

$C_2$ = concentration en acide chlorogénique de la solution témoin, en milligrammes par millilitre.

0,695 = facteur de corrélation basé sur la réponse observée en chromatographie liquide,

0,881 = facteur de corrélation entre l'acide caftarique et l'acide chlorogénique.

CONSERVATION

Sous forme non divisée.

**01/2008:1824**
**corrigé 6.0**

# ECHINACEA PURPUREA (RACINE D')

## Echinaceae purpureae radix

DÉFINITION

Organes souterrains, entiers ou coupés, séchés, d'*Echinacea purpurea* (L.) Moench.

*Teneur* : au minimum 0,5 pour cent pour la somme de l'acide caftarique ($C_{13}H_{12}O_9$ ; $M_r$ 312,2) et de l'acide cichorique ($C_{22}H_{18}O_{12}$ ; $M_r$ 474,3) (drogue desséchée).

Drogues végétales

IDENTIFICATION

*Première identification : A, B, C, E.*

*Seconde identification : A, B, D, E.*

A. Le rhizome, d'une longueur pouvant atteindre 15 cm, est ramifié et porte de nombreuses bases de tiges ; il est brun-rouge ou brun foncé à l'extérieur, blanc et fibreux à l'intérieur. Les nombreuses racines, brun clair ou brun foncé, sont tordues en spirale et leur surface présente une fine réticulation croisée.

B. Réduisez la drogue en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune pâle ou beige rosé. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : de nombreuses fibres fusiformes, brun clair, réunies en longs faisceaux non entourés de dépôts noirs ; de rares cellules scléreuses, provenant des rhizomes et des racines, généralement isolées (celles provenant des rhizomes mesurent environ 60 µm de diamètre, sont isodiamétriques et entourées de dépôts noirs, celles provenant des racines ont une longueur d'environ 50-120 µm et ne présentent pas de dépôts noirs) ; des poches sécrétrices, d'un diamètre pouvant atteindre 180 µm, contenant des gouttelettes huileuses jaunes ; des fragments de suber à cellules presque carrées ou rectangulaires, dont certaines à parois rougeâtres ; des vaisseaux ponctués, d'un diamètre de 30-40 µm.

C. Examinez le chromatogramme obtenu dans l'essai des autres espèces d'*Echinacea* et *Parthenium integrifolium*.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, de faibles bandes de fluorescence verdâtre peuvent également être présentes juste au-dessous de la bande située au milieu du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| Acide caféique : une bande intense de fluorescence bleue | Une bande intense de fluorescence bleue |
| _______ | _______ |
| Cynarine : une bande intense de fluorescence verdâtre | |
| | Une bande de fluorescence bleue |
| _______ | _______ |
| Echinacoside : une bande intense de fluorescence verdâtre | |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

D. Examinez les chromatogrammes obtenus dans le dosage. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente un pic principal dû à l'acide cichorique et un pic de plus petite taille dû à l'acide caftarique. Les pics dus à l'acide caféique et à l'acide chlorogénique sont des pics mineurs ou peuvent être absents.

E. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 1,0 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *chlorure de méthylène R*, puis traitez aux ultrasons pendant 5 min. Centrifugez et utilisez le surnageant.

*Solution témoin.* Dissolvez 1 mg de *β-sitostérol R* et un volume de solution de *N-isobutyldodécatétraenamide R* correspondant à 1 mg de *N-isobutyldodécatétraenamide R* dans 5,0 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, cyclohexane R, acétate d'éthyle R, toluène R* (0,9:3:6:24 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 25 µL [ou 5 µL], en bandes.

*Développement* : sur un parcours d'environ 15 cm [ou 5 cm].

*Séchage* : dans un courant d'air froid pendant environ 10 min.

*Détection* : plongez la plaque dans de la *solution d'aldéhyde anisique R* pendant 1 s puis chauffez à 100-105 °C pendant 3 min ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres faibles bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| | Une bande violet-bleu |
| β-Sitostérol : une bande violette ou rose | Une bande violette ou rose (β-sitostérol) |
| *N*-Isobutyldodécatétraénamide : une bande bleu-gris | Une bande bleu-gris (*N*-isobutyldodécatétraénamide) |
| _______ | _______ |
| | Une bande bleu-gris foncé |
| **Solution témoin** | **Solution examiner** |

ESSAI

**Autres espèces d'*Echinacea* et *Parthenium integrifolium*.** Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 1,0 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R*, puis traitez aux ultrasons pendant 5 min. Centrifugez et utilisez le surnageant.

*Solution témoin.* Dissolvez 1 mg d'*échinacoside R*, 1 mg de *cynarine R* et 0,5 mg d'*acide caféique R* dans 5,0 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, méthyléthylcétone R, acétate d'éthyle R* (3:3:9:15 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 5 µL] de solution à examiner et 5 µL [ou 2 µL] de solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 5 cm].

*Séchage* : dans un courant d'air froid pendant environ 10 min, puis à 105 °C pendant 2 min.

*Détection* : pulvérisez la plaque encore chaude à l'aide d'une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 5 g/L dans de l'*acétate d'éthyle R* ; après 30 min, examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande de fluorescence verdâtre correspondant à la bande due à l'échinacoside, ni de bande de fluorescence verdâtre correspondant à la bande due à la cynarine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Il ne présente pas, dans sa moitié inférieure, d'autres bandes que des bandes de fluorescence bleu foncé très faibles.

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3 pour cent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 9,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 2,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Dans une fiole jaugée de 100,0 mL, introduisez 0,500 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*) et ajoutez 80 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Traitez aux

Drogues végétales

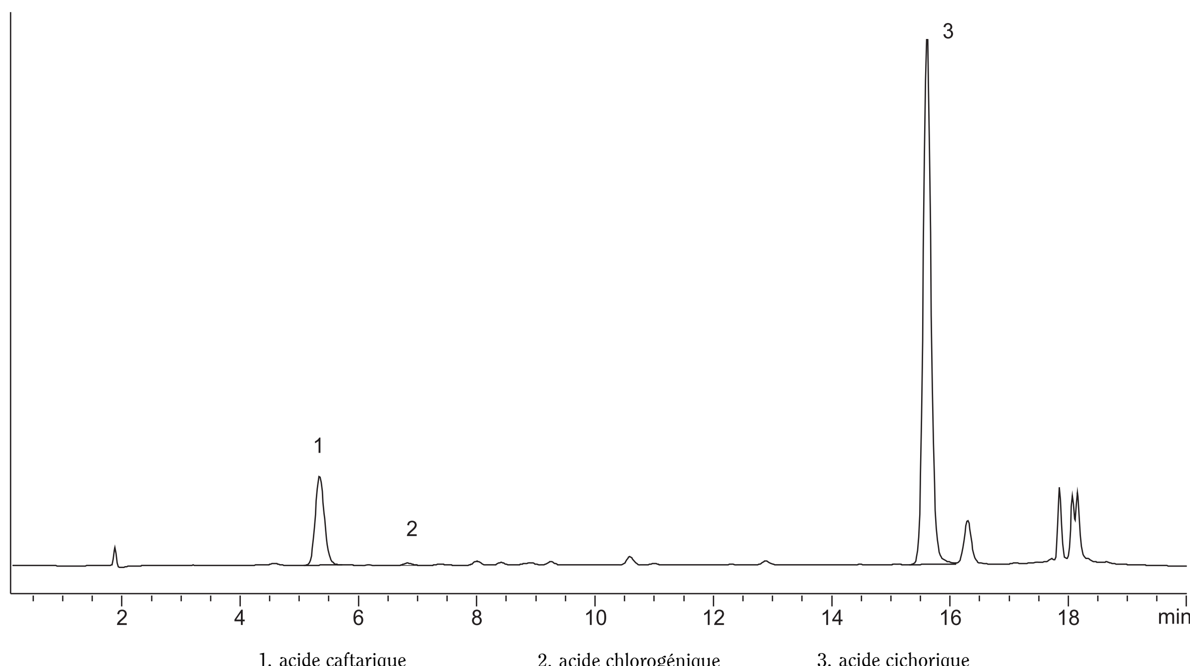



Figure 1824.-1. – *Chromatogramme pour le dosage de l'acide caftarique et de l'acide cichorique dans la racine d'Echinacea purpurea*

ultrasons pendant 15 min, puis complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Homogénéisez la suspension et laissez reposer pendant quelques minutes pour permettre le dépôt des particules solides visibles.

*Solution témoin*. Dissolvez 10,0 mg d'*acide chlorogénique SCR* et 10,0 mg d'*acide caféique R* dans de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Traitez aux ultrasons pendant 15 min et complétez à 10,0 mL avec de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Prélevez 4,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R*.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
– *température* : 35 °C.

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acide phosphorique R, eau R* (1:999 *V/V*),
– *phase mobile B* : *acétonitrile R,*

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 | 90 | 10 |
| 0 - 13 | 90 → 78 | 10 → 22 |
| 13 - 14 | 78 → 60 | 22 → 40 |
| 14 - 20 | 60 | 40 |

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 330 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Rétention relative* par rapport à l'acide chlorogénique (temps de rétention = environ 7 min) : acide caftarique = environ 0,8 ; acide caféique = environ 1,5 ; cynarine = environ 1,6 ; échinacoside = environ 1,7 ; acide cichorique = environ 2,3.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 5 entre les pics dus à l'acide caféique et à l'acide chlorogénique.

Localisez les pics dus à l'acide caféique et à l'acide chlorogénique en utilisant le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Localisez les pic dus à l'acide caftarique et à l'acide cichorique en utilisant le chromatogramme de la figure 1824.-1.

Calculez la teneur pour cent en acide caftarique à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times C_2 \times 100 \times 0,881}{A_2 \times C_1}$$

Calculez la teneur pour cent en acide cichorique à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_3 \times C_2 \times 100 \times 0,695}{A_2 \times C_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'acide caftarique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'acide chlorogénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$A_3$ = surface du pic dû à l'acide cichorique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$C_1$ = concentration en drogue desséchée de la solution à examiner, en milligrammes par millilitre,

$C_2$ = concentration en acide chlorogénique de la solution témoin, en milligrammes par millilitre,

0,695 = facteur de corrélation basé sur la réponse observée en chromatographie liquide,

0,881 = facteur de corrélation entre l'acide caftarique et l'acide chlorogénique.

CONSERVATION

Sous forme non divisée.

**01/2008:1419**
**corrigé 7.0**

# ÉLEUTHÉROCOQUE

## Eleutherococci radix

DÉFINITION

Organes souterrains séchés, entiers ou coupés, d'*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.

*Teneur* : au minimum 0,08 pour cent pour la somme de l'éleuthéroside B ($M_r$ 372,4) et de l'éleuthéroside E ($M_r$ 742,7).

Drogues végétales

IDENTIFICATION

A. Le rhizome noueux, de forme cylindrique irrégulière, possède un diamètre de 1,5 cm à 4,0 cm ; la surface brun-gris à brun-noir est rugueuse et sillonnée de rides longitudinales ; l'écorce, d'une épaisseur d'environ 2 mm, adhère étroitement au xylème ; le bois de coeur est brun clair et l'aubier jaune pâle ; la cassure présente de courtes fibres fines dans l'écorce et est grossièrement fibreuse au niveau de la partie interne du xylème. Le rhizome porte sur sa face inférieure de nombreuses racines cylindriques, noueuses, d'une longueur de 3,5 cm à 15 cm et d'un diamètre de 0,3 cm à 1,5 cm ; leur surface lisse est brun-gris à brun-noir ; l'écorce, d'une épaisseur d'environ 0,5 mm, adhère étroitement au xylème jaune pâle ; la cassure est légèrement fibreuse ; aux endroits où la couche externe a été arrachée, la surface apparente présente une coloration brun-jaune.

B. Réduisez l'éleuthérocoque en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente : de nombreux groupes de fibres lignifiées, à paroi épaisse ; des fragments de vaisseaux réticulés ou ponctués à large lumen ; des groupes de canaux sécréteurs, d'un diamètre pouvant atteindre 20 µm, à contenu marron ; des cellules parenchymateuses contenant des macles d'oxalate de calcium de 10 µm à 50 µm de diamètre. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente de petits grains d'amidon de forme arrondie à légèrement angulaire, simples ou composés de 2 à 3 éléments.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g d'éleuthérocoque pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL d'*alcool à 50 pour cent V/V R* et chauffez à reflux pendant 1 h. Refroidissez et filtrez. Evaporez le filtrat à siccité au bain-marie. Reprenez le résidu dans 2,5 mL d'un mélange de 5 volumes d'*eau R* et de 20 volumes d'*alcool à 50 pour cent V/V R* et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 2,0 mg d'*esculine R* et 2,0 mg de *catalpol R* dans 20 mL d'un mélange de 2 volumes d'*eau R* et de 8 volumes d'*alcool à 50 pour cent V/V R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R, chlorure de méthylène R* (4:30:70 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats A* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente une bande de fluorescence bleue (esculine) dans sa moitié supérieure.

*Détection B* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R*. Examinez à la lumière du jour, en chauffant à 100-105 °C pendant 5-10 min.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande brune (éleuthéroside B) |
| Esculine : une bande de fluorescence bleue (marquée à 365 nm) | |
| | Une bande brun-rouge (éleuthéroside E) |
| _______ | _______ |
| Catalpol : une bande brun-violet | |
| _______ | _______ |
| | 2 bandes brunes |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3 pour cent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g d'éleuthérocoque pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 8,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. A 0,500 g d'éleuthérocoque pulvérisé (355) (*2.9.12*) ajoutez 30 mL d'un mélange à volumes égaux d'*alcool R* et d'*eau R* dans un ballon à fond rond de 100 mL. Chauffez au bain-marie à 60 °C pendant 30 min. Laissez refroidir et filtrez sur un filtre de verre fritté (*2.1.2*). Collectez le liquide dans un ballon à fond rond de 250 mL. Répétez cette opération 2 fois, en utilisant le résidu obtenu dans l'étape de filtration au lieu de la drogue pulvérisée. Ajoutez les fractions de surnageant dans le ballon à fond rond de 250 mL. Evaporez sous pression réduite jusqu'à obtenir environ 10 mL de surnageant dans le ballon. Transvasez le surnageant dans une fiole jaugée de 20,0 mL et complétez à 20,0 mL avec un mélange à volumes égaux d'*alcool R* et d'*eau R*. Filtrez sur un filtre de nylon (diamètre de pores 0,45 µm).

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 10 mg d'*acide férulique R* dans un mélange à volumes égaux de *méthanol R* et d'*eau R* et complétez à 20,0 mL avec le même mélange de solvants.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 10 mg d'*acide caféique R* dans un mélange à volumes égaux de *méthanol R* et d'*eau R* et complétez à 20,0 mL avec le même mélange de solvants.

*Solution témoin (c)*. Transvasez 1 mL de solution témoin (a) dans une fiole jaugée de 25 mL et complétez à 25,0 mL avec un mélange à volumes égaux de *méthanol R* et d'*eau R*. Filtrez sur un filtre de nylon (diamètre de pores 0,45 µm).

*Solution témoin (d)*. Transvasez 1 mL de solution témoin (a) et 1 mL de solution témoin (b) dans un mélange à volumes égaux de *méthanol R* et d'*eau R* et complétez à 25,0 mL avec le même mélange de solvants. Filtrez sur un filtre de nylon (diamètre de pores 0,45 µm).

*Précolonne* :

– *dimensions* : *l* = 4 mm, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Colonne :*

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acide phosphorique R, eau R* (0,5:99,5 *V/V*),
– *phase mobile B* : *acétonitrile pour chromatographie R*,

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 5 | 90 | 10 |
| 5 - 27 | 90 → 80 | 10 → 20 |
| 27 - 30 | 80 → 50 | 20 → 50 |
| 30 - 35 | 50 | 50 |

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 220 nm.

*Injection* : 20 µL de solution à examiner et des solutions témoins (c) et (d).

*Temps de rétention* : éleuthéroside B = environ 10 min ; éleuthéroside E = environ 22 min.

Localisez les pics dûs à l'éleuthéroside B et à l'éleuthéroside E à l'aide des spectres UV des figures 1419.-1 et 1419.-2.

Calculez la teneur totale en éleuthéroside B et en éleuthéroside E à l'aide de l'expression :

$$\frac{(A_{\mathrm{B}} \times C \times 0,73 \times 2)}{(A_{\mathrm{R}} \times m)} + \frac{(A_{\mathrm{E}} \times C \times 1,90 \times 2)}{(A_{\mathrm{R}} \times m)}$$

$A_B$ = surface du pic dû à l'éleuthéroside B dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_E$ = surface du pic dû à l'éleuthéroside E dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_R$ = surface du pic dû à l'acide férulique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c),

$C$ = concentration de l'acide férulique dans la solution témoin (c), en microgrammes par millilitre,

$m$ = masse de la prise d'essai, en milligrammes.

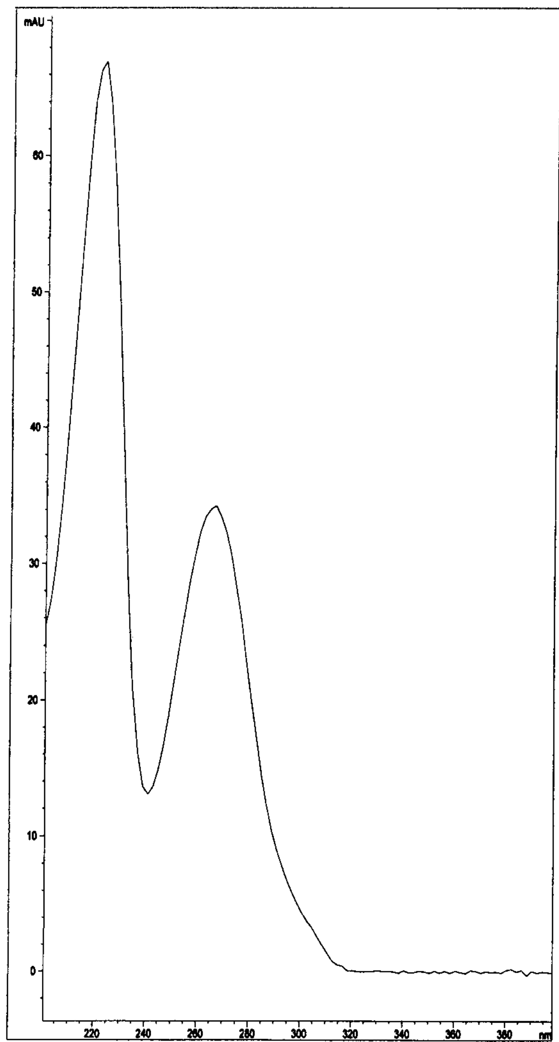



Figure 1419.-1. – *Spectre UV de l'éleuthéroside B pour le dosage de l'éleuthérocoque*

*Conformité du système* : solution témoin (d) :

– *résolution* : au minimum 15 entre les pics dus à l'acide caféique et à l'acide férulique.

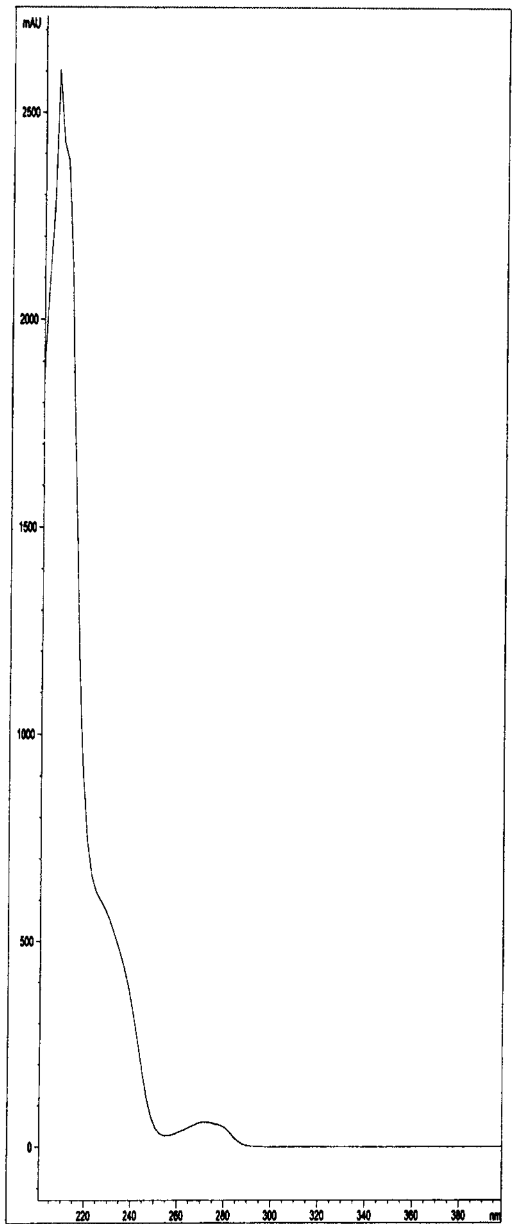



Figure 1419.-2. – *Spectre UV de l'éleuthéroside E pour le dosage de l'éleuthérocoque*

**01/2008:2310**
**corrigé 6.0**

# ENCENS INDIEN

## Olibanum indicum

DÉFINITION

Exsudat résineux, séché à l'air, obtenu par incision du tronc ou des rameaux de *Boswellia serrata* Roxb. ex Colebr.

*Teneur* :

– *acide 11-céto-β-boswellique* ($C_{30}H_{46}O_4$ ; $M_r$ 470,7) : au minimum 1,0 pour cent (drogue desséchée),

– *acide acétyl-11-céto-β-boswellique* ($C_{32}H_{48}O_5$ ; $M_r$ 512,7) : au minimum 1,0 pour cent (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. L'encens indien est constitué de grains ou fragments translucides, de forme arrondie ou irrégulière et de taille variable pouvant aller jusqu'à 3 cm. Ils sont jaunâtres ou brun-rouge et leur surface est couverte d'une poussière grise. La cassure est mate ou légèrement brillante.

B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g d'encens indien pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 90 mL de *méthanol R*, puis traitez aux ultrasons pendant 10 min en agitant énergiquement à 3 ou 4 reprises. Complétez à 100 mL avec du *méthanol R*, puis centrifugez. Utilisez le surnageant limpide.

*Solution témoin*. Dissolvez 2 mg d'*acide 11-céto-β-boswellique R* et 2 mg d'*acide acétyl-11-céto-β-boswellique R* dans 20 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, heptane R, acétate d'éthyle R, toluène R* (3:10:20:80 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 3 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 8 cm [ou 5 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Les bandes dues à l'acide acétyl 11-céto-β-boswellique et à l'acide 11-céto-β-boswellique, obtenus avec la solution à examiner, sont d'intensité approximativement équivalentes. Par ailleurs, d'autres faibles bandes d'atténuation peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| _______ | _______ |
| Acide acétyl-11-céto-β-boswellique : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence (acide acétyl-11-céto-β-boswellique) |
| Acide 11-céto-β-boswellique : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence (acide 11-céto-β-boswellique) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 8,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 3 h sur 1,000 g d'encens indien pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g d'encens indien pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 90 mL de *méthanol R*, puis traitez aux ultrasons pendant 10 min en agitant énergiquement à 3 ou 4 reprises. Complétez à 100,0 mL avec du *méthanol R*, puis centrifugez pendant 5 min. Prélevez 1,0 mL du surnageant limpide et complétez à 10,0 mL avec un mélange de 16 volumes de phase mobile A et de 84 volumes de phase mobile B.

*Solution témoin*. Dissolvez 1,0 mg d'*acide 11-céto-β-boswellique R* et 1,0 mg d'*acide acétyl-11-céto-β-boswellique R* dans 20,0 mL de *méthanol R*. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile A.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,

– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acide phosphorique R, eau R* (0,1:99,9 *V/V*),

– *phase mobile B* : *acide phosphorique R, acétonitrile R* (0,1:99,9 *V/V*),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 12,5 | 16 → 6 | 84 → 94 |
| 12,5 - 13,5 | 6 → 0 | 94 → 100 |
| 13,5 - 28 | 0 | 100 |

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 250 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Temps de rétention* : acide 11-céto-β-boswellique = environ 8 min ; acide acétyl-11-céto-β-boswellique = environ 12 min.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 6,0 entre les pics dus à l'acide 11-céto-β-boswellique et à l'acide acétyl-11-céto-β-boswellique.

Calculez la teneur pour cent en acide 11-céto-β-boswellique à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_1 \times 5 \times p_1}{A_2 \times m}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'acide 11-céto-β-boswellique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'acide 11-céto-β-boswellique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes,

$m_1$ = masse d'*acide 11-céto-β-boswellique R* dans la solution témoin, en grammes,

$p_1$ = teneur pour cent en acide 11-céto-β-boswellique de l'*acide 11-céto-β-boswellique R*.

Calculez la teneur pour cent en acide acétyl-11-céto-β-boswellique à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_3 \times m_2 \times 5 \times p_2}{A_4 \times m}$$

$A_3$ = surface du pic dû à l'acide acétyl-11-céto-β-boswellique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_4$ = surface du pic dû à l'acide acétyl-11-céto-β-boswellique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes,

$m_2$ = masse d'*acide acétyl-11-céto-β-boswellique R* dans la solution témoin, en grammes,

$p_2$ = teneur pour cent en acide acétyl-11-céto-β-boswellique de l'*acide acétyl-11-céto-β-boswellique R*.

**04/2010:2451**

# ÉPHÉDRA (PARTIES AÉRIENNES D')

## Ephedrae herba

DÉFINITION

Tige herbacée séchée d'*Ephedra sinica* Stapf, d'*Ephedra intermedia* Schrenk et C.A.Mey. ou d'*Ephedra equisetina* Bunge.

*Teneur* : au minimum 1,0 pour cent d'éphédrine ($C_{10}H_{15}NO$ ; $M_r$ 165,2) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Tiges cylindriques grêles, vert pâle ou vert-jaune, pouvant atteindre 30 cm de longueur et 1-3 mm de diamètre ; surface légèrement rugueuse présentant des stries longitudinales ; entre-noeuds de 1-6 cm de longueur ; feuilles opposées et décussées réduites à des écailles entourant la tige, avec un très petit limbe en triangle aigu de 1,5-4 mm de longueur, à 2 (rarement 3) lobes, à apex blanc-gris et base tubulaire brun-rouge ou brun-noir. Cassure légèrement fibreuse.

B. Réduisez les parties aériennes d'éphédra en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune-vert. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments d'épiderme, vus de face, composés de cellules rectangulaires et de nombreux stomates portant une petite dépression à chaque extrémité, avec des cellules de garde larges et approximativement elliptiques ; des fragments d'épiderme, vus en section transversale, présentant une cuticule épaisse, et certaines cellules qui s'étendent pour former des projections ; des fibres, simples ou groupées, généralement lignifiées, à parois épaisses ; des fragments de tissu vasculaire comportant de petites trachéides à ponctuations aréolées, des vaisseaux à épaississements spiralés et des groupes de cellules scléreuses ; des groupes de cellules parenchymateuses, certaines à parois épaissies et ponctuées ; des prismes dispersés d'oxalate de calcium.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 0,2 g de parties aériennes d'éphédra pulvérisées (355) (*2.9.12*), ajoutez 0,5 mL d'*ammoniaque concentrée R* et 10 mL de *chlorure de méthylène R*. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 1 h. Laissez refroidir, filtrez et évaporez le filtrat à siccité. Dissolvez le résidu dans 2 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 1 mg de *chlorhydrate d'éphédrine SCR* et 1 mg de *chlorhydrate de 2-indanamine R* dans 2 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, méthanol R, chlorure de méthylène R* (0,5:5:20 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 1 µL] sous forme de points d'un diamètre de 5 mm [ou 2 mm].

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution de *ninhydrine R* à 2 g/L dans de l'*éthanol à 96 pour cent R* ; chauffez à 110 °C pendant 10 min et examinez immédiatement à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des taches présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres taches de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| 2-Indanamine : une tache pourpre | |
| | Une tache pourpre peut être présente |
| _______ | _______ |
| Ephédrine : une tache pourpre à la frontière entre le tiers moyen et le tiers inférieur | Une tache pourpre (éphédrine) à la frontière entre le tiers moyen et le tiers inférieur |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de parties aériennes d'éphédra pulvérisées (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 9,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* A 0,200 g de parties aériennes d'éphédra pulvérisées (355) (*2.9.12*), ajoutez 25,0 mL de *méthanol R*. Pesez et traitez aux ultrasons pendant 45 min. Laissez refroidir, pesez et ramenez à la masse initiale avec du *méthanol R*. Agitez bien et filtrez. Transférez 1,0 mL du filtrat dans une petite colonne (1 cm de diamètre) contenant 1,50 g d'*oxyde d'aluminium neutre R* (60-210 µm). Eluez avec un mélange à volumes égaux de *méthanol R* et d'*eau R*. Recueillez environ 9 mL de l'éluat, ajoutez 0,5 mL d'*acide phosphorique R* et complétez à 10,0 mL avec un mélange à volumes égaux de *méthanol R* et d'*eau R*.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 10,0 mg de *chlorhydrate d'éphédrine SCR* dans du *méthanol R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Prélevez 2,0 mL de solution et complétez à 25,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 1 mg de *chlorhydrate d'éphédrine SCR* et 1 mg de *sulfate de terbutaline SCR* dans du *méthanol R* et complétez à 10 mL avec le même solvant. Prélevez 2 mL de solution et complétez à 25 mL avec la phase mobile.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : *acétonitrile R1*, solution d'*acide phosphorique R* à 0,1 pour cent *V/V* (15:85 *V/V*).

*Débit* : 2,0 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 207 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Enregistrement* : 3 fois le temps de rétention de l'éphédrine.

Drogues végétales

*Conformité du système* : solution témoin (b) :

– *résolution* : au minimum 3,5 entre les pics dus à la terbutaline et à l'éphédrine.

Calculez la teneur pour cent en éphédrine à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 165,2}{A_2 \times m_1 \times 5 \times 201,7}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'éphédrine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'éphédrine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),

$m_1$ = masse de drogue à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse de *chlorhydrate d'éphédrine SCR* utilisée pour préparer la solution témoin (a), en grammes,

$p$ = teneur pour cent en chlorhydrate d'éphédrine dans le *chlorhydrate d'éphédrine SCR*.

**01/2008:1320**

# EUCALYPTUS (FEUILLE D')

## Eucalypti folium

DÉFINITION

Feuille séchée, entière ou coupée, récoltée sur les rameaux plus âgés d'*Eucalyptus globulus* Labill.

*Teneur* : au minimum 20 mL/kg d'huile essentielle dans la drogue entière (drogue anhydre) et au minimum 15 mL/kg d'huile essentielle dans la drogue coupée (drogue anhydre).

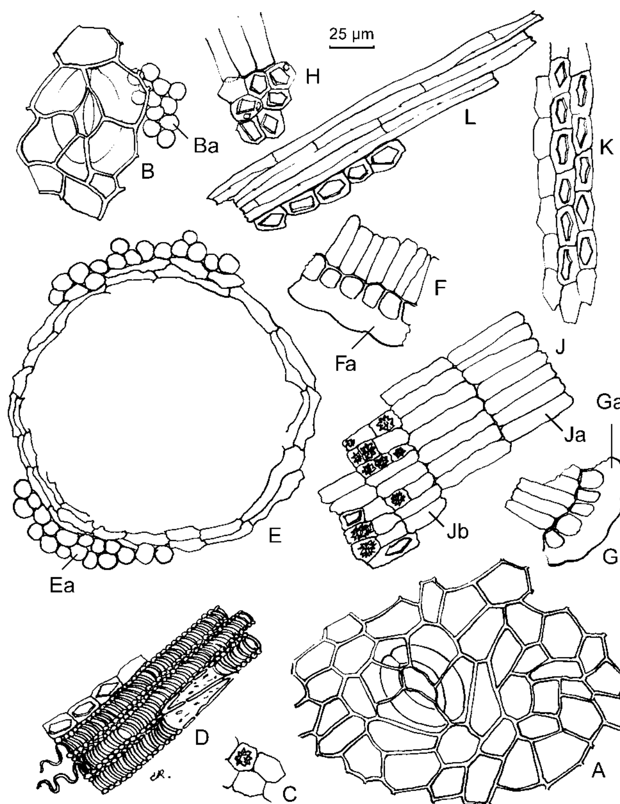
CARACTÈRES

Odeur aromatique de cinéole.

IDENTIFICATION

A. La feuille est généralement vert-gris, assez épaisse, de forme allongée, elliptique et légèrement falciforme, en général d'une longueur de 25 cm et d'une largeur atteignant 5 cm. Le pétiole est tordu, fortement ridé et d'une longueur de 2-3 cm, atteignant parfois 5 cm. La feuille, rigide et coriace, est entière et glabre ; elle présente une nervure centrale vert-jaune. Les nervures secondaires s'anastomosent sur les bords de la feuille en une ligne continue. Les bords sont réguliers et légèrement épaissis. Les 2 faces sont ponctuées de minuscules taches verruqueuses brun foncé, réparties de façon irrégulière. De petites poches sécrétrices sont visibles par transparence.

B. Réduisez la feuille d'eucalyptus en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-gris. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de limbe glabre à petites cellules épidermiques à paroi épaisse, comportant une épaisse cuticule, de nombreux stomates anomocytiques (*2.8.3*) d'un diamètre supérieur à 80 µm, et parfois des groupes de cellules subéreuses brunes, d'un diamètre de 300 µm et dont le centre est noir-brun ; des fragments de mésophylle isobilatéral avec 2-3 couches de tissu palissadique de chaque coté et au centre plusieurs couches de parenchyme lacuneux à cellules allongées dans la direction des cellules palissadiques et contenant des prismes et macles d'oxalate de calcium ; des fragments de mésophylle contenant de grandes poches sécrétrices schizogènes.




A. Cellules épidermiques à paroi épaisse et stomates anomocytiques, vus de face

B. Cellules épidermiques à paroi épaisse et stomates anomocytiques, accompagnés de parenchyme palissadique (Ba), vus de face

C. Cellules de parenchyme avec macle d'oxalate de calcium

D. Vaisseaux de bois

E. Poche sécrétrice schizogène accompagnée de parenchyme palissadique (Ea)

F et G. Epiderme recouvert d'une cuticule épaisse (Fa et Ga), vu en section transversale

H et J. Parenchyme palissadique (Ja) accompagné de parenchyme lacuneux (Jb) contenant des prismes et des macles d'oxalate de calcium

K. Cellules contenant des prismes d'oxalate de calcium

L. Fibres

Figure 1320.-1. – *Dessin pour l'identification de la feuille d'eucalyptus (voir Identification B)*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Agitez 0,5 g de feuille d'eucalyptus récemment pulvérisée (355) (*2.9.12*) avec 5 mL de *toluène R* pendant 2-3 min, puis filtrez sur environ 2 g de *sulfate de sodium anhydre R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 50 µL de *cinéole R* dans du *toluène R* et complétez à 5 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (10:90 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R*. Examinez à la lumière du jour, en chauffant à 100-105 °C pendant 5-10 min.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente dans sa partie médiane une bande principale due au cinéole. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande principale semblable quant à sa position et sa coloration à la bande due au cinéole dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin ; il présente également une bande violet intense (hydrocarbures) près du front du solvant. Il peut également présenter d'autres bandes plus faibles.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3 pour cent de feuilles foncées et brunes, au maximum 5 pour cent de tiges et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers. Aucune feuille de rameaux jeunes de forme cordée ou ovale, sessile, ponctuée sur les 2 faces de nombreuses glandes visibles en transparence, n'est présente. Effectuez la détermination sur 30 g de feuille d'eucalyptus.

**Eau** (*2.2.13*) : au maximum 100 mL/kg, déterminé sur 20,0 g de feuille d'eucalyptus pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 6,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez 10,0 g de feuille d'eucalyptus coupée extemporanément, un ballon à fond rond de 500 mL, 200 mL d'*eau R* et 100 mL de *glycérol R* comme liquide d'entraînement. Ajoutez 0,5 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 2 h.

**07/2010:0390**

# EUCALYPTUS (HUILE ESSENTIELLE D')

## Eucalypti aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau suivi de rectification, à partir des feuilles fraîches ou des tiges terminales fraîches de plusieurs espèces d'*Eucalyptus* riches en 1,8-cinéole. Les espèces principalement utilisées sont : *Eucalyptus globulus* Labill., *Eucalyptus polybractea* R.T.Baker et *Eucalyptus smithii* R.T.Baker.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide incolore ou jaune pâle.

*Odeur* : rappelant celle du 1,8-cinéole.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,1 g d'huile essentielle d'eucalyptus dans du *toluène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 20 µL d'*α-terpinéol R* et 50 µL de *cinéole R* dans du *toluène R* et complétez à 5 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (10:90 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 2 µL] en bandes de 10 mm [ou 6 mm].

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min puis examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner près du front de solvant et au niveau de l'α-terpinéol.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| ___ | ___ |
| 1,8-Cinéole : une bande brun-violet | Une bande brun-violet intense (1,8-cinéole) |
| ___ | ___ |
| α-Terpinéol : une bande brun-violet | |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques dus à l'α-pinène, au β-pinène, à l'α-phellandrène, au limonène et au 1,8-cinéole dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention à ceux du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a). Le sabinène et le camphre peuvent être présents dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,906 à 0,927.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,458 à 1,470.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : 0° à + 10°.

**Solubilité dans l'alcool** (*2.8.10*). L'huile essentielle d'eucalyptus est soluble dans 5 volumes d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*.

**Aldéhydes**. Dans un tube de verre à bouchon rodé d'un diamètre de 25 mm et d'une longueur de 150 mm contenant 10 mL d'huile essentielle d'eucalyptus, ajoutez 5 mL de *toluène R* et 4 mL de *solution alcoolique d'hydroxylamine R*. Agitez énergiquement et titrez immédiatement par l'*hydroxyde de potassium 0,5 M dans l'alcool à 60 pour cent V/V*, jusqu'à virage du rouge au jaune. Continuez le titrage sans cesser d'agiter jusqu'à coloration jaune franc de l'indicateur. Agitez pendant 2 min et laissez reposer. Le point final est atteint lorsque la coloration persiste dans la phase inférieure. La réaction est terminée en environ 15 min. Répétez l'opération sur une 2$^{e}$ prise d'essai de 10 mL d'huile essentielle d'eucalyptus et utilisez comme solution témoin pour le point de virage le liquide obtenu dans le 1$^{er}$ titrage additionné de 0,5 mL d'*hydroxyde de potassium 0,5 M dans l'alcool à 60 pour cent V/V*. La quantité d'*hydroxyde de potassium 0,5 M dans l'alcool à 60 pour cent V/V* utilisée dans le 2$^{e}$ titrage n'est pas supérieure à 2,0 mL.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. Dissolvez 200 µL d'huile essentielle d'eucalyptus dans de l'*heptane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 10 µL d'*α-pinène R*, 5 µL de *β-pinène R*, 5 µL de *sabinène R*, 5 µL d'*α-phellandrène R*, 10 µL de *limonène R*, 50 µL de *cinéole R* et 5 mg de *camphre R* dans de l'*heptane R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 5 µL de *limonène R* dans de l'*heptane R* et complétez à 50,0 mL avec le même solvant. Prélevez 0,5 mL de solution et complétez à 5,0 mL avec l'*heptane R*.

*Colonne* :

- *matériau* : silice fondue,
- *dimensions* : $l$ = 60 m, Ø = environ 0,25 mm,
- *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur du film 0,25 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Rapport de division* : 1:50.

Drogues végétales

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 5 | 60 |
| | 5 - 33 | 60 → 200 |
| | 33 - 38 | 200 |
| Chambre à injection | | 220 |
| Détecteur | | 220 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 μL.

*Ordre d'élution* : ordre indiqué dans la préparation de la solution témoin (a). Enregistrez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin (a) :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au limonène et au cinéole.

*Identification des composants* : à l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a), localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les composants de la solution témoin (a).

Déterminez la teneur pour cent de chacun de ces composants. Ces teneurs sont comprises entre les valeurs suivantes :

– *α-pinène* : 0,05 pour cent à 10,0 pour cent,
– *β-pinène* : 0,05 pour cent à 1,5 pour cent,
– *sabinène* : au maximum 0,3 pour cent,
– *α-phellandrène* : 0,05 pour cent à 1,5 pour cent,
– *limonène* : 0,05 pour cent à 15,0 pour cent,
– *1,8-cinéole* : au minimum 70,0 pour cent,
– *camphre* : au maximum 0,1 pour cent,
– *limite d'exclusion* : la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,05 pour cent).

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

**01/2008:0824**

# FENOUIL AMER (FRUIT DE)

## Foeniculi amari fructus

DÉFINITION

Diakènes et méricarpes secs de *Foeniculum vulgare* Miller ssp. *vulgare* var. *vulgare*.

*Teneur* :

– *huile essentielle* : au minimum 40 mL/kg (drogue anhydre),
– *anéthole* : au minimum 60,0 pour cent dans l'huile essentielle,
– *fenchone* : au minimum 15,0 pour cent dans l'huile essentielle.

CARACTÈRES

Le fruit de fenouil amer est brun-vert, brun ou vert.

IDENTIFICATION

A. Le fruit de fenouil amer est un diakène, de forme presque cylindrique, arrondi à la base et rétréci au sommet, couronné par un large stylopode. Il mesure généralement 3-12 mm de long et 3-4 mm de large. Les méricarpes, le plus souvent libres, sont glabres. Ils présentent chacun 5 côtes saillantes, légèrement carénées, renfermant 4 canaux sécréteurs sur la face dorsale et 2 sur la face ventrale, visibles à la loupe, sur une coupe transversale.

B. Réduisez le fruit de fenouil amer en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-gris ou jaune-gris. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments jaunes de larges canaux sécréteurs, constitués généralement de cellules sécrétrices polygonales à paroi brun-jaune, souvent surmontés de cellules alignées de façon régulière, à paroi mince, allongées transversalement, d'une largeur de 2-9 μm ; le parenchyme réticulé du mésocarpe ; de nombreux faisceaux de fibres provenant des côtes, souvent accompagnés de vaisseaux spiralés étroits ; de très nombreux fragments d'albumen contenant des grains d'aleurone et de très petites macles d'oxalate de calcium, ainsi que quelques faisceaux de fibres provenant du carpophore.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Agitez 0,3 g de fruit de fenouil amer récemment pulvérisé (1400) (*2.9.12*) avec 5,0 mL de *chlorure de méthylène R* pendant 15 min. Filtrez et évaporez avec précaution le filtrat à siccité au bain-maire à 60 °C. Dissolvez le résidu dans 0,5 mL de *toluène R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 50 μL d'*anéthole R* et 10 μL de *fenchone R* dans 5,0 mL d'*hexane R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $GF_{254}$ pour CCM R*.

*Phase mobile* : *hexane R, toluène R* (20:80 *V/V*).

*Dépôt* : 10 μL, en bandes de 20 mm sur 3 mm.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : les chromatogrammes présentent dans leur partie médiane une bande d'atténuation de fluorescence due à l'anéthole.

*Détection B* : pulvérisez de l'*acide sulfurique R*, puis chauffez à 140 °C pendant 5-10 min jusqu'à apparition dans le tiers inférieur des chromatogrammes d'une bande jaune due à la fenchone.

*Résultats B* : les chromatogrammes présentent dans leur partie médiane une bande violette due à l'anéthole. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente en outre une bande brun-rouge dans son tiers supérieur (terpènes).

ESSAI

**Estragole**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. Complétez le mélange d'huile essentielle et de *xylène R* obtenu dans le dosage de l'huile essentielle à 5,0 mL avec du *xylène R*, en rinçant l'appareil.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg d'*estragole R* dans 0,5 mL de *xylène R*.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 30-60 m, Ø = 0,3 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R*.

*Gaz vecteur* : *azote pour chromatographie R*.

*Débit* : 0,40 mL/min.

*Rapport de division* : 1:200.

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 4 | 60 |
| | 4 - 26 | 60 → 170 |
| | 26 - 41 | 170 |
| Chambre à injection | | 220 |
| Détecteur | | 270 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 μL.

*Limites* :

– *estragole* : au maximum 5,0 pour cent dans l'huile essentielle obtenue sous Dosage.

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 1,5 pour cent de pédoncules et au maximum 1,5 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Eau** (*2.2.13*) : au maximum 80 mL/kg, déterminé sur 20,0 g de fenouil amer pulvérisé (710) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

DOSAGE

**Huile essentielle**. Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*).

Utilisez un ballon de 500 mL et 200 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Réduisez le fruit de fenouil amer en poudre grossière (1400) (*2.9.12*). Procédez immédiatement à la détermination sur 5,0 g de poudre. Introduisez 0,50 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 2 h.

**Anéthole et fenchone**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications de l'essai de l'estragole avec les modifications suivantes.

*Solution témoin.* Dissolvez 5 mg de *fenchone R* et 5 mg d'*anéthole R* dans 0,5 mL de *xylène R*.

*Ordre d'élution* : ordre indiqué pour la préparation de la solution témoin. Notez les temps de rétention de ces substances.

CONSERVATION

A l'abri de l'humidité.

**01/2008:1826**

# FENOUIL AMER (FRUIT DE), HUILE ESSENTIELLE DE

## Foeniculi amari fructus aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau à partir des fruits mûrs de *Foeniculum vulgare* Miller, ssp. *vulgare* var. *vulgare*.

*Teneur* :

– fenchone : 12,0 pour cent à 25,0 pour cent,

– *trans*-anéthole : 55,0 pour cent à 75,0 pour cent.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, incolore ou jaune clair.

Odeur caractéristique.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Dissolvez 0,1 mL d'huile essentielle à examiner dans 5 mL de *toluène R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 10 µL de *fenchone R* et 80 µL d'*anéthole R* dans 5 mL de *toluène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution récemment préparée d'*acide phosphomolybdique R* à 200 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R* et chauffez à 150 °C pendant 15 min ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. De plus, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Anéthole : une bande bleu foncé à violet foncé<br>_______ | Une bande bleu foncé à violet foncé (anéthole)<br>_______ |
| Fenchone : une bande bleue ou gris-bleu<br>_______ | Une bande bleue ou gris-bleu (fenchone)<br>_______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables, quant à leur temps de rétention, aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,961 à 0,975.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,528 à 1,539.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : + 10,0° à + 24,0°.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner.* Dissolvez 0,20 mL d'huile essentielle à examiner dans de l'*heptane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin.* Dissolvez 20 µL d'*α-pinène R*, 20 µL de *limonène R*, 50 µL de *fenchone R*, 20 µL d'*estragole R*, 100 µL d'*anéthole R* et 20 µL d'*aldéhyde anisique R* dans de l'*heptane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,

– *dimensions* : $l$ = 60 m, Ø = 0,25 mm,

– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur du film 0,25 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R.*

*Débit* : 1 mL/min.

*Rapport de division* : 1:200.

*Température* :

| | **Intervalle (min)** | **Température (°C)** |
|---|---|---|
| Colonne | 0 – 4 | 60 |
| | 4 – 26 | 60 → 170 |
| | 26 – 41 | 170 |
| Chambre à injection | | 220 |
| Détecteur | | 270 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1,0 µL.

*Ordre d'élution* : ordre donné pour la préparation de la solution témoin. Notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 5,0 entre les pics dus à l'estragole et au *trans*-anéthole.

Drogues végétales

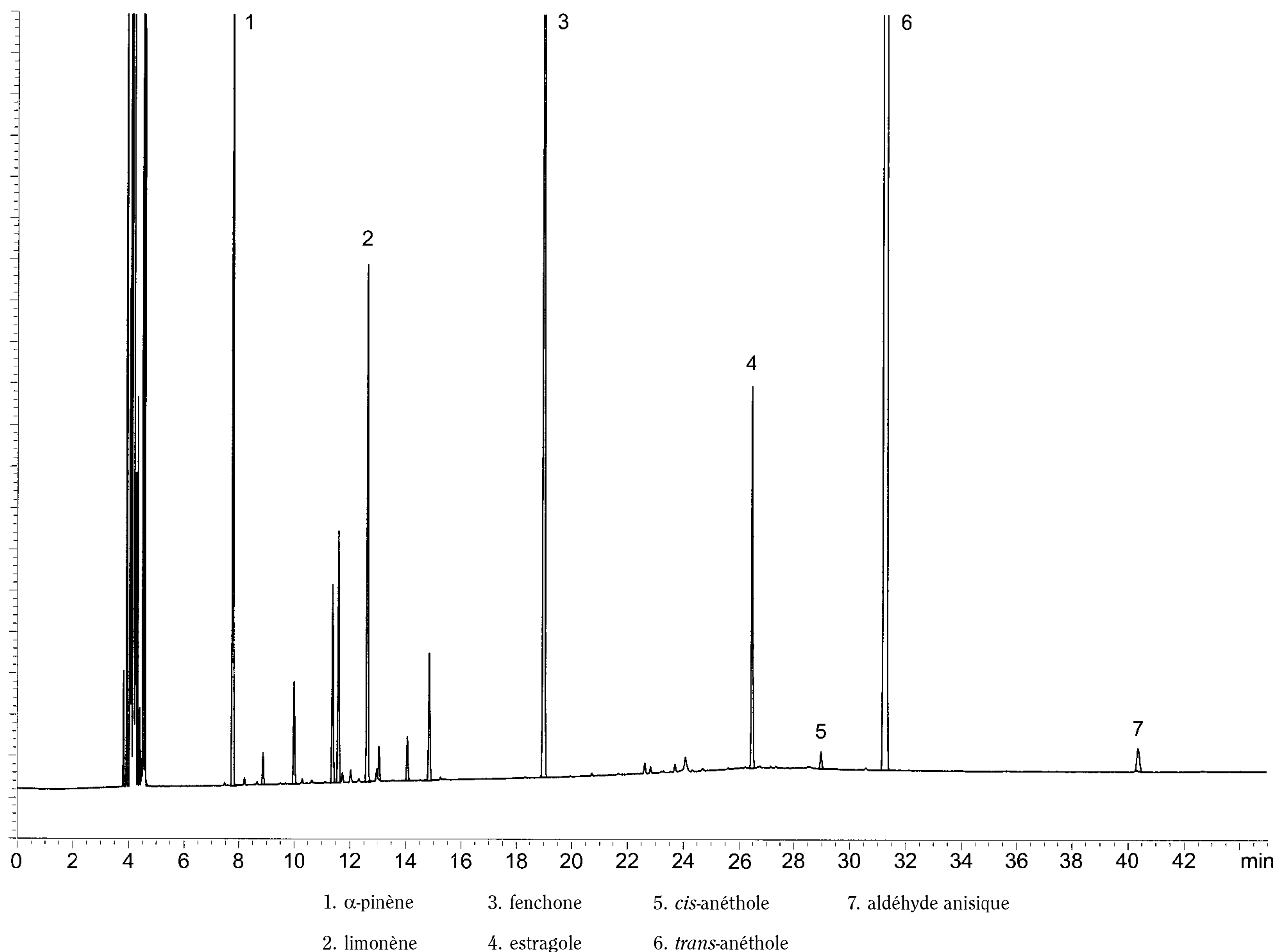



Figure 1826.-1. – *Chromatogramme pour l'essai du profil chromatographique de l'huile essentielle de fruit de fenouil amer*

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez les composants de la solution témoin sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner et le *cis*-anéthole à l'aide de la figure 1826.-1. (Ne tenez pas compte du pic dû à l'heptane).

Déterminez la teneur pour cent de ces composants. Ces teneurs sont comprises entres les valeurs suivantes :

– *α-pinène* : 1,0 pour cent à 10,0 pour cent,

– *limonène* : 0,9 pour cent à 5,0 pour cent,

– *fenchone* : 12,0 pour cent à 25,0 pour cent,

– *estragole* : au maximum 6,0 pour cent,

– *cis-anéthole* : au maximum 0,5 pour cent,

– *trans-anéthole* : 55,0 pour cent à 75,0 pour cent,

– *aldéhyde anisique* : au maximum 2,0 pour cent.

Le rapport des teneurs en α-pinène et en limonène est supérieur à 1,0.

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

**07/2009:2380**
**corrigé 7.0**

# FENOUIL AMER (PARTIES AÉRIENNES DE), HUILE ESSENTIELLE DES

## Foeniculi amari herbae aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau des parties aériennes de *Foeniculum vulgare* Mill. ssp. *vulgare*, var. *vulgare* récoltées pendant la période de fructification.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, jaune intense ou pâle.

Odeur semblable à celle de l'anis.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,1 mL d'huile essentielle à examiner dans 5 mL de *toluène R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 µL de *fenchone R* et 40 µL d'*anéthole R* dans 5 mL de *toluène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 3 µL] en bandes de 10 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 8 cm [ou 6 cm].

Drogues végétales

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution récemment préparée d'*acide phosphomolybdique R* à 200 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R* et chauffez à 150 °C pendant 15 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Anéthole : une bande bleu foncé ou violet foncé<br>_______ | Une bande bleu foncé ou violet foncé (anéthole)<br>_______ |
| Fenchone : une bande bleue ou gris-bleu<br>_______ | Une bande bleue ou gris-bleu parfois faible (fenchone)<br>_______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* :

– *type Espagne* : les pics caractéristiques dus à l'α-pinène, au β-pinène, au β-myrcène, à l'α-phellandrène, au limonène, à la fenchone, à l'estragole et au *trans*-anéthole dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention à ceux du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),
– *type Tasmanie* : les pics caractéristiques dus à l'α-pinène, à l'α-phellandrène, au limonène, à la fenchone, à l'estragole et au *trans*-anéthole dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention à ceux du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

## ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) :
– *type Espagne* : 0,877 à 0,921,
– *type Tasmanie* : 0,940 à 0,973.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) :
– *type Espagne* : 1,487 à 1,501,
– *type Tasmanie* : 1,512 à 1,538.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) :
– *type Espagne* : + 42° à + 68°,
– *type Tasmanie* : + 11° à + 35°.

**Solubilité dans l'alcool** (*2.8.10*) :
– *type Espagne* : 1 volume d'huile essentielle à examiner est soluble dans 2 volumes, et plus, d'*éthanol à 90 pour cent V/V R*,
– *type Tasmanie* : 1 volume d'huile essentielle à examiner est soluble dans 10 volumes, et plus, d'*éthanol à 85 pour cent V/V R*.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner.* Dissolvez 0,20 mL d'huile essentielle à examiner dans de l'*acétone R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 20 µL d'*α-pinène R*, 10 µL de *β-pinène R*, 20 µL de *β-myrcène R*, 20 µL d'*α-phellandrène R*, 20 µL de *limonène R*, 40 µL de *fenchone R*, 10 µL d'*estragole R*, 40 µL d'*anéthole R*, 10 µL d'*anisaldéhyde R* et 10 µL de *cétone anisique R* dans de l'*acétone R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 5 µL d'*anéthole R* dans 25,0 mL d'*acétone R*. Prélevez 0,5 mL de cette solution et complétez à 20,0 mL avec de l'*acétone R*.

*Colonne* :
– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 60 m, Ø = 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur du film 0,25 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1 mL/min.

*Rapport de division* : 1:50.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 35 | 70 → 210 |
| | 35 - 42 | 210 |
| Chambre à injection | | 250 |
| Détecteur | | 270 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL.

*Ordre d'élution* : ordre indiqué pour la préparation de la solution témoin. Enregistrez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin (a) :
– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au β-myrcène et à l'α-phellandrène.

A l'aide du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les composants pertinents pour le type d'huile essentielle à examiner et localisez le *cis*-anéthole à l'aide des figures 2380.-1 et 2380.-2.

Déterminez la teneur pour cent de chacun de ces composants.

Pour l'huile essentielle à examiner de type Espagne, les teneurs sont comprises entre les valeurs suivantes :
– *α-pinène* : 2,0 à 8,0 pour cent,
– *β-pinène* : 1,0 à 4,0 pour cent,
– *β-myrcène* : 1,0 à 12,0 pour cent,
– *α-phellandrène* : 1,0 à 25,0 pour cent,
– *limonène* : 8,0 à 30,0 pour cent,
– *fenchone* : 7,0 à 16,0 pour cent,
– *estragole* : 2,0 à 7,0 pour cent,
– *cis-anéthole* : au maximum 0,5 pour cent,
– *trans-anéthole* : 15,0 à 40,0 pour cent,
– *anisaldéhyde* : au maximum 1,0 pour cent,
– *cétone anisique* : au maximum 0,05 pour cent,
– *limite d'exclusion* : la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,025 pour cent).

Pour l'huile essentielle à examiner de type Tasmanie, les teneurs sont comprises entre les valeurs suivantes :
– *α-pinène* : 2,0 à 11,0 pour cent,
– *α-phellandrène* : 1,0 à 8,5 pour cent,
– *limonène* : 1,0 à 6,0 pour cent,
– *fenchone* : 10,0 à 25,0 pour cent,
– *estragole* : 1,5 à 6,0 pour cent,
– *cis-anéthole* : au maximum 0,5 pour cent,
– *trans-anéthole* : 45,0 à 78,0 pour cent,
– *anisaldéhyde* : au maximum 1,0 pour cent,
– *cétone anisique* : au maximum 0,05 pour cent,
– *limite d'exclusion* : la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,025 pour cent).

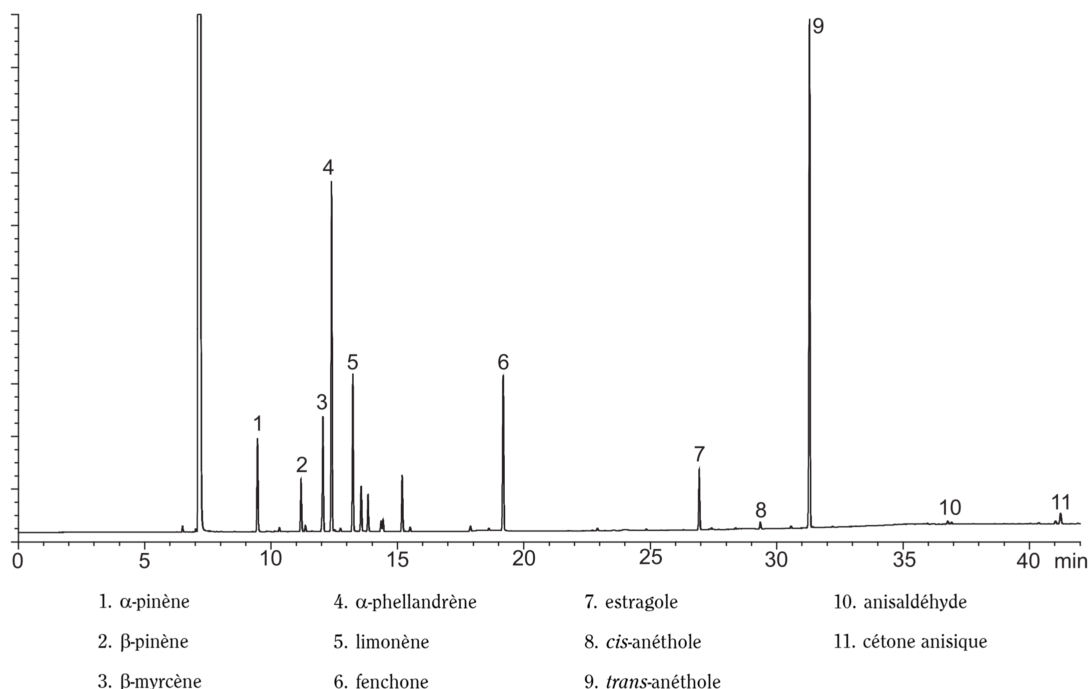



Figure 2380.-1. – *Chromatogramme pour l'essai du profil chromatographique de l'huile essentielle des parties aériennes de fenouil amer de type Espagne*

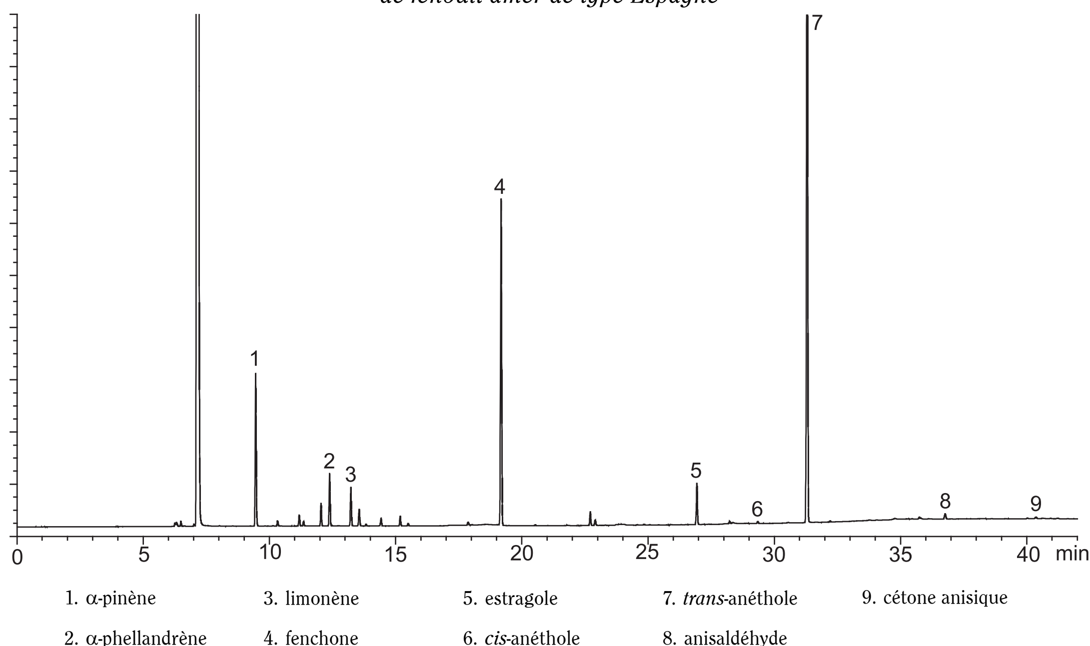



Figure 2380.-2. – *Chromatogramme pour l'essai du profil chromatographique de l'huile essentielle des parties aériennes de fenouil amer de type Tasmanie*

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique s'il s'agit d'huile essentielle de type Espagne ou de type Tasmanie.

**01/2008:0825**

# FENOUIL DOUX (FRUIT DE)

## Foeniculi dulcis fructus

DÉFINITION

Diakènes et méricarpes secs de *Foeniculum vulgare* Miller ssp. *vulgare* var. *dulce* (Miller) Thellung.

*Teneur* :

– *huile essentielle* : au minimum 20 mL/kg (drogue anhydre),
– *anéthole* : au minimum 80,0 pour cent dans l'huile essentielle.

CARACTÈRES

Le fruit de fenouil doux est vert pâle ou brun-jaune pâle.

IDENTIFICATION

A. Le fruit de fenouil doux est un diakène, de forme presque cylindrique, arrondi à la base et rétréci au sommet, couronné par un large stylopode. Il mesure généralement 3-12 mm de long et 3-4 mm de large. Les méricarpes, le plus souvent libres, sont glabres. Ils présentent chacun 5 côtes saillantes, légèrement carénées, et renfermant 4 canaux sécréteurs sur la face dorsale et 2 sur la face ventrale, visibles à la loupe, sur une coupe transversale.

B. Réduisez le fruit de fenouil doux en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-gris ou jaune-gris. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments jaunes de larges canaux sécréteurs, constitués généralement de cellules sécrétrices polygonales à paroi brun-jaune, et souvent surmontés de cellules alignées de façon régulière, à paroi mince, allongées transversalement, d'une largeur de 2-9 µm ; le parenchyme réticulé du mésocarpe ; de nombreux faisceaux de fibres provenant des côtes, souvent accompagnés de vaisseaux spiralés étroits ; de très nombreux fragments d'albumen contenant des grains d'aleurone et de très petites macles d'oxalate de calcium, ainsi que quelques faisceaux de fibres provenant du carpophore.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Agitez 0,3 g de fruit de fenouil doux récemment pulvérisé (1400) (*2.9.12*) avec 5,0 mL de *chlorure de méthylène R* pendant 15 min. Filtrez et évaporez avec précaution le filtrat à siccité au bain-marie à 60 °C. Dissolvez le résidu dans 0,5 mL de *toluène R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 60 µL d'*anéthole R* dans 5,0 mL d'*hexane R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $GF_{254}$ pour CCM R*.

*Phase mobile* : *hexane R, toluène R* (20:80 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes de 20 mm sur 3 mm.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : les chromatogrammes présentent dans leur partie médiane une bande d'atténuation de fluorescence due à l'anéthole.

*Détection B* : pulvérisez de l'*acide sulfurique R* et chauffez à 140 °C pendant 5 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats B* : les chromatogrammes présentent dans leur partie médiane une bande violette due à l'anéthole. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente en outre une bande brun-rouge dans son tiers supérieur (terpènes).

ESSAI

**Estragole et fenchone**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner.* Complétez le mélange d'huile essentielle et de *xylène R* obtenu dans le dosage de l'huile essentielle à 5,0 mL avec du *xylène R*, en rinçant l'appareil.

*Solution témoin.* Dissolvez 5 mg d'*estragole R* et 5 mg de *fenchone R* dans 0,5 mL de *xylène R*.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 30-60 m, Ø = 0,3 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R*.

*Gaz vecteur* : *azote pour chromatographie R*.

*Débit* : 0,40 mL/min.

*Rapport de division* : 1:200.

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 4 | 60 |
| | 4 - 26 | 60 → 170 |
| | 26 - 41 | 170 |
| Chambre à injection | | 220 |
| Détecteur | | 270 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL.

*Limites* :

– *estragole* : au maximum 10,0 pour cent dans l'huile essentielle,
– *fenchone* : au maximum 7,5 pour cent dans l'huile essentielle.

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 1,5 pour cent de pédoncules et au maximum 1,5 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Eau** (*2.2.13*) : au maximum 80 mL/kg, déterminé sur 20,0 g de fenouil doux pulvérisé (710) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum10,0 pour cent.

DOSAGE

**Huile essentielle**. Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez un ballon de 500 mL et 200 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Réduisez le fruit de fenouil doux en poudre grossière (1400) (*2.9.12*). Procédez immédiatement à la détermination sur 10,0 g de poudre. Introduisez 0,50 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 2 h.

**Anéthole**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) selon les indications de l'essai estragole et fenchone avec la modification suivante.

*Solution témoin.* Dissolvez 5 mg d'*anéthole R* dans 0,5 mL de *xylène R*.

CONSERVATION

A l'abri de l'humidité.

**01/2008:1323**
**corrigé 6.0**

# FENUGREC

## Trigonellae foenugraeci semen

DÉFINITION

Graine mûre, séchée, de *Trigonella foenum-graecum* L.

CARACTÈRES

Forte odeur aromatique caractéristique.

IDENTIFICATION

A. La graine est dure, aplatie, brune ou brun rougeâtre, plus ou moins rhomboïdale, à bords arrondis. Elle atteint 3-5 mm de longueur, 2-3 mm de largeur et 1,5-2 mm d'épaisseur. Les faces les plus larges sont marquées par un sillon qui délimite 2 parties inégales. La plus petite correspond à la localisation de la radicule ; la plus volumineuse contient les cotylédons.

B. Réduisez le fenugrec en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de tégument vus en coupe, qui se composent de cellules épidermiques lagéniformes revêtues d'une épaisse cuticule et surmontant un hypoderme constitué de cellules de grande taille, à extrémité supérieure rétrécie et étranglement médian, dont les parois radiales sont épaissies en bâtonnets ; des fragments d'épiderme vus de face, brun-jaune, composés de petites cellules polygonales à paroi épaissie et ponctuée, souvent associées à des cellules hypodermiques à contour circulaire et paroi épaissie en chapelet serré ; des fragments d'hypoderme vus de dessous, à cellules polygonales dont les épaississements en bâtonnets se prolongent jusqu'aux parois inférieure et supérieure ; du parenchyme tégumentaire constitué de cellules rectangulaires allongées à paroi légèrement épaissie en chapelet ; des fragments d'albumen dont les cellules, parfois allongées, présentent des épaississements irréguliers et contiennent du mucilage.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Introduisez 1,0 g de fenugrec pulvérisé (710) (*2.9.12*) dans une fiole conique de 25 mL, ajoutez 5,0 mL de *méthanol R*. Chauffez dans un bain-marie à 65 °C pendant 5 min. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 3,0 mg de *chlorhydrate de trigonelline R* dans 1,0 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R*.

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R* (30:70 *V/V*).

*Dépôt* : 20 µL de solution à examiner et 10 µL de solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente dans la moitié inférieure une bande d'atténuation de fluorescence semblable, quant à sa position et sa fluorescence, à la bande du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

*Détection B* : pulvérisez de la *solution d'iodobismuthate de potassium R2*.

*Résultats B* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande rouge orangé intense semblable quant à sa position et sa coloration à la bande du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Il présente également dans la partie supérieure, une bande large jaune-brun clair (triglycérides).

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de fenugrec pulvérisé.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 5,0 pour cent.

**Indice de gonflement** (*2.8.4*) : au mininum 6, déterminé sur le fenugrec pulvérisé (710) (*2.9.12*).

**01/2008:1600**
**corrigé 6.0**

# FRÊNE (FEUILLE DE)

## Fraxini folium

DÉFINITION

Feuille séchée de *Fraxinus excelsior* L. ou de *Fraxinus oxyphylla* M. Bieb.

*Teneur* : au minimum 2,5 pour cent en dérivés totaux de l'acide hydroxycinnamique, exprimés en acide chlorogénique ($C_{16}H_{18}O_9$ ; $M_r$ 354,3) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La feuille de frêne est composée de folioles qui sont parfois détachées et séparées du rachis. La foliole mesure environ 6 cm de long et 3 cm de large. Chaque foliole est subsessile ou brièvement pétiolée, oblongue, lancéolée, un peu inégale à la base, acuminée au sommet, bordée de dents fines et aiguës, vert foncé à la face supérieure et vert-gris à la face inférieure. La nervure médiane et les nervures secondaires sont blanchâtres et saillantes à la face inférieure.

B. Réduisez la feuille de frêne en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-gris. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de limbe vus en surface, avec un épiderme inférieur à nombreux stomates du type anomocytique (*2.8.3*) et un épiderme supérieur à cellules portant, pour certaines, des stries cuticulaires ; quelques poils tecteurs coniques unisériés composés de 1 ou 2 cellules à paroi épaisse, avec une cuticule striée ; quelques rares glandes peltées à pédicelle unicellulaire et tête glanduleuse en bouclier composée de 8 cellules radiées ; des groupes de fibres et des fragments de tissu vasculaire provenant des nervures.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai *Fraxinus ornus* L.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence bleu clair |
| | Une bande d'intense fluorescence bleue (actéoside) |
| Acide chlorogénique : une bande de fluorescence bleue | Une bande de fluorescence bleue (acide chlorogénique) |
| Rutine : une bande de fluorescence orange | Une bande de fluorescence orange (rutine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Éléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3,0 pour cent de tiges et au maximum 2,0 pour cent d'autres éléments étrangers.

***Fraxinus ornus* L.** Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*)

*Solution à examiner.* A 1 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 20 mL de *méthanol R*. Chauffez en agitant à 40 °C pendant 10 min. Filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 5,0 mg de *rutine R* et 5,0 mg d'*acide chlorogénique R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, acétate d'éthyle R* (10:10:80 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L et de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R*. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : dans le cas d'une substitution par F. *ornus*, le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas les bandes de l'actéoside, de l'acide chlorogénique et de la rutine.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h, sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : maximum 12,0 pour cent.

DOSAGE

*Solution à examiner (a).* A 0,300 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 95 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R*. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Laissez refroidir et filtrez. Rincez le filtre avec 5 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R*. Réunissez le filtrat et la solution de rinçage dans un ballon jaugé et complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 50 pour cent V/V R*.

*Solution à examiner (b).* Dans un tube à essai, introduisez 1,0 mL de solution à examiner (a) ; ajoutez 2 mL d'*acide chlorhydrique 0,5 M*, 2 mL d'une solution préparée en dissolvant 10 g de *nitrite de sodium R* et 10 g de *molybdate de sodium R* dans 100 mL d'*eau R*, puis 2 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* ; complétez à 10,0 mL avec de l'*eau R* et mélangez.

Mesurez immédiatement l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner (b) à 525 nm, en utilisant comme liquide de compensation, une solution préparée comme suit :

Drogues végétales

mélangez 1,0 mL de solution à examiner (a), 2 mL d'*acide chlorhydrique 0,5 M*, 2 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* et complétez à 10,0 mL avec de l'*eau R*.

Calculez la teneur pour cent en dérivés totaux de l'acide hydroxycinnamique, exprimés en acide chlorogénique, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 5,3}{m}$$

en prenant 188 comme valeur de l'absorbance spécifique de l'acide chlorogénique.

$A$ = absorbance à 525 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**07/2010:1869**

# FUMETERRE

## Fumariae herba

DÉFINITION

Parties aériennes entières ou fragmentées, séchées, de *Fumaria officinalis* L. récoltées au moment de la pleine floraison.

*Teneur* : au minimum 0,40 pour cent d'alcaloïdes totaux exprimés en protopine ($C_{20}H_{19}NO_5$ ; $M_r$ 353,4) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La tige est creuse, anguleuse, vert clair ou brun-vert. Elle porte des feuilles alternes et bipennatiséquées à 2 ou 3 segments foliaires et à lobes ultimes lancéolés à obovales ; les feuilles sont bleu-vert et glabres sur les 2 faces. Les fleurs sont petites et disposées en grappes lâches ; chacune possède un court pédicelle et une bractée foliacée ; elles sont de couleur rose ou rouge pourpre, marquées de pourpre foncé ou de brun au sommet ; le calice est court et comporte 2 sépales pétaloïdes ; la corolle tubulaire est formée de 4 pétales, le pétale supérieur muni d'un court éperon ; les 6 étamines sont réunies par leur filet en 2 faisceaux de 3 étamines. Les fruits indéhiscents, brun-vert, sont globuleux ou carénés, avec un apex tronqué ou légèrement émarginé, et contiennent une petite graine brune.

B. Réduisez la fumeterre en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est verte. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments du limbe foliaire vus de face présentant un épiderme supérieur composé de cellules grossièrement polygonales, contenant pour certaines des amas de très petits cristaux sableux, et un épiderme inférieur formé de cellules à paroi plus onduleuse, avec sur les 2 faces des stomates de type anomocytique (*2.8.3*) et à l'apex du limbe des cellules marginales allongées en papilles émoussées ; des groupes de fibres lignifiées et de vaisseaux réticulés et à ponctuations aréolées provenant de la tige ; des fragments de l'épiderme des pétales composés de cellules polygonales à parois anticlinales sinueuses à onduleuses, sans papilles ; des grains de pollen sphériques, d'un diamètre d'environ 30 µm, à exine ponctuée et 6 pores de grande taille ; des cellules polygonales de l'épicarpe à épaisse cuticule verruqueuse.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 2 g de fumeterre pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 15 mL d'*acide sulfurique 0,05 M* et agitez pendant 15 min. Filtrez. Complétez le filtrat à 20 mL avec la solution d'*acide sulfurique 0,05 M*. Ajoutez 1 mL d'*ammoniaque concentrée R* et 10 mL d'*acétate d'éthyle R*. Agitez puis centrifugez. Récupérez la phase organique supérieure. Renouvelez l'extraction dans les mêmes conditions. Réunissez les phases organiques et séchez-les sur du *sulfate de sodium anhydre R*. Evaporez à siccité sous pression réduite. Reprenez le résidu avec 0,5 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *chlorhydrate de protopine R* et 5 mg de *quinine R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, éthanol à 96 pour cent R, acétone R, toluène R* (2:6:40:52 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 30 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans le chromatogramme obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente d'autres bandes de fluorescence bleue.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | 4 bandes de fluorescence bleue |
| _______ | _______ |
| Quinine : une bande de fluorescence bleue | |
| | Une bande de fluorescence bleu-vert |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez un mélange de *solution d'iodobismuthate de potassium R2, acide acétique R* et d'*eau R* (1:2:10 *V/V/V*) jusqu'à apparition de taches orangées sur fond jaune.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente d'autres bandes orangées de moindre intensité.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Protopine : une bande orange | Une bande orange (protopine) |
| | 2 bandes oranges |
| _______ | _______ |
| Quinine : une bande orange | Une bande orange faible |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Cadmium** (*2.4.27*) : au maximum 1,5 ppm.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de fumeterre pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 15,0 pour cent.

DOSAGE

A 5,000 g de fumeterre pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 5 mL d'*ammoniaque diluée R1* et 50 mL d'*acétate d'éthyle R*. Agitez pendant 15 min. Filtrez. Recommencez l'opération et réunissez les 2 filtrats. Evaporez à siccité sous pression réduite. Reprenez le résidu par traitement aux ultrasons pendant 10 min avec 50 mL d'*acide sulfurique 0,05 M*. Filtrez. Complétez le filtrat à 100 mL avec de l'*acide sulfurique 0,05 M*. Ajustez à pH 9-10 avec de l'*ammoniaque concentrée R* puis ajoutez 50 mL d'*acétate d'éthyle R*. Agitez doucement. Récupérez la phase organique supérieure, si nécessaire après centrifugation. Renouvelez l'opération dans les mêmes conditions. Réunissez

les phases organiques et séchez-les sur du *sulfate de sodium anhydre R*. Evaporez à siccité sous pression réduite. Reprenez le résidu avec 100 mL d'*acide acétique anhydre R*. Titrez par l'*acide perchlorique 0,02 M*. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (*2.2.20*).

1 mL d'*acide perchlorique 0,02 M* correspond à 7,068 mg de protopine.

Calculez la teneur pour cent en alcaloïdes totaux exprimés en protopine à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{n \times 706,8}{m}$$

$n$ = volume d'*acide perchlorique 0,02 M* utilisé, en millilitres,

$m$ = masse de la prise d'essai de la drogue à examiner, en milligrammes.

**01/2008:2147**
**corrigé 6.2**

# GATTILIER (FRUIT DE)

## Agni casti fructus

DÉFINITION

Fruit entier, mûr, séché de *Vitex agnus-castus* L.

*Teneur* : au minimum 0,08 pour cent de casticine ($C_{19}H_{18}O_8$ ; $M_r$ 374,3) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Le fruit de gattilier est ovale ou presque globuleux, d'un diamètre pouvant atteindre 5 mm. Le calice persistant, gris-vert, finement pubescent, terminé par 4-5 dents courtes, entoure le fruit sur 2/3 à 3/4 de sa surface. Le fruit, brun-noir, est constitué d'un péricarpe devenant progressivement scléreux jusqu'à l'endocarpe. La cicatrice du style est souvent visible. Certains fruits restent pourvus du pédoncule, long d'environ 1 mm. La section du fruit montre 4 loges contenant chacune une graine allongée.

B. Réduisez le fruit de gattilier en poudre (355) (*2.9.12*). Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de l'épiderme externe du calice composés de cellules polygonales densément couvertes de poils tecteurs courts unisériés, uni-, bi- ou tricellulaires, coudés ou flexueux ; des cellules de l'épicarpe, à paroi épaissie avec de grandes ponctuations nettement marquées ; des poils sécréteurs isolés à pied unicellulaire et tête uni- ou pluricellulaire ; des fragments de la partie externe du mésocarpe constitués d'assises de cellules parenchymateuses dont certaines contiennent un pigment brun et d'autres sont recloisonnées ; des fragments de la partie interne du mésocarpe composés de cellules sclérenchymateuses à paroi mince et ponctuée et de cellules scléreuses isodiamétriques typiques à parois très épaissies, fortement canaliculées, et à lumière étroite et étoilée ; des petites cellules brunes de l'endocarpe ; des fragments du tégument de la graine présentant des plages d'assez grandes cellules à paroi mince et à épaississements lignifiés réticulés ; de nombreux fragments d'albumen composés de cellules parenchymateuses à paroi mince contenant des grains d'aleurone et de nombreuses gouttelettes huileuses.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de fruit de gattilier pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Chauffez dans un bain-marie à 60 °C pendant 10 min. Laissez refroidir et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 0,5 mg d'*aucubine R* et 1 mg d'*agnuside R* dans du *méthanol R* et complétez à 1,0 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (5-40 μm) [ou *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (2-10 μm)].

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R, acétate d'éthyle R* (8:15:77 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 μL [ou 8 μL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 8 cm [ou 5 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de l'*acide formique R* et chauffez à 120 °C pendant 10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| Agnuside : une bande bleue | Une bande bleue (agnuside) |
| ——— | ——— |
| Aucubine : une bande bleue | Une bande bleue (aucubine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3,0 pour cent.

**Autres espèces de *Vitex*, en particulier *Vitex negundo***. Aucun fruit d'autres espèces ayant un diamètre nettement plus grand n'est présent.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 5,0 pour cent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de fruit de gattilier pulvérisé (355) (*2.9.12*).

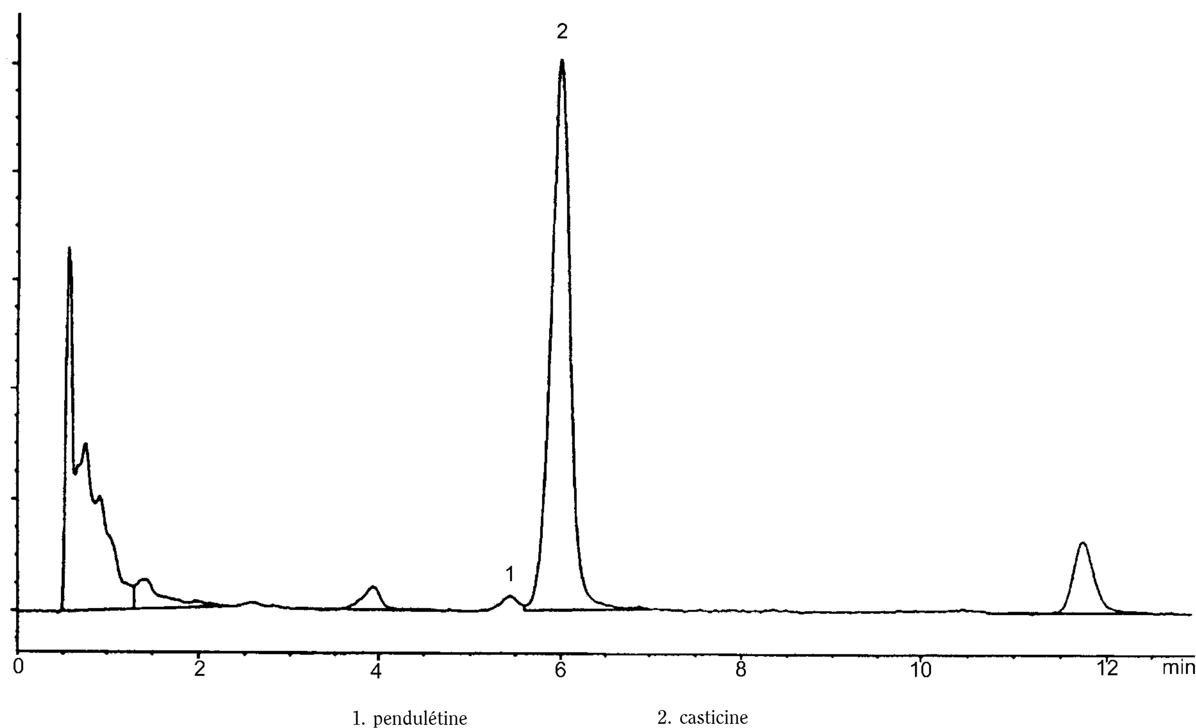
DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Prélevez 1,000 g de fruit de gattilier pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 40 mL de *méthanol R* et extrayez pendant 2 min à l'aide d'un homogénéiseur à vitesse appropriée. Recueillez le surnageant et filtrez dans un ballon de 250 mL. Répétez l'extraction avec 40 mL de *méthanol R,* en recueillant le surnageant et en filtrant comme précédemment. Lavez soigneusement le résidu avec une petite quantité de *méthanol R*. Réunissez les extraits méthanoliques et les solutions de lavage, puis évaporez à siccité sous vide dans un bain-marie à une température d'au maximum 30 °C. A l'aide d'ultrasons, dissolvez le résidu obtenu dans du *méthanol R,* puis complétez à 20,0 mL avec le même solvant. Filtrez la solution sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 μm). Prélevez 1,0 mL de solution et complétez à 10,0 mL avec du *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 100,0 mg d'*extrait sec titré de fruit de gattilier SCR* dans 20,0 mL de *méthanol R* en traitant aux ultrasons pendant 20 min, puis complétez à 25,0 mL avec le même solvant. Filtrez la solution sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 μm).

Drogues végétales




1. pendulétine 2. casticine

Figure 2147.-1. – *Chromatogramme pour le dosage de la casticine dans le fruit de gattilier : solution à examiner*

*Colonne* :
- *dimensions* : $l$ = 0,125 m, Ø = 3,0 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (3 µm),
- *température* : 25 °C.

*Phase mobile* :
- *phase mobile A* : solution d'*acide phosphorique R* à 5,88 g/L,
- *phase mobile B* : *méthanol R,*

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent V/V) | Phase mobile B (pour cent V/V) |
|---|---|---|
| 0 - 13 | 50 → 35 | 50 → 65 |
| 13 - 18 | 35 → 0 | 65 → 100 |
| 18 - 23 | 0 → 50 | 100 → 50 |

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 348 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Conformité du système* : solution à examiner :
- *résolution* : au minimum 1,5 entres les pics dus à la pendulétine et à la casticine (voir figure 2147.-1).

Calculez la teneur pour cent en casticine à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{F_1 \times m_2 \times p_1 \times 8}{F_2 \times m_1}$$

$F_1$ = surface du pic dû à la casticine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_2$ = surface du pic dû à la casticine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la drogue utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse d'*extrait sec titré de fruit de gattilier SCR* utilisé pour préparer la solution témoin, en grammes,

$p_1$ = teneur pour cent en casticine de l'*extrait sec titré de fruit de gattilier SCR*.

**01/2008:1532**

# GENIÈVRE

## Iuniperi pseudo-fructus

DÉFINITION

Cônes mûrs séchés de *Juniperus communis* L.

*Teneur* : au minimum 10 mL/kg d'huile essentielle (drogue anhydre).

CARACTÈRES

Odeur fortement aromatique, notamment lorsque le genièvre est broyé.

IDENTIFICATION

A. Le cône, bacciforme globuleux, d'un diamètre allant jusqu'à 10 mm, est brun-violet ou brun-noir avec souvent une pruine bleuâtre. Il se compose de 3 quartiers charnus. Son apex présente une fente en étoile à 3 branches, fermée, et 3 projections peu distinctes. Sa base porte souvent un reste du pédoncule. Sa partie charnue est friable et brunâtre. Il contient 3, ou plus rarement 2, petites graines allongées, extrêmement dures, présentant 3 arêtes aiguës, une face dorsale légèrement arrondie et une extrémité acuminée. Les graines sont soudées à la base de la partie charnue du cône par leur face externe. Elles portent à leur surface des glandes oléifères ovales de très grande taille contenant une résine visqueuse.

B. Réduisez le genièvre en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de l'épiderme de la paroi du cône contenant des cellules à paroi incolore épaisse, ponctuée, et à contenu brun granuleux, avec quelques stomates de type anomocytique (*2.8.3*) ; des fragments de la fente apicale en étoile à 3 branches du cône à méats et cellules épidermiques imbriquées avec des excroissances papilleuses ; des fragments de collenchyme hypodermique, à cellules épaissies ; des fragments du mésocarpe composés de grandes cellules parenchymateuses à parois minces, le plus souvent arrondies, avec de grands méats intercellulaires et des idioblastes jaunes irréguliers de grande taille, en général modérément

ponctués ; des fragments de cellules oléifères schizogènes, des fragments de tégument à sclérites incolores, à paroi épaisse et ponctuée, contenant un ou plusieurs prismes d'oxalate de calcium ; des fragments d'albumen et de tissu embryonnaire dont les cellules à paroi mince contiennent des granulations lipidiques et des grains d'aleurone.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Complétez à 5,0 mL le mélange huile-xylène obtenu dans le dosage, avec de l'*hexane R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 4,0 mg de *gaïazulène R* et 50 µL de *cinéole R* dans 10 mL d'*hexane R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 20 µL de solution à examiner et 10 µL de solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R*. Chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min et examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente une bande rouge (gaïazulène) dans sa moitié supérieure et une bande violet-brun ou violet-gris (cinéole) dans sa moitié inférieure. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande violette fortement colorée (mono- et sesquiterpènes) semblable quant à sa position à la bande due au gaïazulène dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, une bande violet-rouge un peu au-dessus de la bande due au cinéole dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, une bande violet-gris (terpinén-4-ol) un peu au-dessous de la bande due au cinéole dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin et, juste au-dessous, une bande bleue. Une faible bande violette peut apparaître à la même position que la bande due au cinéole. D'autres bandes sont également présentes.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent de cônes immatures ou décolorés et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Eau** (*2.2.13*) : au maximum 120 mL/kg, déterminé sur 20,0 g de genièvre broyé.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 4,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez 20,0 g de genièvre broyé extemporanément, un ballon à fond rond de 500 mL et 200 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Introduisez 0,5 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 3-4 mL/min pendant 90 min.

**01/2008:1832**
**corrigé 7.0**

# GENIÈVRE (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Iuniperi aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau à partir de cônes mûrs non fermentés de *Juniperus communis* L. Un antioxydant approprié peut être ajouté.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide fluide, incolore ou jaunâtre.

Odeur caractéristique.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Dissolvez 0,2 mL d'huile essentielle de genièvre dans 5 mL d'*heptane R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 20 mg d'*α-terpinéol R* et 20 µL de *terpinén-4-ol R* dans 25 mL d'*heptane R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 20 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 12 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C jusqu'à l'apparition des bandes. Examinez immédiatement à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande intense violet-brun<br>Une bande brune<br>Une bande rose-violet |
| Terpinén-4-ol : une bande violet-brun | Une bande violet-brun (terpinén-4-ol) |
| | Une bande violette |
| α-Terpinéol : une bande violette ou violet-brun | Une bande violette ou violet-brun (α-terpinéol) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,857 à 0,876.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,471 à 1,483.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : – 15° à – 0,5°.

**Indice de peroxyde** (*2.5.5*) : au maximum 20.

**Huiles grasses et huiles essentielles résinifiées** (*2.8.7*). La substance à examiner satisfait à l'essai des huiles grasses et huiles essentielles résinifiées.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner.* Dissolvez 60 mg d'huile essentielle de genièvre dans du *triméthylpentane R* et complétez à 5,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin.* Mélangez 25 µL de chacun des constituants suivants : *α-pinène R, sabinène R, β-pinène R, β-myrcène R, α-phellandrène R, limonène R, terpinén-4-ol R, acétate de bornyle R* et *β-caryophyllène R* ; complétez à 25,0 mL avec du *triméthylpentane R*.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,

– *dimensions* : *l* = 30 m (une épaisseur du film de 1 µm peut être utilisée) à 60 m (une épaisseur du film de 0,2 µm peut être utilisée), Ø = 0,25-0,53 mm,

– *phase stationnaire* : *poly(diméthyl)(diphényl)siloxane R*.

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 2,0 mL/min.

*Rapport de division* : 1:50.

Drogues végétales

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 1 | 60 |
| | 1 - 58 | 60 → 230 |
| Chambre à injection | | 250 |
| Détecteur | | 250 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 0,5 μL.

*Ordre d'élution* : ordre donné pour la préparation de la solution témoin. Notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au sabinène et au β-pinène.

D'après les temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez les composants de la solution témoin sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Déterminez la teneur pour cent de ces composants. Ne tenez pas compte du pic dû au triméthylpentane ni des pics représentant moins de 0,01 pour cent de la surface totale. Ces teneurs sont comprises entre les valeurs suivantes :

– *α-pinène* : 20 pour cent à 50 pour cent,
– *sabinène* : au maximum 20 pour cent,
– *β-pinène* : 1,0 pour cent à 12 pour cent,
– *β-myrcène* : 1,0 pour cent à 35 pour cent,
– *α-phellandrène* : au maximum 1,0 pour cent,
– *limonène* : 2,0 pour cent à 12 pour cent,
– *terpinén-4-ol* : 0,5 pour cent à 10 pour cent,
– *acétate de bornyle* : au maximum 2,0 pour cent,
– *β-caryophyllène* : au maximum 7,0 pour cent.

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

**01/2008:0392**

# GENTIANE (RACINE DE)

## Gentianae radix

DÉFINITION

Organes souterrains fragmentés et séchés de *Gentiana lutea* L.

CARACTÈRES

Odeur caractéristique.

Saveur amère, forte et persistante.

La racine de gentiane se présente sous forme de fragments subcylindriques ou ramifiés d'une longueur variable et, généralement, d'un diamètre de 10-40 mm et pouvant atteindre 80 mm au collet.

IDENTIFICATION

A. La surface de la racine est gris-brun et la couleur d'une section transversale est jaunâtre ou jaune-rouge, mais pas brun-rouge. La racine est ridée longitudinalement et porte parfois des cicatrices de radicelles. Le rhizome porte souvent des bourgeons et toujours des cicatrices de feuilles circulaires très rapprochées. A l'état sec, le rhizome et la racine sont durs et cassants, la cassure est courte ; ils absorbent facilement l'humidité et deviennent alors flexibles. La surface lisse d'une coupe transversale présente une écorce dont l'épaisseur atteint environ le tiers du rayon et qui est séparée du bois parenchymateux, faiblement radié par la zone cambiale distincte.

B. Réduisez la racine de gentiane en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun clair ou brun-jaune. Examinez au microscope en utilisant la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de l'assise subérophellodermique, constitués par des cellules du suber, brun-jaune, à parois minces et par des cellules collenchymateuses de phelloderme, à parois épaissies ; des fragments des parenchymes cortical et ligneux, dont les cellules, à parois modérément épaissies, contiennent des gouttelettes huileuses, des petits prismes et des acicules d'oxalate de calcium ; des fragments de vaisseaux lignifiés, spiralés ou réticulés.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de racine de gentiane pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 25 mL de *méthanol R*, puis agitez pendant 15 min et filtrez. Evaporez à siccité, sous pression réduite et à une température ne dépassant pas 50 °C. Reprenez le résidu dans du *méthanol R*, ajouté par petites quantités, de façon à obtenir 5 mL de solution ; celle-ci peut présenter un sédiment.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg d'*hypéroside R* et 5 mg de *phénazone R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R*.

*Phase mobile* : *eau R, acide formique anhydre R, formiate d'éthyle R* (4:8:88 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 μL en bandes.

*Développement* : dans une cuve non saturée, sur un parcours de 8 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| | Une bande d'atténuation de fluorescence marquée |
| Phénazone : une bande d'atténuation de fluorescence | |
| | Une faible bande d'atténuation de fluorescence (amarogentine) |
| _______ | _______ |
| _______ | _______ |
| Hypéroside : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence marquée (gentiopicroside) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 100 g/L dans le *méthanol R*, puis une solution récemment préparée de *sel de bleu solide B R* à 2 g/L dans un mélange de 50 volumes d'*éthanol anhydre R* et de 50 volumes d'*eau R* ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande violet foncé marquée |
| | Une bande rouge-violet (amarogentine) |
| _______ | _______ |
| _______ | _______ |
| Hypéroside : une bande rouge-brun | Une faible bande brun clair (gentiopicroside) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Autres espèces de *Gentiana*.** Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'identification C, détection B.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bandes violettes immédiatement au-dessus de la bande due à l'amarogentine.

**Indice d'amertume** (*2.8.15*) : au minimum 10 000.

**Matières extractibles par l'eau** : au minimum 33 pour cent.

A 5,0 g de racine de gentiane pulvérisée (710) (*2.9.12*), ajoutez 200 mL d'*eau R* bouillante. Laissez reposer pendant 10 min en agitant de temps à autre. Laissez refroidir et complétez à 200,0 mL avec de l'*eau R*. Filtrez, évaporez à siccité 20,0 mL du filtrat au bain-marie et desséchez le résidu à l'étuve à 100-105 °C. La masse du résidu est au minimum de 0,165 g.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 6,0 pour cent.

**01/2008:1870**

# GENTIANE (TEINTURE DE)

## Gentianae tinctura

DÉFINITION

Teinture produite à partir de *Racine de gentiane (0392)*.

PRODUCTION

La teinture de gentiane est produite à partir de 1 partie de drogue fragmentée et de 5 parties d'éthanol à 70 pour cent *V/V* par un procédé approprié.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide brun-jaune ou brun-rouge.

La teinture de gentiane présente un goût amer prononcé.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* La teinture à examiner.

*Solution témoin.* Dissolvez 5 mg de *phénazone R* et 5 mg d'*hypéroside R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice* $F_{254}$ *pour CCM R*.

*Phase mobile* : *eau R, acide formique anhydre R, formiate d'éthyle R* (4:8:88 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 8 cm, dans une cuve non saturée.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande d'atténuation de fluorescence marquée |
| Phénazone : une bande d'atténuation de fluorescence | |
| | Une faible bande d'atténuation de fluorescence (amarogentine) |
| _______ | _______ |
| _______ | _______ |
| Hypéroside : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence marquée (gentiopicroside) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 10 pour cent *V/V* dans le *méthanol R*, puis une solution récemment préparée de *sel de bleu solide B R* à 2 g/L dans un mélange d'*éthanol R* et d'*eau R* (50:50 *V/V*) ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande violet foncé marquée |
| | Une bande rouge-violet (amarogentine) |
| _______ | _______ |
| _______ | _______ |
| Hypéroside : une bande rouge-brun | Une faible bande brun clair (gentiopicroside) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Ethanol** (*2.9.10*) : 62 pour cent *V/V* à 67 pour cent *V/V*.

**Indice d'amertume** (*2.8.15*) : au minimum 1000.

**Résidu sec** (*2.8.16*) : au minimum 5,0 pour cent *m/m*, déterminé sur 3,00 g de teinture de gentiane.

**01/2011:1522**

# GINGEMBRE

## Zingiberis rhizoma

DÉFINITION

Rhizome séché, entier ou coupé, de *Zingiber officinale* Roscoe, débarrassé du liège soit complètement, soit seulement sur les faces plates et larges.

*Teneur* : au minimum 15 mL/kg d'huile essentielle (drogue anhydre).

CARACTÈRES

Odeur aromatique caractéristique.

Saveur épicée et brûlante.

IDENTIFICATION

A. Le rhizome, comprimé latéralement, porte sur sa face supérieure de courtes ramifications obovales aplaties, obliques, dont l'apex présente parfois une cicatrice en creux. Le rhizome entier mesure environ 5-10 cm de longueur, 1,5-3 cm ou 4 cm de largeur et 1-1,5 cm d'épaisseur ; il est parfois fendu longitudinalement. La surface externe du rhizome mondé est brun clair et présente des stries longitudinales et quelques fibres partiellement arrachées. Celle du rhizome non mondé, brun pâle ou brun foncé, est plus ou moins largement revêtue de liège parcouru de rides

longitudinales et transversales, étroites et bien visibles ; le liège a tendance à s'exfolier sur les faces latérales mais reste en place entre les ramifications. La cassure, courte et amylacée, est hérissée de fibres. La surface lisse d'une coupe transversale fait apparaître une étroite zone corticale séparée de la stèle, beaucoup plus large, par un endoderme ; elle présente de nombreux faisceaux fibrovasculaires dispersés, et d'abondantes cellules à contenu oléorésineux jaune, elles aussi dispersées ; le rhizome non mondé possède en outre une assise externe subéreuse brun foncé.

B. Réduisez le gingembre en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune pâle ou brunâtre. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants (figure 1522.-1) : des groupes de grandes fibres à parois minces, cloisonnées, avec une paroi souvent dentée [C, D, G] ; des fragments [K] comprenant des vaisseaux réticulés [Ka] souvent accompagnés d'étroites cellules à paroi mince contenant un pigment brun [Kb] et de parenchyme amylifère [Kc] ; de nombreux vaisseaux réticulés d'assez grande dimension, isolés [H, L] ; un abondant parenchyme du tissu fondamental, à cellules à paroi mince [J, M] dont certaines contiennent une oléorésine brune [Ja] ; des fragments de suber brun, généralement vus de face [F] mais parfois en section transversale [E]. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente de nombreux grains d'amidon simples, aplatis, de forme oblongue ou ovale, ou irrégulière, pouvant atteindre environ 50 µm de longueur et 25 µm de largeur, à petit hile punctiforme situé à l'extrémité la plus étroite ; les grains présentent parfois des stries transversales faiblement marquées et peuvent être libres [A], agglomérés [B] ou inclus dans des cellules parenchymateuses (Kc).

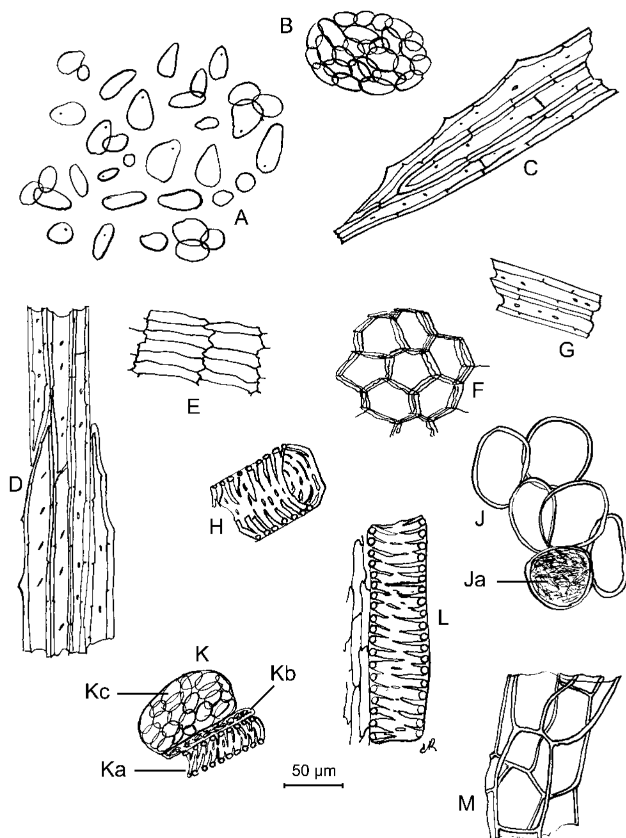



Figure 1522.-1.– *Dessin pour l'identification B du gingembre pulvérisé*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de gingembre pulvérisé (710) (*2.9.12*), ajoutez 5 mL de *méthanol R*. Agitez pendant 15 min et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 µL de *citral R* et 10 mg de *résorcinol R* dans 10 mL de *méthanol R*. Préparez la solution immédiatement avant emploi.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *hexane R*, *éther R* (40:60 *V/V*).

*Dépôt* : 20 µL, en bandes.

*Développement* : dans une cuve non saturée, sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution de *vanilline R* à 10 g/L dans l'*acide sulfurique R*. Examinez à la lumière du jour en chauffant à 100-105 °C pendant 10 min.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente une bande rouge intense (résorcinol) dans sa moitié inférieure et 2 bandes violettes (citral) dans sa moitié supérieure. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente 2 bandes violettes intenses (gingérols) au-dessous de la bande due au résorcinol du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, et 2 autres bandes violettes moins intenses (shogaols) dans sa partie médiane, entre les bandes dues au résorcinol et au citral du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. D'autres bandes peuvent être présentes.

ESSAI

**Eau** (*2.2.13*) : au maximum 100 mL/kg, déterminé par entraînement sur 20,0 g de gingembre pulvérisé (710) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 6,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez 20,0 g de gingembre fraîchement réduit en poudre grossière, un ballon à fond rond de 1000 mL, 10 gouttes de *paraffine liquide R* ou d'un autre antimousse, 500 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement et 0,5 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 4 h.

**04/2008:1827**

# GINKGO (EXTRAIT SEC RAFFINÉ ET QUANTIFIÉ DE)

## Ginkgonis extractum siccum raffinatum et quantificatum

DÉFINITION

Extrait sec raffiné et quantifié produit à partir de *Ginkgo (feuille de) (1828)*.

*Teneurs* :

– *flavonoïdes, exprimés en hétérosides flavoniques* ($M_r$ 756,7) : 22,0 pour cent à 27,0 pour cent (extrait desséché),
– *bilobalide* : 2,6 pour cent à 3,2 pour cent (extrait desséché),
– *ginkgolides A, B et C* : 2,8 pour cent à 3,4 pour cent (extrait desséché),
– *acides ginkgoliques* : au maximum 5 ppm (extrait desséché).

PRODUCTION

L'extrait est préparé à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec des solvants organiques, ou des mélanges de solvants organiques et d'eau, des étapes de séparation physique et d'autres procédures appropriées.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre ou masse friable, brun-jaune vif.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 20,0 mg d'extrait à examiner dans 10 mL d'un mélange de 2 volumes d'*eau R* et de 8 volumes de *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 1,0 mg d'*acide chlorogénique R* et 3,0 mg de *rutine R* dans 20 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, acide acétique glacial R, eau R, acétate d'éthyle R* (7,5:7,5:17,5:67,5 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL [ou 5 µL], en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 17 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez sur la plaque encore chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R*. Pulvérisez ensuite une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R*. Laissez sécher à l'air pendant environ 30 min. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de plus faible fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence bleue |
| | Plusieurs bandes faiblement colorées |
| _______ | _______ |
| | Une bande de fluorescence brune |
| | Une bande de fluorescence verte |
| | Une bande d'intense fluorescence bleu clair parfois chevauchée d'une bande de fluorescence brun-vert. |
| Acide chlorogénique : une bande de fluorescence bleu clair | |
| | Une ou deux bandes de fluorescence verte |
| Rutine : une bande de fluorescence brun-jaune | Une ou deux bandes de fluorescence brun-jaune. |
| _______ | _______ |
| | Plusieurs bandes de fluorescence vert et brun-jaune |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

DOSAGE

**Flavonoïdes**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,200 g d'extrait à examiner dans 20 mL de *méthanol R*. Ajoutez 15,0 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et 5 mL d'*eau R* puis complétez à 50,0 mL avec du *méthanol R*. Introduisez 10,0 mL de cette solution dans une fiole de 10 mL en verre brun. Fermez la fiole à l'aide d'un bouchon étanche muni d'une membrane de caoutchouc et fixez avec une capsule d'aluminium sertie. Chauffez au bain-marie pendant 25 min. Laissez refroidir à 20 °C.

*Solution témoin*. Dissolvez 10,0 mg de *quercétine dihydratée SCR* dans 20 mL de *méthanol R*. Ajoutez 15,0 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et 5 mL d'*eau R* puis complétez à 50,0 mL avec du *méthanol R*.

*Colonne* :

- *dimensions* : *l* = 0,125 m, Ø = 4 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
- *température* : 25 °C.

*Phase mobile* :

- *phase mobile A* : solution d'*acide phosphorique R* à 0,3 g/L ajustée à pH 2,0,
- *phase mobile B* : *méthanol R*,

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 1 | 60 | 40 |
| 1 - 20 | 60 → 45 | 40 → 55 |
| 20 - 21 | 45 → 0 | 55 → 100 |
| 21 - 25 | 0 | 100 |

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 370 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Rétention relative* par rapport à la quercétine (temps de rétention = environ 12,5 min) : kaempférol = environ 1,4 ; isorhamnétine = environ 1,5.

*Conformité du système* : solution à examiner :

- *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au kaempférol et à l'isorhamnétine.

Déterminez la somme des surfaces de tous les pics compris entre le pic dû à la quercétine et le pic dû à l'isorhamnétine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (voir figure 1827.-1).

Calculez la teneur pour cent en flavonoïdes, exprimée en hétérosides flavonoïques, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{F_1 \times m_1 \times 2,514 \times p}{F_2 \times m_2}$$

$F_1$ = somme de la surface de tous les pics compris entre le pic dû à la quercétine et le pic dû à l'isorhamnétine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_2$ = surface du pic dû à la quercétine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de *quercétine dihydratée SCR* dans la solution témoin, en grammes,

$m_2$ = masse d'extrait à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$p$ = teneur pour cent de quercétine anhydre dans la *quercétine dihydratée SCR*.

**Lactones terpéniques**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

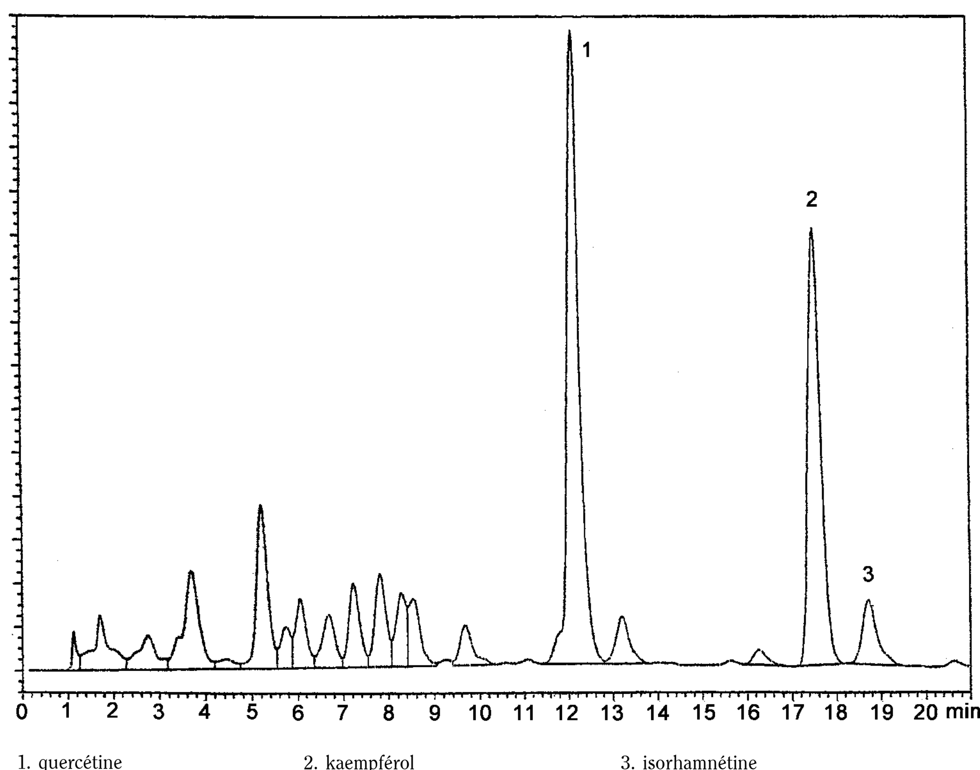
*Solution à examiner*. Dans un vase à précipiter de 25 mL, dissolvez 0,120 g d'extrait à examiner dans 10 mL de *solution tampon phosphate pH 5,8 R* en agitant. Introduisez cette solution dans une colonne à chromatographie d'une longueur d'environ 0,15 m et d'un diamètre interne d'environ 30 mm remplie de 15 g de *kieselguhr pour chromatographie R*. Lavez le vase à précipiter avec 2 fois 5 mL de *solution tampon phosphate pH 5,8 R*. Introduisez l'eau de lavage dans la colonne à chromatographie. Laissez reposer pendant 15 min. Procédez à l'élution avec 100 mL d'*acétate d'éthyle R*. Evaporez l'éluat dans un bain-marie à 50 °C sous une pression ne dépassant pas 4 kPa. Le résidu de solvant est éliminé par un courant d'air. Reprenez le résidu par 2,5 mL de la phase mobile.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 30,0 mg d'*alcool benzylique SCR* dans la phase mobile et complétez à 100,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin (b)*. Dans un vase à précipiter de 25 mL, dissolvez 0,120 g d'*extrait sec de ginkgo pour identification des pics SCR* dans 10 mL de *solution tampon phosphate pH 5,8 R* en agitant puis procédez comme décrit pour la solution à examiner.

*Colonne* :

- *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4 mm,




1. quercétine 2. kaempférol 3. isorhamnétine

Figure 1827.-1. – *Chromatogramme pour le dosage des flavonoïdes de l'extrait sec raffiné et quantifié de ginkgo*

– *phase stationnaire* : *gel de silice octylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
– *température* : 25 °C.

*Phase mobile* : *tétrahydrofurane R, méthanol R, eau R* (10:20:75 *V/V/V*).

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : réfractomètre maintenu à 35 °C.

*Injection* : 100 µL.

*Identification des pics* : utilisez le chromatogramme fourni avec l'*extrait sec de ginkgo pour identification des pics SCR* et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) pour identifier les pics dus au bilobalide et aux ginkgolides A, B et C.

*Conformité du système* :

– le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) est semblable au chromatogramme fourni avec l'*extrait sec de ginkgo pour identification des pics SCR*.

Calculez la teneur pour cent en bilobalide, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{F_1 \times m_1 \times p \times 0,025 \times 1,20}{F_5 \times m_2}$$

Calculez la teneur pour cent en ginkgolide A, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{F_2 \times m_1 \times p \times 0,025 \times 1,22}{F_5 \times m_2}$$

Calculez la teneur pour cent en ginkgolide B, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{F_3 \times m_1 \times p \times 0,025 \times 1,19}{F_5 \times m_2}$$

Calculez la teneur pour cent en ginkgolide C, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{F_4 \times m_1 \times p \times 0,025 \times 1,27}{F_5 \times m_2}$$

$F_1$ = surface du pic dû au bilobalide dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_2$ = surface du pic dû au ginkgolide A dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_3$ = surface du pic dû au ginkgolide B dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_4$ = surface du pic dû au ginkgolide C dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_5$ = surface du pic dû à l'alcool benzylique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse d'*alcool benzylique SCR* dans la solution témoin (a), en grammes,

$m_2$ = masse de l'extrait à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en alcool benzylique dans l'*alcool benzylique SCR*.

Calculez la teneur pour cent de la somme des ginkgolides A, B et C à l'aide de l'expression suivante :

$$G_A + G_B + G_C$$

$G_A$ = teneur pour cent en ginkgolide A,

$G_B$ = teneur pour cent en ginkgolide B,

$G_C$ = teneur pour cent en ginkgolide C.

**Acides ginkgoliques**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,500 g d'extrait à examiner pulvérisé dans 8 mL de *méthanol R*, traitez aux ultrasons si nécessaire, puis complétez à 10,0 mL avec le même solvant. Centrifugez si nécessaire.

*Solution témoin*. Dissolvez 10,0 mg d'*acides ginkgoliques SCR* dans 8 mL de *méthanol R*, traitez aux ultrasons si nécessaire, puis complétez à 10,0 mL avec le même solvant. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec du *méthanol R*.

Drogues végétales

*Colonne* :
- *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice octylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
- *température* : 35 °C.

*Phase mobile* :
- *phase mobile A* : prélevez 0,1 mL d'*acide trifluoracétique R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R,*
- *phase mobile B* : prélevez 0,1 mL d'*acide trifluoracétique R* et complétez à 1000 mL avec de l'*acétonitrile R,*

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 30 | 25 → 10 | 75 → 90 |
| 30 - 35 | 10 | 90 |
| 35 - 36 | 10 → 25 | 90 → 75 |
| 36 - 45 | 25 | 75 |

*Débit* : 1,0 mL/min.
*Détection* : spectrophotomètre à 210 nm.
*Injection* : 50 µL.
*Identification des composants* : utilisez le chromatogramme fourni avec les *acides ginkgoliques SCR* et le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner pour identifier les pics dus aux acides ginkgoliques C13, C15 et C17.
*Conformité du système* : solution témoin :
- *résolution* : au minimum 2,0 entre les pics dus aux acides ginkgoliques C13 et C15,
- *facteur de symétrie* : 0,8 à 2,0 pour les pics dus aux acides ginkgoliques C13, C15 et C17.

Calculez la teneur en parties par million d'acides ginkgoliques exprimés en acide ginkgolique C17, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 2000}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = somme de la surface des pics dus aux acides ginkgoliques C13, C15 et C17 dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,
$A_2$ = surface du pic dû à l'acide ginkgolique C17 dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,
$m_1$ = masse d'extrait à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,
$m_2$ = masse d'*acides ginkgoliques SCR* utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,
$p$ = teneur pour cent en acide ginkgolique C17 des *acides ginkgoliques SCR*.

**01/2011:1828**

# GINKGO (FEUILLE DE)

## Ginkgonis folium

DÉFINITION

Feuille séchée, entière ou fragmentée, de *Ginkgo biloba* L.
*Teneur* : au minimum 0,5 pour cent de flavonoïdes, exprimés en hétérosides flavonoïques ($M_r$ 757) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La feuille de ginkgo est grisâtre, vert-jaune ou brun-jaune. La face supérieure est légèrement plus foncée que la face inférieure. Les pétioles ont une longueur d'environ 4-9 cm. Le limbe, en forme d'éventail, habituellement bilobé ou parfois non divisé, a une largeur d'environ 4-10 cm. Il est lisse sur les 2 faces et présente des nervures dichotomes, semblant rayonner à partir de la base ; elles sont pareillement proéminentes sur les 2 faces. Le bord distal de la feuille est incisé, de façon irrégulière et à des degrés divers, et irrégulièrement lobé ou émarginé. Les bords latéraux sont entiers et forment une pointe vers la base.

B. Réduisez la feuille de ginkgo en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est grisâtre, vert-jaune ou brun-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants (figure 1828.-1) : des fragments du limbe [A, B, D, E], de forme irrégulière, à épiderme supérieur, vu de face (D), et en section transversale (E), constitué de cellules allongées aux parois irrégulièrement sinueuses [Da], souvent accompagné de parenchyme palissadique [Db] et à épiderme inférieur, vu de face (A) ou en section transversale (B), constitué de cellules plus petites, à cuticule finement striée, chaque cellule formant une papille courte [Aa], et de stomates [Ab] d'environ 60 µm, larges, profondément creusés, entourés de 6-8 cellules annexes ; des fragments de tissu vasculaire issu du pétiole et des nervures [C] composé de xylème [Ca] et de parenchyme dont certaines cellules contiennent des macles d'oxalate de calcium, fréquentes et de tailles diverses [Cb].

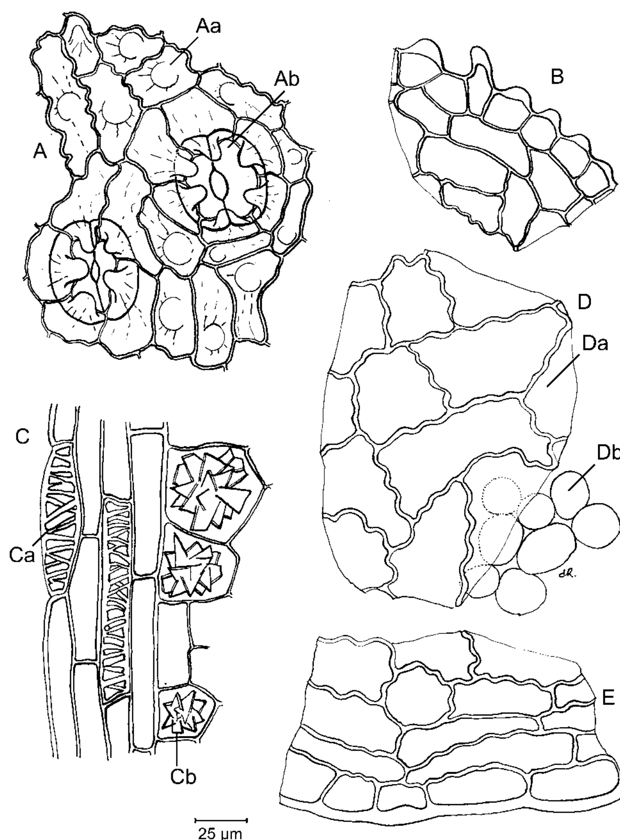



Figure 1828.-1.– *Dessin pour l'identification B de la feuille de ginkgo pulvérisée*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).
*Solution à examiner*. A 2,0 g de drogue pulvérisée (710) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R* et chauffez dans un bain marie à 65 °C pendant 10 min. Agitez fréquemment. Laissez refroidir à température ambiante et filtrez.
*Solution témoin*. Dissolvez 1,0 mg d'*acide chlorogénique R* et 3,0 mg de *rutine R* dans 20 mL de *méthanol R*.
*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.
*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, acide acétique glacial R, eau R, acétate d'éthyle R* (7,5:7,5:17,5:67,5 *V/V/V/V*).
*Dépôt* : 20 µL en bandes.
*Développement* : sur un parcours de 17 cm.

Drogues végétales

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez sur la plaque encore chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R*. Pulvérisez ensuite le même volume d'une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R*. Laissez sécher à l'air pendant environ 30 min. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence brun-jaune. |
| | Une bande de fluorescence verte. |
| | 2 bandes de fluorescence brun-jaune. |
| | Une bande d'intense fluorescence bleu clair quelquefois chevauchée d'une bande de fluorescence brun-vert. |
| Acide chlorogénique : une bande de fluorescence bleu clair. | |
| | Une bande de fluorescence verte. |
| Rutine : une bande de fluorescence brun-jaune. | 2 bandes de fluorescence brun-jaune. |
| | Une bande de fluorescence verte. |
| | Une bande de fluorescence brun-jaune. |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent de tiges et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 11,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 11,0 pour cent.

DOSAGE

**Flavonoïdes**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Chauffez à reflux 2,500 g de drogue pulvérisée (710) (*2.9.12*) dans 50 mL d'une solution d'*acétone R* à 60 pour cent *V/V*, pendant 30 min. Filtrez et recueillez le filtrat. Extrayez une 2e fois et de la même façon le résidu, en utilisant 40 mL d'une solution d'*acétone R* à 60 pour cent *V/V* et filtrez. Réunissez les filtrats et complétez à 100,0 mL avec de l'*acétone R* à 60 pour cent *V/V*. Evaporez 50,0 mL de la solution afin d'éliminer l'acétone et transférez dans une fiole de 50,0 mL, en rinçant avec 30 mL de *méthanol R*. Ajoutez 4,4 mL d'*acide chlorhydrique R1*, complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R* et centrifugez. Placez 10 mL du surnageant dans une fiole de 10 mL en verre brun. Fermez la fiole à l'aide d'un joint en caoutchouc et d'une capsule d'aluminium et chauffez au bain-marie pendant 25 min. Laissez refroidir à température ambiante.

*Solution témoin*. Dissolvez 10,0 mg de *quercétine dihydratée R* dans 20 mL de *méthanol R*. Ajoutez 15,0 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et 5 mL d'*eau R* et complétez à 50,0 mL avec du *méthanol R*.

*Colonne* :

- *dimensions* : *l* = 0,125 m, Ø = 4 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
- *température* : 25 °C.

*Phase mobile* :

- *phase mobile A* : solution d'*acide phosphorique R* à 0,3 g/L ajustée à pH 2,0,
- *phase mobile B* : *méthanol R*,

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 1 | 60 | 40 |
| 1 - 20 | 60 → 45 | 40 → 55 |
| 20 - 21 | 45 → 0 | 55 → 100 |
| 21 - 25 | 0 | 100 |

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 370 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Rétention relative* par rapport à la quercétine (temps de rétention = environ 12,5 min) : kaempférol = environ 1,4 ; isorhamnétine = environ 1,5.

*Conformité du système* :

- *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au kaempférol et à l'isorhamnétine.

Ne tenez pas compte des pics éluant avant le pic de la quercétine et après le pic dû à l'isorhamnétine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Calculez la teneur pour cent en flavonoïdes, exprimés en hétérosides flavonoïques, à l'aide de l'expression suivante :

$$2 \times \frac{F_1 \times m_1 \times 2,514 \times p}{F_2 \times m_2}$$

$F_1$ = somme de la surface de tous les pics considérés dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_2$ = surface du pic correspondant à la quercétine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de quercétine utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,

$m_2$ = masse de feuille de ginkgo utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en quercétine anhydre dans la *quercétine dihydratée R*.

**01/2008:1523**
**corrigé 6.0**

# GINSENG

## Ginseng radix

DÉFINITION

Racine séchée entière ou coupée, désignée sous le nom de ginseng blanc ou soumise à la vapeur d'eau et séchée, désignée sous le nom de ginseng rouge de *Panax ginseng* C. A. Meyer.

*Teneur* : au minimum 0,40 pour cent de la somme des ginsénosides Rg1 ($C_{42}H_{72}O_{14},2H_2O$ ; $M_r$ 837) et Rb1 ($C_{54}H_{92}O_{23},3H_2O$ ; $M_r$ 1163) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La racine principale est fusiforme ou cylindrique, parfois ramifiée, d'une longueur pouvant atteindre 20 cm et d'un diamètre allant jusqu'à 2,5 cm. Elle peut être arquée ou recourbée de façon prononcée. La surface est de couleur jaune pâle ou crème et présente des stries longitudinales pour le ginseng blanc et est de couleur brun rouge pour le ginseng rouge ; les cicatrices de la tige peuvent être apparentes sur la couronne. La cassure est courte. La surface d'une section transversale présente une large zone externe avec des canaux à résine rouge-orange dispersés et une

partie interne finement radiée. Les radicelles, abondantes à la partie inférieure du ginseng blanc, sont fines et d'un diamètre réduit ; elles sont absentes dans le ginseng rouge.

B. Réduisez le ginseng en poudre (355) (*2.9.12*). Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre, jaune pâle, présente les éléments suivants : des fragments abondants de cellules parenchymateuses à parois fines et des fragments de larges canaux sécréteurs contenant une résine brun-jaune. Occasionnellement, elle peut présenter des trachéides non lignifiées et des vaisseaux partiellement lignifiés, spiralés ou réticulés, isolés ou en petits groupes, et des macles d'oxalate de calcium dispersées. Examinez au microscope en utilisant un mélange à volumes égaux de *glycérol R* et d'*eau R*. Les grains d'amidon, simples ou composés de 2 ou 3 éléments, sont très abondants et d'un diamètre de 1-10 µm ; ils sont déformés et souvent détruits par la vapeur d'eau dans le ginseng rouge ou sont absents.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Chauffez à ébullition, à reflux, 1,0 g de ginseng pulvérisé (355) (*2.9.12*) avec 10 mL d'une solution de *méthanol R* à 70 pour cent *V/V* pendant 15 min. Filtrez après refroidissement et complétez à 10,0 mL avec du *méthanol R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 5,0 mg d'*arbutine R* et 5,0 mg d'*aescine R* dans 1 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, eau R, butanol R* (25:50:100 *V/V/V*), laissez reposer le mélange pendant 10 min puis utilisez la phase supérieure.

*Dépôt* : 20 µL [ou 4 µL] en bandes.

*Développement* : sur 10 cm [ou 5 cm] dans une cuve non saturée.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 105-110 °C pendant 5-10 min puis examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Arbutine : une bande brune | |
| _______ | _______ |
| | Une bande violette (ginsénosides Rg1 + Rg2) |
| | Une bande violet pâle (ginsénoside Rf) |
| | Une bande violette (ginsénoside Re) |
| | Une bande violette (ginsénoside Rd) |
| | Une bande violet pâle |
| _______ | _______ |
| | Une bande violette (ginsénoside Rc) |
| Aescine : une bande grise | Une bande violette (ginsénosides Rb1 + Rb2) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

***Panax quinquefolium***. Examinez les chromatogrammes obtenus dans le dosage. Dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, le pic dû au ginsénoside Rf est présent (voir figure 1523.-1.). Dans l'éventualité d'une substitution par *Panax quinquefolium*, aucun pic dû au ginsénoside Rf n'est présent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de ginseng pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 7,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 1,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Réduisez environ 50 g de ginseng en poudre (355) (*2.9.12*). Placez 1,00 g de ginseng pulvérisé dans un ballon à fond rond de 250 mL, puis ajoutez 70 mL d'une solution de *méthanol R* à 50 pour cent *V/V* et quelques grains de pierre ponce. Chauffez à ébullition à reflux pendant 1 h. Laissez refroidir, centrifugez et recueilliez le surnageant. Traitez le résidu comme précédemment. Mélangez les liquides recueillis et évaporez à siccité sous pression réduite à une température ne dépassant pas 60 °C. Reprenez le résidu avec 20,0 mL d'un mélange de 20 volumes d'*acétonitrile R* et 80 volumes d'*eau R*. Prélevez 2,0 mL de la solution et complétez à 10,0 mL avec un

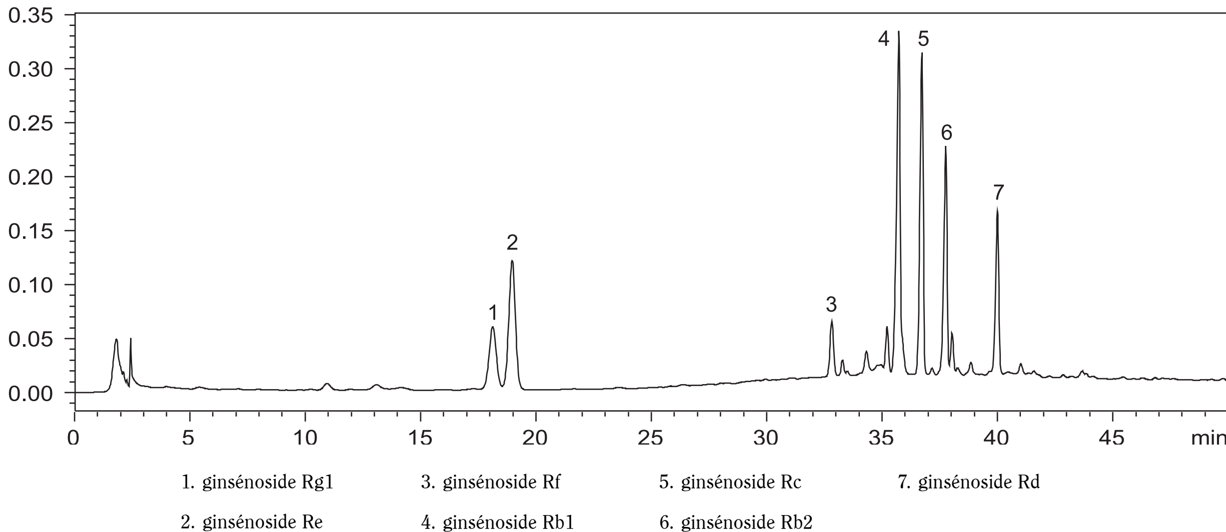



Figure 1523.-1. – *Chromatogramme pour le dosage du ginseng : solution à examiner*

mélange de 20 volumes d'*acétonitrile R* et 80 volumes d'*eau R*. Filtrez sur une membrane filtrante appropriée (diamètre nominal des pores 0,45 µm) avant l'injection.

*Solution témoin.* Dissolvez 3,0 mg de *ginsénoside Rg1 R,* 3,0 mg de *ginsénoside Re R,* 3,0 mg de *ginsénoside Rf R* et 3,0 mg de *ginsénoside Rb1 R* dans du *méthanol R* puis complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,125 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
– *température* : 35 °C.

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *eau R* ajustée à pH 2 avec de l'*acide phosphorique R,*
– *phase mobile B* : *acétonitrile R,*

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 8 | 80 | 20 |
| 8 - 40 | 80 → 60 | 20 → 40 |
| 40 - 45 | 60 → 40 | 40 → 60 |
| 45 - 47 | 40 → 0 | 60 → 100 |
| 47 - 52 | 0 | 100 |
| 52 - 55 | 0 → 80 | 100 → 20 |

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 203 nm.

*Equilibrage* : 20 min.

*Injection* : 20 µL.

*Ordre d'élution* : ordre indiqué pour la préparation de la solution témoin ; notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,0 entre les pics dus au ginsénoside Rg1 et au ginsénoside Re.

Localisez les pics dus au ginsénoside Rb1 et au ginsénoside Rg1 dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Calculez la teneur pour cent en ginsénosides Rb1 et Rg1 à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p_1}{A_3 \times m_1 \times 100} + \frac{A_2 \times m_3 \times p_2}{A_4 \times m_1 \times 100}$$

$A_1$ = surface du pic dû au ginsénoside Rb1 dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû au ginsénoside Rg1 dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_3$ = surface du pic dû au ginsénoside Rb1 dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$A_4$ = surface du pic dû au ginsénoside Rg1 dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai, en grammes,

$m_2$ = masse de ginsénoside Rb1 dans la solution témoin, en milligrammes,

$m_3$ = masse de ginsénoside Rg1 dans la solution témoin, en milligrammes,

$p_1$ = teneur pour cent en ginsénoside Rb1 dans le réactif,

$p_2$ = teneur pour cent en ginsénoside Rg1 dans le réactif.

**01/2009:0532**

# GOMME ADRAGANTE

## Tragacantha

[9000-65-1]

DÉFINITION

Exsudation gommeuse, durcie à l'air, s'écoulant naturellement ou par incision du tronc et des branches d'*Astragalus gummifer* Labill. et de certaines autres espèces du genre *Astragalus* d'Asie occidentale.

IDENTIFICATION

A. La gomme adragante se présente sous forme de rubans minces, aplatis, plus ou moins incurvés, blancs ou jaune pâle, translucides, cornés, à cassure courte ; ces lamelles ont une longueur de 30 mm, une largeur d'environ 10 mm et peuvent atteindre une épaisseur de 1 mm. La surface comporte de fines stries longitudinales et des ondulations transversales, concentriques. La gomme adragante peut aussi contenir des fragments de forme analogue, mais un peu plus épais, plus opaques et plus difficiles à briser.

B. Réduisez la gomme adragante en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est blanche ou sensiblement blanche et elle forme un gel mucilagineux avec environ 10 fois sa masse d'*eau R.* Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V.* La poudre présente dans la masse gommeuse de nombreuses membranes cellulaires stratifiées qui se colorent lentement en violet par addition de *solution de chlorure de zinc iodée R* et qui enveloppent des grains d'amidon de forme arrondie, parfois déformés, isolés ou en petits amas. Le diamètre de ces grains est de 4-10 µm, mais exceptionnellement, il peut atteindre 20 µm. Ces grains présentent un hile central, visible en lumière polarisée entre nicols croisés.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de la gomme arabique.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente 3 bandes dues au galactose, à l'arabinose et au xylose. Une faible bande jaunâtre près du front de solvant et une bande vert-gris entre celles dues au galactose et à l'arabinose peuvent être présentes.

D. Humectez 0,5 g de gomme adragante pulvérisée (355) (*2.9.12*) avec 1 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et ajoutez, peu à peu et en agitant, 50 mL d'*eau R* jusqu'à obtention d'un mucilage homogène. A 5 mL du mucilage, ajoutez 5 mL d'*eau R* et 2 mL de *solution d'hydroxyde de baryum R.* Il se forme un léger précipité floconneux. Chauffez le mélange au bain-marie pendant 10 min. Il se développe une coloration jaune intense.

ESSAI

**Gomme arabique**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Dans un tube à centrifugation à paroi épaisse, introduisez 100 mg de gomme adragante pulvérisée (355) (*2.9.12*). Ajoutez 2 mL d'une solution d'*acide trifluoracétique R* à 100 g/L. Agitez énergétiquement pour dissoudre le gel formé, bouchez le tube et chauffez le mélange à 120 °C pendant 1 h. Centrifugez l'hydrolysat obtenu, transvasez avec précaution le surnageant limpide dans un flacon de 50 mL, ajoutez 10 mL d'*eau R* et évaporez à siccité sous pression réduite. Au film limpide obtenu, ajoutez 0,1 mL d'*eau R,* puis 0,9 mL de *méthanol R.* Centrifugez pour séparer le précipité amorphe. Recueillez le surnageant et, si nécessaire, complétez à 1 mL avec du *méthanol R.*

*Solution témoin.* Dissolvez 10 mg d'*arabinose R,* 10 mg de *galactose R,* 10 mg de *rhamnose R* et 10 mg de *xylose R* dans 1 mL d'*eau R,* puis complétez à 10 mL avec du *méthanol R.*

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : solution de *phosphate monosodique R* à 16 g/L, *butanol R*, *acétone R* (10:40:50 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement A* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage A* : dans un courant d'air chaud pendant quelques minutes.

*Développement B* : sur un parcours de 15 cm avec la même phase mobile.

*Séchage B* : à 110 °C pendant 10 min.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 110 °C pendant 10 min.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente 4 bandes colorées, nettement séparées, dues au galactose (vert-gris ou vert), à l'arabinose (vert-jaune), au xylose (gris-vert ou gris-jaune) et au rhamnose (vert-jaune) par ordre de $R_F$ croissant. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande vert-jaune correspondant à la bande du rhamnose dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

**Méthylcellulose**. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de la gomme arabique.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande rouge près du front de solvant.

**Gomme de sterculia**

A. Dans une éprouvette de 10 mL à bouchon rodé, graduée en 0,1 mL, agitez un mélange de 0,2 g de gomme adragante pulvérisée (355) (*2.9.12*) et de 10 mL d'*éthanol à 60 pour cent V/V R*. Le volume du gel qui peut se former est au maximum de 1,5 mL.
B. Agitez 1,0 g de gomme adragante pulvérisée (355) (*2.9.12*) avec 100 mL d'*eau R*. Au mucilage, ajoutez 0,1 mL de *solution de rouge de méthyle R*. Le virage de l'indicateur ne nécessite pas plus de 5,0 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*.

**Substances étrangères** : au maximum 1,0 pour cent.

Dans un ballon à fond rond de 250 mL, introduisez 2,0 g de gomme adragante pulvérisée (355) (*2.9.12*) et 95 mL de *méthanol R*. Mouillez la poudre en l'agitant par rotation. Ajoutez 60 mL d'*acide chlorhydrique R1* et quelques billes de verre d'un diamètre d'environ 4 mm. Chauffez au bain-marie à reflux pendant 3 h, en agitant de temps en temps. Eliminez les billes de verre et filtrez sous vide la suspension chaude sur un filtre de verre fritté (160) (*2.1.2*). Lavez la fiole avec une petite quantité d'*eau R* et versez les eaux de lavage sur le filtre. Lavez le résidu sur le filtre avec environ 40 mL de *méthanol R* et desséchez à 110 °C jusqu'à masse constante (environ 1 h). Laissez refroidir dans un dessiccateur et pesez. La masse du résidu est au maximum de 20 mg.

**Temps d'écoulement** : au minimum 10 s ou au minimum 50 s si la gomme adragante est destinée à la préparation d'émulsions.

Dans un ballon à fond rond à bouchon rodé de 1000 mL, introduisez 1,0 g de gomme adragante pulvérisée (125-250) (*2.9.12*), ajoutez 8,0 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et bouchez le ballon. Dispersez en agitant la suspension de gomme adragante sur la surface interne du ballon en évitant de mouiller le bouchon. Ouvrez le ballon, ajoutez en 1 fois 72,0 mL d'*eau R*. Bouchez le ballon et agitez vigoureusement pendant 3 min. Laissez reposer pendant 24 h et agitez de nouveau vigoureusement pendant 3 min. Eliminez les bulles d'air du mucilage en faisant le vide pendant 5 min. Transvasez le mucilage dans une éprouvette de 50 mL. Plongez dans le mucilage un tube de verre d'une longueur de 200 mm et d'un diamètre intérieur de 6,0 mm, portant des graduations respectivement à 20 mm et à 120 mm de l'extrémité inférieure du tube. Celui-ci ne doit pas être rincé avec des substances tensioactives. Lorsque le mucilage atteint la graduation supérieure, obturez le tube avec le doigt. Sortez le tube fermé de l'éprouvette et retirez le doigt. Au moyen d'un chronomètre, mesurez le temps que met le ménisque pour atteindre la graduation inférieure. Répétez 4 fois l'opération et calculez la moyenne des 3 dernières mesures.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 4,0 pour cent.

**Contamination microbienne**

DGAT : critère d'acceptation $10^4$ UFC/g (*2.6.12*).

DMLT : critère d'acceptation $10^2$ UFC/g (*2.6.12*).

Absence d'*Escherichia coli* (*2.6.13*).

Absence de salmonelles (*2.6.13*).

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique si la gomme adragante convient ou non à la préparation d'émulsions.

**01/2009:0307**

# GOMME ARABIQUE

## Acaciae gummi

DÉFINITION

Exsudation gommeuse, durcie à l'air, s'écoulant naturellement ou par incision du tronc et des branches d'*Acacia senegal* L. Willdenow, d'autres espèces d'*Acacia* d'origine africaine et d'*Acacia seyal Del.*

CARACTÈRES

La gomme arabique est presque complètement, mais très lentement, soluble dans 2 fois sa masse d'eau (après environ 2 h) et ne laisse qu'un résidu minime de particules végétales. Le liquide obtenu est incolore ou jaunâtre, dense, visqueux, adhésif, translucide, faiblement acide au papier tournesol bleu. La gomme arabique est pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

IDENTIFICATION

A. La gomme arabique est constituée par des masses (larmes) sphéroïdales, ovales ou réniformes, d'un diamètre d'environ 1-3 cm, blanc-jaune, jaunes ou faiblement ambrées, teintées quelquefois de rose, friables, opaques, à surface fréquemment crevassée, se brisant facilement en fragments à cassure conchoïdale, anguleux, irréguliers, blanchâtres ou légèrement jaunâtres, d'éclat vitreux et transparent. Les larmes entières présentent parfois en leur centre une petite cavité.
B. Réduisez la gomme arabique en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est blanche ou blanc-jaune. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente les éléments suivantes : des fragments anguleux, irréguliers, incolores et transparents. Seules des traces d'amidon ou de tissus végétaux sont visibles. La poudre ne contient pas de membrane stratifiée.
C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de glucose et fructose.

   *Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente 3 bandes dues au galactose, à l'arabinose et au rhamnose. Il n'apparaît pas d'autres bandes importantes, en particulier dans la partie supérieure du chromatogramme.
D. Dissolvez 1 g de gomme arabique pulvérisée (355) (*2.9.12*) dans 2 mL d'*eau R* en agitant fréquemment pendant 2 h. Ajoutez 2 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Par agitation, il se forme un gel blanc et consistant. Ajoutez ensuite 10 mL d'*eau R*. Le mélange redevient fluide.

ESSAI

**Solution S**. Dissolvez 3,0 g de gomme arabique pulvérisée (355) (*2.9.12*) dans 25 mL d'*eau R* en agitant pendant 30 min. Laissez reposer pendant 30 min et complétez à 30 mL avec de l'*eau R*.

**Matières insolubles** : au maximum 0,5 pour cent.

A 5,0 g de gomme arabique pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 100 mL d'*eau R* et 14 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*. Chauffez à douce ébullition pendant 15 min en agitant fréquemment ; filtrez à chaud sur un filtre de verre fritté (*2.1.2*) taré ; lavez à l'*eau R* chaude et desséchez à 100-105 °C. La masse du résidu est au maximum de 25 mg.

**Glucose et fructose**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dans un tube à centrifugation à paroi épaisse, introduisez 0,100 g de gomme arabique pulvérisée (355) (*2.9.12*). Ajoutez 2 mL d'une solution d'*acide trifluoracétique R* à 100 g/L. Agitez énergiquement pour dissoudre le gel en formation, bouchez le tube et chauffez le mélange à 120 °C pendant 1 h. Centrifugez l'hydrolysat obtenu, transvasez avec précaution le surnageant limpide dans un ballon de 50 mL, ajoutez 10 mL d'*eau R* et évaporez à siccité sous pression réduite. Au film limpide obtenu ajoutez 0,1 mL d'*eau R,* puis 0,9 mL de *méthanol R*. Centrifugez pour séparer le précipité amorphe. Recueillez le surnageant et, si nécessaire, complétez à 1 mL avec du *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg d'*arabinose R,* 10 mg de *galactose R,* 10 mg de *glucose R,* 10 mg de *rhamnose R* et 10 mg de *xylose R* dans 1 mL d'*eau R,* puis complétez à 10 mL avec du *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : solution de *phosphate monosodique R* à 16 g/L, *butanol R, acétone R* (10:40:50 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement A* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage A* : dans un courant d'air chaud pendant quelques minutes.

*Développement B* : sur un parcours de 15 cm avec la même phase mobile.

*Séchage B* : à 110 °C pendant 10 min.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 110 °C pendant 10 min.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente 5 bandes colorées, nettement séparées, dues au galactose (vert-gris ou vert), au glucose (gris), à l'arabinose (vert-jaune), au xylose (gris-vert ou gris-jaune) et au rhamnose (vert-jaune), par ordre de $R_F$ croissant. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande grise ni de bande vert-gris entre les bandes correspondant au galactose et à l'arabinose dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

**Amidon, dextrine et agar-agar**. Faites bouillir 10 mL de solution S et refroidissez. Ajoutez 0,1 mL d'*iode 0,05 M*. Il ne se développe pas de coloration bleue ou brun-rouge.

**Gomme de sterculia**

A. Dans une éprouvette à bouchon rodé de 10 mL, graduée tous les 0,1 mL, introduisez 0,2 g de gomme arabique pulvérisée (355) (*2.9.12*) et 10 mL d'*éthanol à 60 pour cent V/V R* et agitez. Le volume du gel qui peut se former est au maximum de 1,5 mL.
B. A 1,0 g de gomme arabique pulvérisée (355) (*2.9.12*) ajoutez 100 mL d'*eau R* et agitez. Au mucilage, ajoutez 0,1 mL de *solution de rouge de méthyle R*. Le virage de l'indicateur ne nécessite pas plus de 5,0 mL d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*.

**Tanins**. A 10 mL de solution S, ajoutez 0,1 mL de *solution de chlorure ferrique R1*. Il se forme un précipité gélatineux, mais ni le précipité, ni le liquide ne sont bleu foncé.

**Gomme adragante**. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de glucose et fructose.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande gris-vert ou gris-jaune correspondant à la bande du xylose dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 15,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de gomme arabique pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 4,0 pour cent.

**Contamination microbienne**

DGAT : critère d'acceptation $10^4$ UFC/g (*2.6.12*).

DMLT : critère d'acceptation $10^2$ UFC/g (*2.6.12*).

Absence d'*Escherichia coli* (*2.6.13*).

Absence de salmonelles (*2.6.13*).

CARACTÉRISTIQUES LIÉES À LA FONCTIONNALITÉ

*Cette section fournit des informations sur les caractéristiques qui sont reconnues comme étant des paramètres de contrôle pertinents de la (ou des) fonction(s) de la substance, lorsqu'elle est utilisée comme excipient (voir chapitre 5.15). Cette section représente une partie non obligatoire de la monographie et il n'est pas nécessaire de vérifier ces caractéristiques pour démontrer que la substance satisfait à la monographie. Le contrôle de ces caractéristiques peut néanmoins contribuer à la qualité du médicament en améliorant la constance du procédé de fabrication et la performance du médicament au cours de son utilisation. Lorsque des méthodes de contrôle sont citées, elles sont reconnues appropriées mais d'autres méthodes peuvent également être utilisées. Lorsque des résultats sont présentés pour une caractéristique donnée, la méthode de contrôle doit être mentionnée.*

*La caractéristique suivante peut être pertinente pour la gomme arabique utilisée comme agent viscosifiant et/ou agent de suspension dans les préparations aqueuses.*

**Viscosité apparente**. Déterminez la viscosité dynamique en utilisant un viscosimètre capillaire (*2.2.29*) ou un viscosimètre rotatif (*2.2.10*) sur une solution de gomme arabique à 100 g/L (substance desséchée).

**01/2010:1218**

# GUAR

## Cyamopsidis seminis pulvis

DÉFINITION

Le guar est obtenu par broyage de l'albumen des graines de *Cyamopsis tetragonolobus* (L.) Taub. Il est constitué principalement par un galactomannane dit guarane.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre blanche ou sensiblement blanche.

*Solubilité* : le guar donne un mucilage de viscosité variable lorsqu'il est dissout dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

IDENTIFICATION

A. Examiné au microscope dans du *glycérol R,* le guar (125) (*2.9.12*) présente des cellules piriformes ou ovoïdes, le plus souvent isolées, aux parois très épaisses entourant un lumen central plus ou moins allongé, à contenu granuleux ; des cellules polyédriques, isolées ou en amas, de dimensions plus petites et aux parois plus minces que celles des précédentes.
B. Dans une fiole conique, introduisez 2 g de guar, ajoutez rapidement 45 mL d'*eau R* et agitez vigoureusement pendant 30 s. Après 5-10 min, il se forme un gel consistant qui ne coule pas lorsque la fiole est renversée.
C. Mélangez une suspension de 0,1 g de guar dans 10 mL d'*eau R* avec 1 mL d'une solution de *tétraborate de disodium R* à 10 g/L ; après quelques instants, le mélange se gélifie.

D. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Dans un tube à centrifugation à paroi épaisse, introduisez 10 mg de guar. Ajoutez 2 mL d'une solution d'*acide trifluoracétique R* à 100 g/L. Agitez énergiquement pour dissoudre le gel en formation, bouchez le tube et chauffez le mélange à 120 °C pendant 1 h. Centrifugez l'hydrolysat obtenu, transvasez avec précaution le surnageant limpide dans un ballon de 50 mL, ajoutez 10 mL d'*eau R* et évaporez à siccité sous pression réduite. Au film limpide obtenu, ajoutez 0,1 mL d'*eau R*, puis 0,9 mL de *méthanol R*. Centrifugez pour séparer le précipité amorphe. Recueillez le surnageant et, si nécessaire, complétez à 1 mL avec du *méthanol R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 10 mg de *galactose R* et 10 mg de *mannose R* dans 2 mL d'*eau R*, puis complétez à 20 mL avec du *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *eau R, acétonitrile R* (15:85 *V/V*).

*Dépôt* : 5 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Détection* : pulvérisez du *réactif à l'acide aminohippurique R* et chauffez à 120 °C pendant 5 min.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente, dans sa partie inférieure, 2 bandes brunâtres nettement séparées dues au galactose et au mannose par ordre de $R_F$ croissant. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente 2 bandes dues au galactose et au mannose.

ESSAI

**Gomme adragante, gomme de sterculia, gélose, alginates, carraghénates**. A une petite quantité de guar, ajoutez 0,2 mL de *solution de rouge de ruthénium R* récemment préparée. Examinées au microscope, les parois cellulaires n'apparaissent pas colorées en rouge.

**Protéines** : au maximum 8,0 pour cent.

Effectuez la détermination sur 0,170 g de guar, par dosage de l'azote après minéralisation par l'acide sulfurique (*2.5.9*). Multipliez le résultat obtenu par 6,25.

**Viscosité apparente** (*2.2.10*) : 85 pour cent à 115 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

Humectez une quantité de guar correspondant à 1,00 g de substance desséchée avec 2,5 mL de *2-propanol R*. Tout en agitant, complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Après 1 h, déterminez la viscosité à 20 °C à l'aide d'un viscosimètre rotatif à une vitesse de cisaillement de 100 $s^{-1}$.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 15,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 5 h sur 1,000 g de guar.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 1,8 pour cent.

**Contamination microbienne**

DGAT : critère d'acceptation $10^4$ UFC/g (*2.6.12*).

DMLT : critère d'acceptation $10^2$ UFC/g (*2.6.12*).

Absence d'*Escherichia coli* (*2.6.13*).

Absence de salmonelles (*2.6.13*).

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique la viscosité apparente, en millipascals-secondes, pour une solution de guar à 10 g/L.

CARACTÉRISTIQUES LIÉES À LA FONCTIONNALITÉ

*Cette section fournit des informations sur les caractéristiques qui sont reconnues comme étant des paramètres de contrôle pertinents de la (ou des) fonction(s) de la substance, lorsqu'elle est utilisée comme excipient (voir chapitre 5.15). Cette section représente une partie non obligatoire de la monographie et il n'est pas nécessaire de vérifier ces caractéristiques pour démontrer que la substance satisfait à la monographie. Le contrôle de ces caractéristiques peut néanmoins contribuer à la qualité du médicament en améliorant la constance du procédé de fabrication et la performance du médicament au cours de son utilisation. Lorsque des méthodes de contrôle sont citées, elles sont reconnues appropriées mais d'autres méthodes peuvent également être utilisées. Lorsque des résultats sont présentés pour une caractéristique donnée, la méthode de contrôle doit être mentionnée.*

*La caractéristique suivante peut être pertinente pour le guar utilisé comme viscosifiant ou liant.*

**Viscosité apparente** : voir Essai.

**07/2010:1856**

# GUIMAUVE (FEUILLE DE)

## Althaeae folium

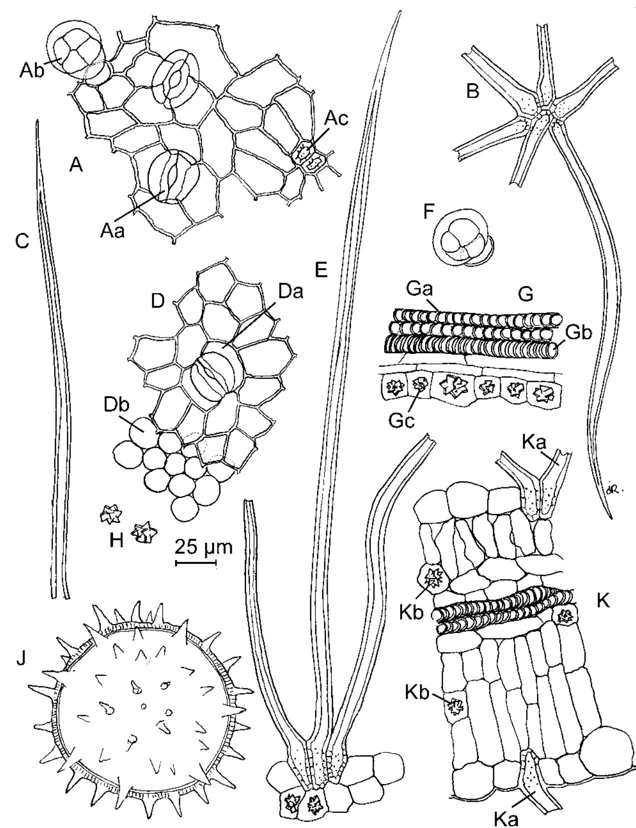
DÉFINITION

Feuille séchée, entière ou coupée, d'*Althaea officinalis* L.

IDENTIFICATION

A. Les feuilles ont de longs pétioles et mesurent environ 7-10 cm de long ; le limbe est cordiforme ou ovale avec 3-5 lobes peu profonds et des bords crénelés ou dentés ; la nervation est palmée. Les pétioles et les 2 surfaces du limbe sont vert-gris et intensément pubescents. Occasionnellement, des fragments d'inflorescences ou de fruits immatures peuvent être présents.

B. Réduisez la feuille de guimauve en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-gris. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : de nombreux poils tecteurs unicellulaires, longs, rigides, à parois épaisses, pointus à l'apex, anguleux et ponctués à la base, où ils sont parfois encore unis pour former une structure étoilée avec jusqu'à 8 composants ; peu de poils sécréteurs à pied unicellulaire et à tête globuleuse, pluricellulaire ; des fragments de l'épiderme des feuilles, avec stomates anomocytiques ou paracytiques (*2.8.3*) ; des macles d'oxalate de calcium, isolées ou incluses dans le parenchyme du mésophylle ; des fragments de nervures avec de petits vaisseaux en spirales ou en anneaux ; des grains de pollen sphériques, à exine grossièrement échinulée, d'environ 150 µm de diamètre. Examinez au microscope en utilisant de la *solution de rouge de ruthénium R*. La poudre présente des amas de tissu parenchymateux contenant du mucilage teinté de rouge-orange.




A. Epiderme inférieur avec stomates anomocytiques (Aa), poil secréteur (Ab) et bases de poils tecteurs (Ac)
B. Poils tecteurs formant une structure étoilée
C. Extrémité de poil tecteur
D. Epiderme supérieur de la feuille avec stomate paracytique (Da) accompagné de parenchyme palissadique (Db)
E. Poils tecteurs vus en section transversale
F. Poil secréteur
G. Vaisseaux annelés (Ga) ou spiralés (Gb) et cellules contenant des macles d'oxalate de calcium (Gc)
H. Macles d'oxalate de calcium
J. Grain de pollen
K. Section transversale de la feuille avec bases de poil tecteur (Ka) et macles d'oxalate de calcium (Kb)

Figure 1856.-1. – *Dessin pour l'identification de la feuille de guimauve (voir Identification B)*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 1 g de feuille de guimauve pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 5 min. Laissez refroidir, puis filtrez. Distillez le filtrat sous pression réduite jusqu'à obtention d'un volume d'environ 2 mL.

*Solution témoin.* Dissolvez 2,5 mg d'*acide chlorogénique R* et 2,5 mg de *quercitroside R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, acide acétique glacial R, eau R, acétate d'éthyle R* (11:11:27:100 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R*, puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R*. Laissez sécher à l'air pendant 30 min et examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence bleue |
| | Une bande de fluorescence jaune |
| Quercitroside : une bande orange | |
| _______ | _______ |
| | Une bande de fluorescence orange |
| | Une bande de fluorescence orange |
| _______ | _______ |
| Acide chlorogénique : une bande de fluorescence bleue | |
| | Une bande de fluorescence bleue |
| | Une bande de fluorescence orange |
| | Une bande de fluorescence jaune intense |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 4 pour cent de feuilles parasitées par *Puccinia malvacearum* présentant des ponctuations rouges et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de feuille de guimauve pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 18,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 2,0 pour cent.

**Indice de gonflement** (*2.8.4*) : au minimum 12, déterminé sur 0,2 g de feuille de guimauve pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**07/2010:1126**

# GUIMAUVE (RACINE DE)

## Althaeae radix

DÉFINITION

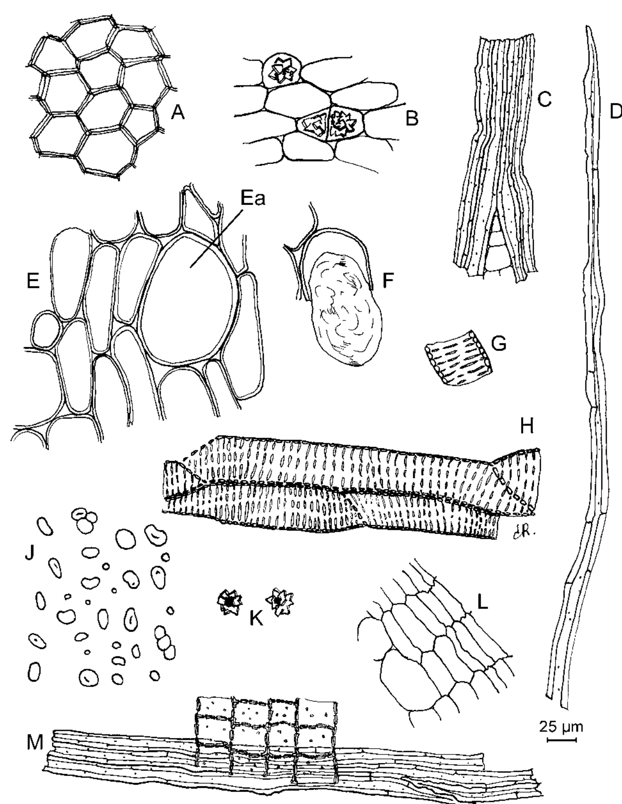
Racine séchée, mondée ou non, entière ou fragmentée, d'*Althaea officinalis* L.

IDENTIFICATION

A. La drogue non mondée, non fragmentée, se compose de racines cylindriques, légèrement tordues, d'une épaisseur allant jusqu'à 2 cm, à profonds sillons longitudinaux. La surface externe brun-gris porte de nombreuses cicatrices de radicelles. La cassure est fibreuse dans la partie externe, rugueuse et grenue dans la partie interne. La racine présente une écorce blanchâtre plus ou moins épaisse à périderme brunâtre, séparée du bois blanc par le cambium brunâtre bien distinct. La structure concentrique de l'écorce et la structure radiale du bois apparaissent plus nettement après humidification.

La drogue mondée présente une surface externe finement fibreuse, blanc-gris. Le suber et le parenchyme cortical externe sont absents.

B. Réduisez la racine de guimauve en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-gris (racine non mondée) ou blanchâtre (racine mondée). Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de fibres incolores à paroi épaisse, pour la plupart non lignifiées, à extrémités bifurquées ou en pointe ; des fragments de vaisseaux à paroi réticulée, scalariforme ou aréolée ; des macles d'oxalate de calcium mesurant environ 20-35 µm, et pour la plupart 25-30 µm ; des cellules parenchymateuses mucilagineuses ; des fragments de suber à cellules aplaties à paroi mince dans le cas de la racine non mondée. Examinez au microscope en utilisant de la *solution de rouge de ruthénium R*. La poudre présente des amas de tissu parenchymateux contenant du mucilage teinté de rouge-orange. Examinez au microscope en utilisant de l'*eau R*. La poudre présente de nombreux grains d'amidon mesurant environ 3-25 µm et présentant parfois un hile longitudinal. La plupart des grains d'amidon sont simples, quelques-uns sont composés et comportent 2-4 éléments.




A. Suber, vu de face
B. Parenchyme dont certaines cellules contiennent des macles d'oxalate de calcium
C. Partie d'un groupe de fibres
D. Extrémité de fibre
E. Parenchyme avec cellule mucilagineuse (Ea)
F. Cellule à mucilage montrant le contenu mucilagineux
G. Fragment de vaisseau
H. Vaisseaux
J. Grains d'amidon
K. Macles d'oxalate de calcium
L. Fragment de suber, vu en section transversale
M. Fibres et parenchyme ligneux

Figure 1126.-1. – *Dessin pour l'identification de la racine de guimauve (voir Identification B)*

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 2 pour cent de drogue présentant une altération brune.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de racine de guimauve pulvérisée (710) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 6,0 pour cent pour la racine mondée et au maximum 8,0 pour cent pour la racine non mondée.

**Indice de gonflement** (*2.8.4*) : au minimum 10, déterminé sur la racine de guimauve pulvérisée (710) (*2.9.12*).

**01/2011:0909**

# HAMAMÉLIS (FEUILLE D')

## Hamamelidis folium

DÉFINITION

Feuille séchée, entière ou fragmentée, d'*Hamamelis virginiana* L.

*Teneur* : au minimum 3 pour cent de tanins, exprimés en pyrogallol ($C_6H_6O_3$ ; $M_r$ 126,1) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Les feuilles vertes ou brun-vert sont souvent brisées, froissées et comprimées en masses plus ou moins compactes. Le limbe est approximativement ovale ou obovale, sa base est oblique et asymétrique, et le sommet acuminé ou, rarement, obtus. Les bords du limbe sont grossièrement crénelés ou dentés. La nervation est pennée et saillante à la face abaxiale. Généralement, 4-6 paires de nervures secondaires se détachent de la nervure médiane, formant des angles aigus avec celle-ci, et se prolongent, faiblement incurvées, jusqu'aux dents plus ou moins pointues du limbe où se trouvent des nervilles, souvent perpendiculaires aux nervures secondaires.

B. Réduisez la feuille d'hamamélis en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-brun. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants (figure 0909.-1) : des fragments d'épiderme adaxial à cellules à parois anticlinales ondulées, vus de face [C, J], souvent associés à des cellules du parenchyme palissadique, petites et cylindriques, vues de face [Ja], ou allongées, en section transversale [F] ; des fragments d'épiderme abaxial porteur de stomates principalement de type paracytique (*2.8.3*), vus de face [B], associé ou non à du parenchyme lacuneux composé de cellules de forme irrégulière [K, L] ; des poils tecteurs étoilés, entiers ou brisés [A, D, M], constitués de 4-12 branches unicellulaires réunies à la base, de forme allongée, conique et courbée, et généralement d'une longueur allant jusqu'à 250 µm, à parois épaisses et ayant un lumen bien visible, dont le contenu est souvent brun ; des fibres lignifiées à parois épaisses, isolées ou groupées, accompagnées d'une gaine contenant des prismes d'oxalate de calcium [N, P] ; des sclérites souvent élargis à une extrémité ou aux 2, d'une longueur de 150-180 µm, entiers ou brisés [H] ; des fragments de vaisseaux annelés ou spiralés [E] ; des prismes isolés d'oxalate de calcium [G].

Drogues végétales

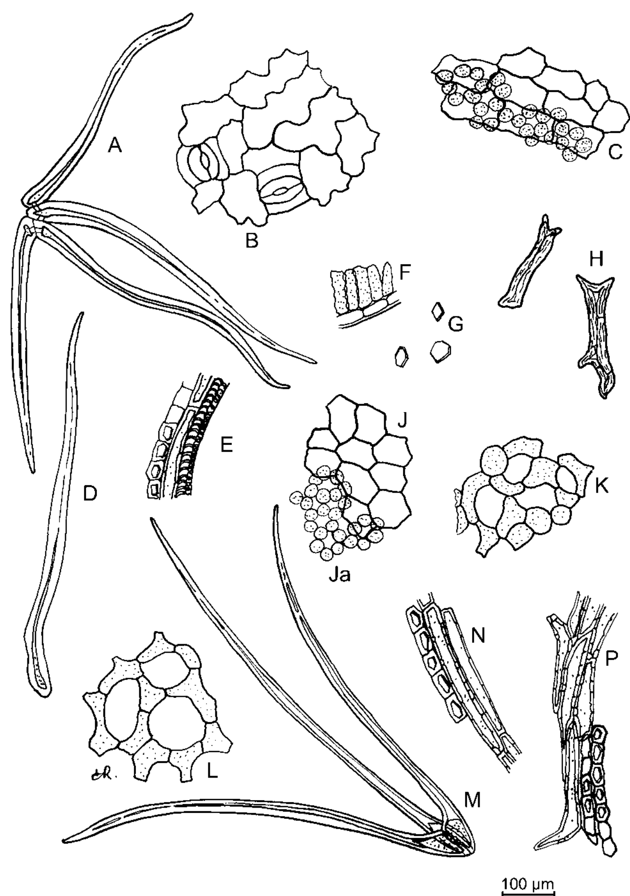



Figure 0909.-1.– *Dessin pour l'identification B de la feuille d'hamamélis pulvérisée*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 1,0 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL d'*éthanol à 60 pour cent V/V R.* Agitez pendant 15 min et filtrez.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 30 mg d'*acide tannique R* dans 5 mL d'*éthanol à 60 pour cent V/V R.*

*Solution témoin (b).* Dissolvez 5 mg d'*acide gallique R* dans 5 mL d'*éthanol à 60 pour cent V/V R.*

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, formiate d'éthyle R* (10:10:80 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C pendant 10 min, puis laissez refroidir.

*Détection* : pulvérisez de la *solution de chlorure ferrique R2* jusqu'à apparition de bandes gris-bleu (composés phénoliques).

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente, dans son tiers inférieur, une bande principale semblable quant à sa position à la bande principale du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) et, dans sa partie supérieure, une bande étroite semblable quant à sa position à la bande principale du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente en plus, en son milieu, plusieurs bandes faiblement colorées.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 7 pour cent de tiges et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers, déterminé sur 50 g de feuille d'hamamélis.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 4 h sur 2,000 g de feuille d'hamamélis pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 7,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 2,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des tanins dans les drogues végétales (*2.8.14*). Utilisez 0,750 g de feuille d'hamamélis pulvérisée (180) (*2.9.12*).

**01/2008:1871**

# HARPAGOPHYTON (EXTRAIT SEC D')

## Harpagophyti extractum siccum

DÉFINITION

Extrait sec obtenu à partir de *Racine d'harpagophyton (1095).*

*Teneur* : au minimum 1,5 pour cent d'harpagoside ($C_{24}H_{30}O_{11}$ ; $M_r$ 494,5) (extrait desséché).

PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec de l'eau ou un solvant hydroalcoolique au plus équivalent en concentration à l'éthanol à 95 pour cent *V/V.*

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre brun clair.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 1,0 g d'extrait à examiner, ajoutez 10 mL de *méthanol R,* puis chauffez dans un bain-marie à 60 °C pendant 10 min. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 1,0 mg d'*harpagoside R* et 2,5 mg de *fructose R* dans 1,0 mL de *méthanol R.*

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R, acétate d'éthyle R* (8:15:77 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : dans un courant d'air chaud.

*Détection* : pulvérisez une solution de *phloroglucine R* à 10 g/L dans de l'*éthanol à 96 pour cent R,* puis de l'*acide chlorhydrique R.* Chauffez à 80 °C pendant 5-10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| Harpagoside : une bande verte | Une bande verte (harpagoside) |
| ——— | ——— |
| | Une bande jaune |
| | Une bande vert clair |
| Fructose : une bande gris-jaune | Une bande gris-jaune peut être présente (fructose) |
| | Une bande brune |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Dans une fiole jaugée de 100 mL, introduire 0,350 g d'extrait à examiner, puis ajoutez 90 mL de *méthanol R* et traitez aux ultrasons pendant 20 min. Refroidissez à température ambiante, puis complétez à 100,0 mL avec du *méthanol R* et filtrez sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,2 µm).

*Solution témoin.* Dissolvez le contenu d'un flacon d'*harpagoside SCR* dans du *méthanol R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,10 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : *méthanol R, eau R* (50:50 *V/V*).

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 278 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Enregistrement* : 3 fois le temps de rétention de l'harpagoside.

*Temps de rétention* : harpagoside = environ 7 min.

Calculez la teneur pour cent en harpagoside à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times 1000}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'harpagoside dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'harpagoside dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse d'extrait à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse d'harpagoside dans 1 flacon d'*harpagoside SCR*, en grammes.

**01/2011:1095**

# HARPAGOPHYTON (RACINE D')

## Harpagophyti radix

DÉFINITION

Racine secondaire tubérisée, coupée et séchée d'*Harpagophytum procumbens* DC. et/ou de *Harpagophytum zeyheri* Decne.

*Teneur* : au minimum 1,2 pour cent d'harpagoside ($C_{24}H_{30}O_{11}$ ; $M_r$ 494,5) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

La racine est brun-gris ou brun foncé.

IDENTIFICATION

A. La racine d'harpagophyton est constituée d'éléments coupés en tranches épaisses, se présentant sous forme d'éventail ou de rouelle, ou broyés grossièrement en cossettes. La surface externe, de couleur foncée, est parcourue de rides longitudinales tortueuses. La section transversale, plus claire, comporte une zone cambiale de couleur foncée et des faisceaux de bois nettement alignés en files radiales. Le cylindre central présente de fines stries concentriques. Observée à la loupe, toute la section transversale présente des granules jaunes ou rouge-brun.

B. Réduisez la racine d'harpagophyton en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune-brun. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants (figure 1095.-1) : des fragments de suber constitués de cellules brun-jaune, à paroi mince, vus de face [B] et en section transversale [C] ; des fragments du parenchyme cortical composés de grandes cellules à paroi mince [E, K, N, P], contenant parfois des inclusions granuleuses brun-rouge et des gouttelettes jaunes isolées (P) ; des fragments de vaisseaux présentant des épaississements réticulés ou ponctués [D, F, G, M], des fragments de parenchyme lignifié [L], parfois associé à des vaisseaux, provenant du cylindre central ; des cristaux prismatiques [A] et de rares petites aiguilles d'oxalate de calcium dans le parenchyme. La poudre peut également présenter des cellules scléreuses, de forme rectangulaire ou polygonale, à contenu brun-rouge foncé [H, J]. Avec une solution de phloroglucinol dans de l'acide chlorhydrique, le parenchyme devient vert.

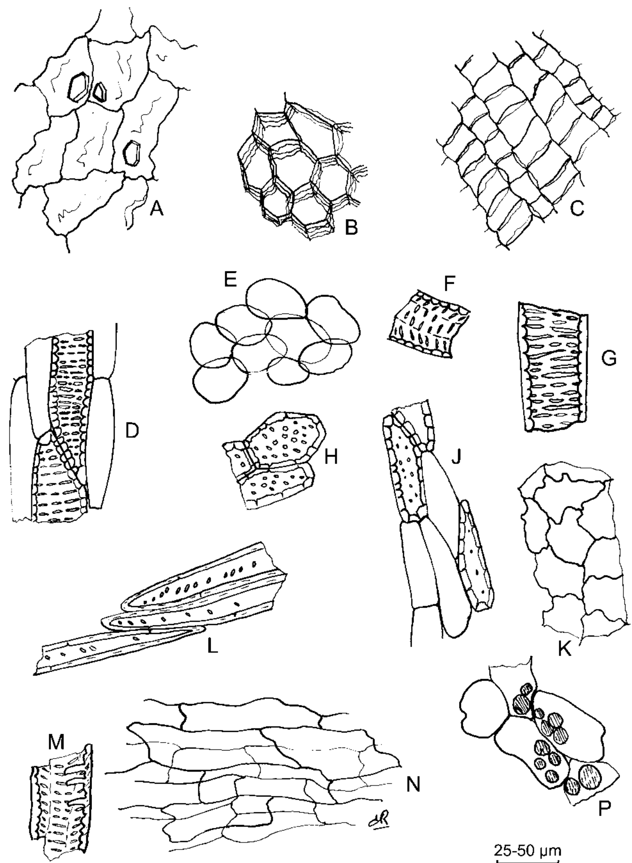



Figure 1095.-1.– *Dessin pour l'identification B de la racine d'harpagophyton pulvérisée*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Chauffez au bain-marie à 60 °C pendant 10 min 1,0 g de racine d'harpagophyton pulvérisée (355) (*2.9.12*) avec 10 mL de *méthanol R*. Filtrez et réduisez le filtrat à environ 2 mL, sous pression réduite et à une température ne dépassant pas 40 °C.

*Solution témoin.* Dissolvez 1 mg d'*harpagoside R* et 2,5 mg de *fructose R* dans 1 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R, acétate d'éthyle R* (8:15:77 *V/V/V*).

Drogues végétales

*Dépôt* : 20 µL [ou 5 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 7,5 cm].

*Séchage* : dans un courant d'air chaud.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente d'autres bandes distinctes, situées principalement au-dessus de la bande due à l'harpagoside. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| Harpagoside : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence (harpagoside) |
| ——— | ——— |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez une solution de *phloroglucine R* à 10 g/L dans de l'*éthanol à 96 pour cent R*, puis de l'*acide chlorhydrique R*. Chauffez à 80 °C pendant 5-10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente, en plus, plusieurs bandes de couleur jaune à brun situées au-dessus de la bande due à l'harpagoside. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| Harpagoside : une bande verte | Une bande verte (harpagoside) |
| ——— | ——— |
| | Une bande jaune |
| | Une bande vert clair |
| Fructose : une bande gris-jaune | Une bande gris-jaune peut être présente (fructose) |
| | Une bande brune |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

## ESSAI

**Amidon**. Examinez la racine d'harpagophyton pulvérisée (355) (*2.9.12*) au microscope en utilisant de l'*eau R*. Ajoutez de la *solution d'iode R1*. Aucune coloration bleue ne se développe.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de racine d'harpagophyton pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

## DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. A 0,500 g de racine d'harpagophyton pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 100,0 mL de *méthanol R*. Agitez pendant 4 h et filtrez sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm).

*Solution témoin*. Dissolvez le contenu d'un flacon d'*harpagoside SCR* dans du *méthanol R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,10 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : *méthanol R*, *eau R* (50:50 *V/V*).

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 278 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Enregistrement* : 3 fois le temps de rétention de l'harpagoside.

*Temps de rétention* : harpagoside = environ 7 min.

Calculez la teneur pour cent en harpagoside à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{m_2 \times A_1 \times 1000}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'harpagoside dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'harpagoside dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de drogue à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse d'*harpagoside SCR* dans la solution témoin, en grammes.

**01/2011:1222**

# HOUBLON (CÔNE DE)

## Lupuli flos

### DÉFINITION

Inflorescence femelle (appelée cône ou strobile), généralement entière, séchée de *Humulus lupulus* L.

### CARACTÈRES

Odeur caractéristique, aromatique.

### IDENTIFICATION

A. Le cône du houblon est généralement isolé et d'une longueur de 2-5 cm, pétiolé, ovoïde, constitué par de nombreuses bractées ovales, jaune-vert, sessiles, membraneuses, imbriquées. Les bractées externes sont aplaties et symétriques. Les bractées internes, plus longues, sont asymétriques à la base par un repli entourant généralement un fruit (akène) induvié. L'ovaire, plus rarement le fruit, la base des bractées et le repli induvial surtout, sont couverts de petites glandes jaune-orange.

B. Réduisez le cône de houblon en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune-vert. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants (figure 1222.-1) : des fragments de bractées et de bractéoles recouvertes de cellules épidermiques, irrégulières, polygonales ou à parois sinueuses [D, L, M] ; des poils tecteurs unicellulaires, coniques, droits ou recourbés, à parois minces et lisses, sectionnés [E, G] ou sur un épiderme [A] ; de rares stomates anomocytiques (*2.8.3*) [K] ; des poils secréteurs généralement libres à pied bicellulaire et bisérié et à tête composée de 8 cellules fines [H, N], rarement sur un épiderme [La] ; des fragments de mésophylle contenant de petites macles d'oxalate de calcium [J] ; de nombreux poils secréteurs caractéristiques, jaune-orange, à pied court,

Drogues végétales

bicellulaire et bisérié, surmonté d'une partie élargie en forme de coupe, de 150-250 μm de diamètre, formée d'une assise hémisphérique de cellules sécrétrices, à cuticule décollée et distendue par la sécrétion oléo-résineuse accumulée, vus de face [B] ou de profil [C] ; des fragments des cellules sclérenchymateuses du tégument de la graine, allongées et à parois épaisses, présentant des stries et de nombreux points [F].

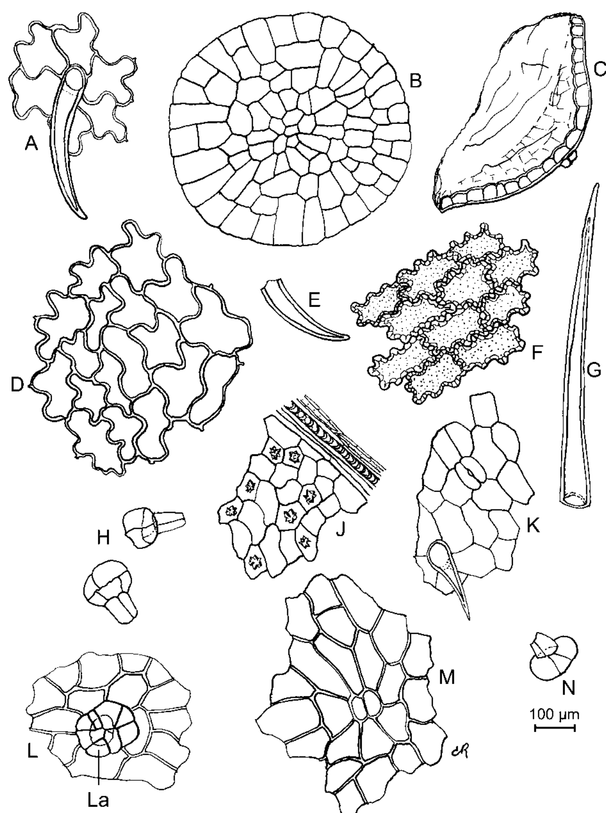



Figure 1222.-1.– *Dessin pour l'identification B du cône de houblon pulvérisé*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 1,0 g de cône de houblon récemment pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL d'un mélange de 3 volumes d'*eau R* et de 7 volumes de *méthanol R*, agitez pendant 15 min et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 1,0 mg d'*orange Soudan R*, 2,0 mg de *curcumine R* et 2,0 mg de *diméthylaminobenzaldéhyde R* dans 20 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide acétique anhydre R, acétate d'éthyle R, cyclohexane R* (2:38:60 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 μL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente 3 bandes d'atténuation de fluorescence : dans le quart inférieur, une bande faible due à la curcumine, un peu au-dessous du milieu du chromatogramme, une bande due au diméthylaminobenzaldéhyde et au-dessus, une bande due à l'orange Soudan. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente un certain nombre de bandes d'atténuation de fluorescence voisines quant à leur position aux bandes du chromatogramme obtenu avec la solution témoin : au niveau de la bande due à la curcumine, une bande faible due au xanthohumol ; au voisinage de celle due au diméthylaminobenzaldéhyde, les bandes dues aux humulones, et près de celle due à l'orange Soudan, les bandes dues aux lupulones.

*Détection B* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats B* : dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, les bandes dues aux lupulones présentent une fluorescence bleue, les bandes dues aux humulones présentent une fluorescence brune et la bande due au xanthohumol présente une fluorescence brun foncé.

*Détection C* : pulvérisez du *réactif phosphomolybdotungstique dilué R*. Exposez aux vapeurs d'ammoniac puis examinez à la lumière du jour.

*Résultats C* : dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, les bandes dues aux humulones et celles dues aux lupulones sont gris-bleu et la bande due au xanthohumol est gris-vert. Dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, les bandes sont gris-bleu ou gris-brun.

ESSAI

**Matières extractibles par l'éthanol à 70 pour cent *V/V*** : au minimum 25,0 pour cent.

A 10,0 g de cône de houblon pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 300 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R* et chauffez à reflux au bain-marie pendant 10 min. Laissez refroidir, filtrez et rejetez les 10 premiers millilitres du filtrat. Evaporez à siccité 30,0 mL du filtrat au bain-marie et desséchez à l'étuve à 100-105 °C pendant 2 h. La masse du résidu est au minimum de 0,250 g.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de cône de houblon pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 12,0 pour cent.

**01/2011:1831**

# HYDRASTIS

## Hydrastis rhizoma

DÉFINITION

Rhizome et racine séchés, entiers ou coupés, d'*Hydrastis canadensis* L.

*Teneur* :

– *hydrastine* ($C_{21}H_{21}NO_6$ ; $M_r$ 383,4) : au minimum 2,5 pour cent (drogue desséchée),
– *berbérine* ($C_{20}H_{18}NO_4$ ; $M_r$ 336,4) : au minimum 3,0 pour cent (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Le rhizome tortueux et noueux mesure environ 5 cm de long et 5-10 mm de large. La surface est jaunâtre ou gris-brun ; elle présente des sillons irréguliers et porte les restes de nombreuses racines minces et drues. Des bases de tiges et des écailles foliacées apparaissent sur la surface supérieure. La cassure est courte et résineuse. La surface coupée transversalement est brun-jaune et présente une écorce assez épaisse, un anneau formé de 12-20 faisceaux de bois largement séparés et une large moelle centrale.

B. Réduisez l'hydrastis en poudre (180) (*2.9.12*). La poudre est jaune-vert. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants (figure 1831.-1) : de nombreux fragments de parenchyme aux parois plus ou moins fines [A, G, K] ; quelques fragments brun-jaune du suber du rhizome et des racines, vus de face [J] ou en section transversale [F] ; des groupes de petits vaisseaux aux perforations très visibles dans les parois obliques transversales [L] et aux ponctuations en fente, simples ou aréolées [B, D, E] ; de rares amas de fibres ponctuées, aux parois fines [H], généralement associées aux vaisseaux ; de nombreuses masses brun-orange, granuleuses, ovoïdes ou sphériques. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente d'abondants grains d'amidon [C], simples le plus

Drogues végétales

souvent, mais parfois composés de 2-4 éléments ; les grains sont petits, sphériques ou ovoïdes, d'un diamètre pouvant atteindre environ 10 µm, et présentent parfois un petit hile arrondi ou en fente.

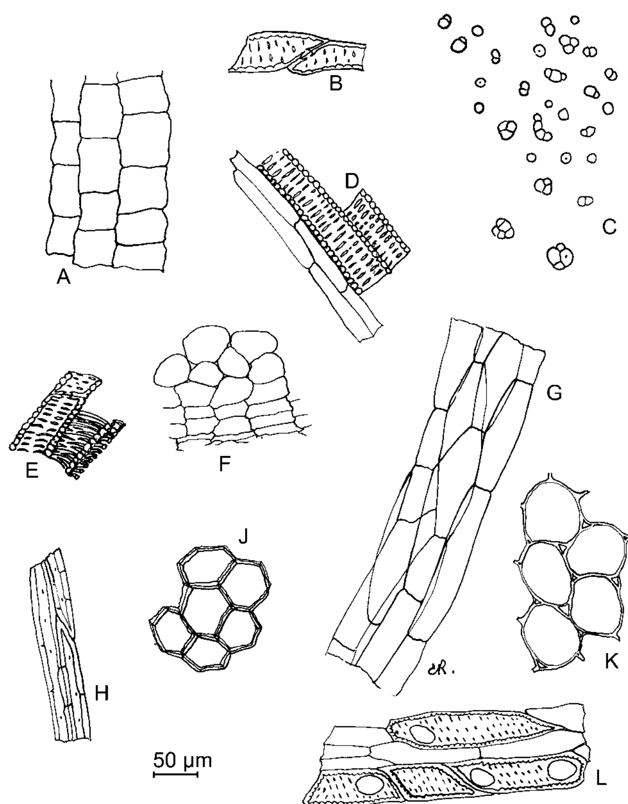



Figure 1831.-1.– *Dessin pour l'identification B de l'hydrastis pulvérisé*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 250 mg d'hydrastis pulvérisé (180) (*2.9.12*), ajoutez 4 mL d'un mélange de 20 volumes d'*eau R* et de 80 volumes de *méthanol R*. Traitez aux ultrasons pendant 10 min et filtrez. Lavez le résidu avec 2 fois 2 mL de *méthanol R*. Réunissez les solutions et complétez à 20 mL avec du *méthanol R*.

*Solution témoin.* Dissolvez extemporanément 5 mg de *chlorhydrate d'hydrastine R* et 5 mg de *chlorure de berbérine R* dans 20 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, acétate d'éthyle R* (10:10:80 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL [ou 2 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Berbérine : une bande de fluorescence jaune vif | Une bande de fluorescence jaune vif (berbérine) |
| Hydrastine : une bande de fluorescence bleu foncé | Une bande de fluorescence bleu foncé (hydrastine) |
| _______ | _______ |
| | Une bande de fluorescence bleu clair vif (hydrastinine) |
| | Une bande de fluorescence bleu foncé |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g d'hydrastis pulvérisé (180) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 8,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 4,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Dans un ballon à fond rond de 100 mL contenant 1,000 g d'hydrastis pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 50 mL d'une solution d'*ammoniaque concentrée R* à 1 pour cent *V/V* dans de l'*éthanol à 96 pour cent R*. Faites bouillir à reflux pendant 30 min. Laissez refroidir à température ambiante et filtrez le liquide sur un tampon de coton hydrophile en recueillant le filtrat dans une fiole. Ajoutez le tampon de coton hydrophile au résidu contenu dans le ballon à fond rond et répétez l'extraction avec 2 fois 30 mL d'une solution d'*ammoniaque concentrée R* à 1 pour cent *V/V* dans de l'*éthanol à 96 pour cent R*, en faisant bouillir chaque fois à reflux pendant 10 min et en filtrant sur un tampon de coton hydrophile dans la même fiole que précédemment. Filtrez ensuite les filtrats réunis sur un papier filtre dans un ballon à fond rond de 250 mL, puis rincez le ballon et le papier filtre avec 20 mL d'une solution d'*ammoniaque concentrée R* à 1 pour cent *V/V* dans de l'*éthanol à 96 pour cent R*. Evaporez le filtrat à siccité sous vide dans un bain-marie à 55 °C. Dissolvez le résidu dans 50,0 mL de phase mobile. Prélevez 10,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin.* Dissolvez extemporanément 10,0 mg de *chlorhydrate d'hydrastine SCR* et 10,0 mg de *chlorure de berbérine SCR* dans du *méthanol R* puis complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,125 m, Ø = 4 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : dissolvez 9,93 g de *phosphate monopotassique R* dans 730 mL d'*eau R*, ajoutez 270 mL d'*acétonitrile R* et mélangez.

*Débit* : 1,2 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 235 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *ordre d'élution* : ordre donné pour la préparation de la solution témoin ; notez les temps de rétention de ces substances ;
– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus à l'hydrastine et à la berbérine.

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les composants de la solution témoin.

Drogues végétales

Calculez la teneur pour cent de chaque alcaloïde (hydrastine et berbérine), à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p}{A_2 \times m_1} \times 2,5$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'hydrastine ou à la berbérine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'hydrastine ou à la berbérine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la drogue végétale à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse du chlorhydrate d'hydrastine ou du chlorure de berbérine utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,

$p$ = teneur pour cent de l'hydrastine dans le *chlorhydrate d'hydrastine SCR* ou de la berbérine dans le *chlorure de berbérine SCR*.

**01/2008:1498**
**corrigé 6.0**

# HYDROCOTYLE

## Centellae asiaticae herba

DÉFINITION

Parties aériennes fragmentées, séchées de *Centella asiatica* (L.) Urban.

*Teneur* : au minimum 6,0 pour cent de dérivés triterpéniques totaux, exprimés en asiaticoside ($C_{48}H_{78}O_{19}$ ; $M_r$ 959,15) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Les feuilles sont de dimensions très variables, le pétiole étant généralement 5-10 fois, parfois 15 fois, plus long que le limbe qui mesure 10-40 mm de long et 20-40 mm, parfois jusqu'à 70 mm, de large.

IDENTIFICATION

A. Les feuilles alternes, parfois réunies aux noeuds, réniformes ou orbiculaires ou oblongue-elliptiques, sont palminerves avec généralement 7 nervures et une marge crénelée. La feuille jeune a quelques poils sur la face inférieure, tandis que la feuille âgée est glabre. L'inflorescence, si elle est présente, est une ombelle simple, constituée généralement par 3 fleurs, plus rarement par 2 ou 4 ; la fleur, très petite (environ 2 mm), pentamère, a un ovaire infère ; le fruit, un diakène orbiculaire gris-brun, jusqu'à 5 mm de long, est très comprimé latéralement et possède 7-9 côtes courbées, proéminentes.

B. Réduisez l'hydrocotyle en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est gris-vert. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : de nombreux fragments d'épiderme de la feuille constitués par des cellules polygonales à cuticule irrégulièrement striée avec des stomates paracytiques (*2.8.3*) plus nombreux sur l'épiderme inférieur ; des fragments d'épiderme du pétiole à cellules allongées ; des poils tecteurs unicellulaires, parfois pluricellulaires, unisériés, longs et flexueux ; des feuilles jeunes ; des vaisseaux spiralés ; des canaux résinifères ; de petits prismes et des macles d'oxalate de calcium jusqu'à 40 µm de diamètre ; des faisceaux de la tige à fibres, étroits, avec des cloisons ; des fragments du fruit : des couches de cellules larges à parquet, des vaisseaux annelés, des cellules parenchymatiques contenant des grains d'amidon simples ou composés.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 5,0 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 50 mL d'*éthanol à 30 pour cent V/V R* ; chauffez à ébullition à reflux, centrifugez.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg d'*asiaticoside R* dans du *méthanol R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide acétique R, acide formique R, eau R, acétate d'éthyle R* (11:11:27:100 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner présentent dans le tiers inférieur une bande bleu-vert (asiaticoside). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente également en dessous de cette bande une bande violette (madécassoside) ; voisine du front du solvant une bande bleu clair (acide asiatique) et juste en dessous une bande violet-rose (acide madécassique) ; dans la moitié inférieure il présente des bandes brunes, grises et vert-brun situées entre la ligne de dépôt et la bande due au madécassoside, et au-dessus de la bande due à l'asiaticoside d'autres bandes jaune-brun ou jaune clair.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 7 pour cent, dont au maximum 5 pour cent de parties souterraines et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 12,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Dans un appareil à extraction continue, type Soxhlet, introduisez, dans un doigtier en cellulose, 5,0 g d'hydrocotyle pulvérisé (355) (*2.9.12*). Ajoutez 100 mL de *méthanol R* et chauffez pendant 8 h. Refroidissez et complétez l'extrait à 100,0 mL avec du *méthanol R*. Filtrez sur filtre de 0,45 µm. Prélevez 2,0 mL du filtrat et complétez à 20,0 mL avec du *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 20,0 mg d'*asiaticoside R* dans du *méthanol R*, si nécessaire en traitant aux ultrasons, et complétez à 20,0 mL avec le même solvant. Prélevez 2,0 mL de solution et complétez à 100,0 mL avec du *méthanol R*.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acétonitrile pour chromatographie R*,
– *phase mobile B* : diluez 3 mL d'*acide phosphorique R* dans de l'*eau R* et complétez à 1000 mL avec le même solvant,

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 65 | 22 | 78 |
| 65 - 66 | 55 | 45 |
| 66 - 76 | 95 | 5 |
| 76 - 85 | 22 | 78 |

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 200 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Rétention relative par rapport au solvant* : madécassoside = environ 5,8 ; asiaticoside = environ 8,1 ; acide madécassique = environ 17,6 ; acide asiatique = environ 21,7.

Calculez le facteur de réponse $F_R$ de l'asiaticoside à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times V_1 \times 100}{m_1 \times HPLC_P}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'asiaticoside dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$V_1$ = volume de la solution témoin, en millilitres,

$m_1$ = masse de l'asiaticoside dans la solution témoin, en milligrammes,

$HPLC_P$ = pureté déterminée de l'asiaticoside.

Calculez le facteur de réponse moyen ($\overline{RF}$) de l'asiaticoside à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{\sum_{i=1}^{N} RF_i}{N}$$

$\sum_{i=1}^{N} RF_i$ = somme des facteurs de réponse de l'asiaticoside des chromatogrammes obtenus avec la solution témoin,

$N$ = nombre des injections de la solution témoin ($N$ = 4, au minimum).

Calculez la teneur pour cent des dérivés triterpéniques totaux, exprimés en asiaticoside à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{V}{m}\left[\frac{A + (B \times 1,017) + (C \times 0,526) + (D \times 0,509)}{\overline{RF}}\right]$$

$V$ = volume de la solution à examiner, en millilitres,

$m$ = masse d'hydrocotyle dans la solution à examiner, en milligrammes,

$A$ = surface du pic dû à l'asiaticoside dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$B$ = surface du pic dû au madécassoside dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$C$ = surface du pic dû à l'acide madécassique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$D$ = surface du pic dû à l'acide asiatique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$\overline{RF}$ = facteur de réponse moyen de l'asiaticoside.

**01/2008:1875**

# IPÉCACUANHA (EXTRAIT FLUIDE TITRÉ D')

## Ipecacuanhae extractum fluidum normatum

DÉFINITION

Extrait fluide titré produit à partir de la *Racine d'ipécacuanha (0094).*

*Teneur* : 1,80 pour cent à 2,20 pour cent d'alcaloïdes totaux, calculés en émétine ($C_{29}H_{40}N_2O_4$ ; $M_r$ 480,7).

PRODUCTION

L'extrait fluide titré d'ipécacuanha est produit à partir de la drogue végétale et d'éthanol de 60 à 80 pour cent *V/V* par une méthode appropriée.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide brun foncé.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Prélevez 5,0 mL d'extrait à examiner et complétez à 50 mL avec de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R.* A 2,0 mL de cette solution, ajoutez 2 mL d'*eau R* et 0,1 mL d'*ammoniaque concentrée R.* Ajoutez 10 mL d'*éther R* et agitez. Recueillez la couche supérieure. Desséchez-la sur environ 2 g de *sulfate de sodium anhydre R* et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 2,5 mg de *chlorhydrate d'émétine SCR* et 3 mg de *chlorhydrate de céphéline SCR* dans du *méthanol R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, méthanol R, acétate d'éthyle R, toluène R* (2:15:18:65 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : pulvérisez une solution d'*iode R* à 5 g/L dans de l'*éthanol à 96 pour cent R.* Chauffez à 60 °C pendant 10 min et laissez refroidir pendant 30 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| _______ | _______ |
| Emétine : une bande jaune | Une bande jaune (émétine) |
| Céphéline : une bande brun-clair | Une bande brun clair (céphéline) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible fluorescence sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| _______ | _______ |
| Emétine : une bande intense de fluorescence jaune | Une bande intense de fluorescence jaune (émétine) |
| | Une bande de fluorescence bleu clair (céphéline) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

Avec l'extrait fluide de racine de *Cephaelis acuminata,* les bandes dues à l'émétine et à la céphéline dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont de dimensions semblables.

Avec l'extrait fluide de racine de *Cephaelis ipecacuanha,* la bande due à l'émétine est nettement plus grande que la bande due à la céphéline dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

ESSAI

**Ethanol** (*2.9.10*) : 95 pour cent à 105 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

DOSAGE

Prélevez 1,00 g d'extrait à examiner et complétez à 10 mL avec de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R*, puis transvasez à l'aide d'une baguette de verre dans une colonne chromatographique, d'une longueur d'environ 0,2 m et d'un diamètre intérieur d'environ 15 mm, contenant 8 g d'*oxyde d'aluminium basique R*. Après infiltration dans la couche d'oxyde d'aluminium, rincez la fiole, la baguette de verre et la paroi interne de la colonne avec 3 fois 2 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Procédez à l'élution par portions de 40 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Evitez toute perturbation ou dessèchement en surface de la couche d'oxyde d'aluminium. Recueillez la totalité de l'éluat. Evaporez l'éluat au bain-marie jusqu'à l'obtention d'un volume d'environ 10 mL. Laissez refroidir. Ajoutez 10,0 mL d'*acide chlorhydrique 0,02 M* et 20 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R*. Titrez l'excès d'acide par l'*hydroxyde de sodium 0,02 M* en présence de 0,15 mL d'*indicateur mixte au rouge de méthyle R*.

Effectuez un dosage à blanc en remplaçant l'extrait à examiner par 10,0 mL d'alcool dont le titre est indiqué sur l'étiquette.

1 mL d'*acide chlorhydrique 0,02 M* correspond à 4,807 mg d'alcaloïdes totaux, calculés en émétine.

**01/2008:0093**

# IPÉCACUANHA (POUDRE TITRÉE D')

## Ipecacuanhae pulvis normatus

DÉFINITION

Racine d'ipécacuanha pulvérisée (180) (*2.9.12*) ajustée, si nécessaire, avec du lactose en poudre ou une poudre de racine d'ipécacuanha à faible teneur en alcaloïdes totaux.

*Teneur* : 1,9 pour cent à 2,1 pour cent d'alcaloïdes totaux, exprimés en émétine ($C_{29}H_{40}N_2O_4$ ; $M_r$ 480,7) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre gris clair ou brun-jaune.

Odeur faible.

IDENTIFICATION

A. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des cellules parenchymateuses, des raphides d'oxalate de calcium d'une longueur pouvant atteindre 80 µm, en faisceaux ou disséminés dans la poudre ; des fragments de trachéides et de vaisseaux généralement d'un diamètre de 10-20 µm, aux ponctuations aréolées ; des vaisseaux plus larges et des cellules sclérenchymateuses provenant du rhizome. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente des cellules parenchymateuses contenant des grains d'amidon simples et des grains composés de 2-8 éléments, les grains simples pouvant atteindre un diamètre de 15 µm dans *Cephaelis ipecacuanha* et de 22 µm dans *C. acuminata*. Examinée dans le *glycérol à 85 pour cent R*, la poudre titrée d'ipécacuanha peut présenter des cristaux de lactose.

B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dans un tube à essai, introduisez 0,1 g de poudre titrée d'ipécacuanha. Ajoutez 0,05 mL d'*ammoniaque concentrée R* et 5 mL d'*éther R*, puis agitez énergiquement le mélange à l'aide d'une baguette de verre. Laissez reposer pendant 30 min et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 2,5 mg de *chlorhydrate d'émétine SCR* et 3 mg de *chlorhydrate de céphéline SCR* dans du *méthanol R*, puis complétez à 20 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, méthanol R, acétate d'éthyle R, toluène R* (2:15:18:65 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : pulvérisez une solution d'*iode R* à 5 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R* ; chauffez à 60 °C pendant 10 min et examinez à la lumière du jour.

*Résultats A* : les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et la solution témoin présentent dans leur partie inférieure une bande jaune due à l'émétine et au-dessous d'elle une bande brun clair due à la céphéline.

*Détection B* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats B* : la bande due à l'émétine présente une intense fluorescence jaune et la bande due à la céphéline une fluorescence bleu clair. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente en plus d'autres bandes de faible fluorescence.

Dans le cas de poudres titrées obtenues à partir de racine de *C. acuminata*, les bandes principales du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur position, leur fluorescence et leurs dimensions aux bandes du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

Dans le cas de poudres titrées obtenues à partir de racine de *C. ipecacuanha*, la seule différence réside dans les dimensions de la bande due à la céphéline dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner qui est nettement plus petite que la bande correspondante du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 5,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de poudre titrée d'ipécacuanha.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 5,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 3,0 pour cent.

DOSAGE

Dans une fiole séchée, pesez 7,5 g de poudre titrée d'ipécacuanha et ajoutez 100 mL d'*éther R*. Agitez pendant 5 min et ajoutez 5 mL d'*ammoniaque diluée R1*. Agitez la fiole pendant 1 h et ajoutez 5 mL d'*eau R*. Agitez fortement et transvasez la phase éthérée dans une 2[de] fiole en filtrant sur un tampon de coton. Lavez le résidu dans la 1[re] fiole avec 2 fois 25 mL d'*éther R* et filtrez chaque fois sur le même tampon de coton. Réunissez les solutions éthérées, puis éliminez l'éther par distillation. Dissolvez le résidu dans 2 mL d'*éthanol à 90 pour cent V/V R*, évaporez l'éthanol à siccité et chauffez à 100 °C pendant 5 min. Dissolvez le résidu en chauffant au bain-marie, dans 5 mL d'*éthanol à 90 pour cent V/V R* neutralisé au préalable. Ajoutez 15,0 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* et titrez l'excès d'acide par l'*hydroxyde de sodium 0,1 M* en présence de 0,5 mL d'*indicateur mixte au rouge de méthyle R*.

1 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* correspond à 24,03 mg d'alcaloïdes totaux, exprimés en émétine.

CONSERVATION

En récipient étanche.

**01/2008:0094**
**corrigé 6.0**

# IPÉCACUANHA (RACINE D')

## Ipecacuanhae radix

DÉFINITION

Parties souterraines, fragmentées et séchées de *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich., connue sous le nom d'ipécacuanha du Matto Grosso, ou de *Cephaelis acuminata* Karsten, connue sous le nom d'ipécacuanha du Costa Rica, ou mélange des 2 espèces. Les principaux alcaloïdes sont l'émétine et la céphéline.

*Teneur* : au minimum 2,0 pour cent d'alcaloïdes totaux, exprimés en émétine ($C_{29}H_{40}N_2O_4$ ; $M_r$ 480,7) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Odeur faible.

IDENTIFICATION

A. *C. ipecacuanha.* La racine se présente en fragments assez tortueux, brun-rouge foncé ou brun très foncé, rarement d'une longueur de plus de 15 cm et d'une épaisseur de 6 mm, à renflements annulaires externes rapprochés et à étranglements arrondis entourant complètement la racine. La cassure est courte dans l'écorce et fibreuse dans le bois. La section transversale présente une large écorce grisâtre et une zone ligneuse mince, homogène et dense. Le rhizome est constitué par des fragments courts adhérant habituellement aux racines, de forme cylindrique d'un diamètre atteignant 2 mm, finement sillonnés longitudinalement. La moelle atteint environ un sixième du diamètre total.

   *C. acuminata.* Dans l'ensemble, la racine ressemble à celle de *C. ipecacuanha* mais elle présente les différences suivantes : son épaisseur atteint souvent 9 mm, la face externe brun-gris ou brun-rouge, présente des étranglements transversaux à intervalles de 1-3 mm. Ces étranglements généralement de 0,5-1 mm de largeur n'occupent qu'environ la moitié de la circonférence et disparaissent aux extrémités.

B. Réduisez la racine d'ipécacuanha en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est gris clair ou brun-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des cellules parenchymateuses, des raphides d'oxalate de calcium d'une longueur pouvant atteindre jusqu'à 80 µm, en faisceaux ou disséminés dans la poudre ; des fragments de trachéides et de vaisseaux d'un diamètre de 10-20 µm généralement, à ponctuations aréolées ; des vaisseaux plus larges et des cellules sclérenchymateuses provenant du rhizome. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente des cellules parenchymateuses contenant des grains d'amidon simples et des grains composés de 2-8 éléments, les grains simples pouvant atteindre un diamètre de 15 µm dans *C. ipecacuanha* et de 22 µm dans *C. acuminata.*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

   *Solution à examiner.* Dans un tube à essai, introduisez 0,1 g de racine d'ipécacuanha pulvérisée (180) (*2.9.12*). Ajoutez 0,05 mL d'*ammoniaque concentrée R* et 5 mL d'*éther R*, puis agitez énergiquement le mélange à l'aide d'une baguette de verre. Laissez reposer pendant 30 min et filtrez.

   *Solution témoin.* Dissolvez 2,5 mg de *chlorhydrate d'émétine SCR* et 3 mg de *chlorhydrate de céphéline SCR* dans du *méthanol R* et complétez à 20 mL avec le même solvant.

   *Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

   *Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, méthanol R, acétate d'éthyle R, toluène R* (2:15:18:65 *V/V/V/V*).

   *Dépôt* : 10 µL, en bandes.

   *Développement* : sur un parcours de 10 cm.

   *Séchage* : à l'air.

   *Détection A* : pulvérisez une solution d'*iode R* à 5 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R* et chauffez à 60 °C pendant 10 min. Examinez à la lumière du jour.

   *Résultats A* : les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et la solution témoin présentent dans leur partie inférieure une bande jaune due à l'émétine et au-dessous une bande brun clair due à la céphéline.

   *Détection B* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

   *Résultats B* : la bande due à l'émétine présente une intense fluorescence jaune et la bande due à la céphéline une fluorescence bleu clair. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente en plus d'autres bandes de faible fluorescence.

   Pour *C. acuminata*, les bandes principales du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur position, leur fluorescence et leurs dimensions aux bandes du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

   Pour *C. ipecacuanha*, la seule différence réside dans les dimensions de la bande due à la céphéline dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner qui est nettement plus petite que la bande correspondante du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de racine d'ipécacuanha pulvérisée (180) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 5,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 3,0 pour cent.

DOSAGE

Dans une fiole séchée, pesez 7,5 g de racine d'ipécacuanha pulvérisée (180) (*2.9.12*) et ajoutez 100 mL d'*éther R*. Agitez pendant 5 min puis ajoutez 5 mL d'*ammoniaque diluée R1*. Agitez pendant 1 h puis ajoutez 5 mL d'*eau R*. Agitez fortement et transvasez la phase éthérée dans une 2[e] fiole en filtrant sur un tampon de coton. Lavez le résidu dans la 1[re] fiole avec 2 fois 25 mL d'*éther R* et filtrez chaque fois sur le même tampon de coton. Réunissez les solutions éthérées, puis éliminez l'éther par distillation. Dissolvez le résidu dans 2 mL d'*éthanol à 90 pour cent V/V R*, évaporez à siccité et chauffez à 100 °C pendant 5 min. Dissolvez le résidu en chauffant au bain-marie, dans 5 mL d'*éthanol à 90 pour cent V/V R* neutralisés au préalable. Ajoutez 15,0 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* et titrez l'excès d'acide par l'*hydroxyde de sodium 0,1 M* en présence de 0,5 mL d'*indicateur mixte au rouge de méthyle R*.

1 mL d'*acide chlorhydrique 0,1 M* correspond à 24,03 mg d'alcaloïdes totaux, exprimés en émétine.

CONSERVATION

A l'abri de l'humidité.

**01/2008:1530**

# IPÉCACUANHA (TEINTURE TITRÉE D')

## Ipecacuanhae tinctura normata

DÉFINITION

Teinture produite à partir de *Racine d'ipécacuanha (0094).*

*Teneur* : 0,18 pour cent (*m/m*) à 0,22 pour cent (*m/m*) d'alcaloïdes totaux, calculé en émétine ($C_{29}H_{40}N_2O_4$ ; $M_r$ 480,7).

PRODUCTION

La teinture titrée d'ipécacuanha est produite à partir de la drogue végétale et d'éthanol à 70 pour cent *V/V*, par une méthode appropriée.

Drogues végétales

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide brun-jaune.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 2,0 mL de teinture à examiner, ajoutez 2 mL d'*eau R* et 0,1 mL d'*ammoniaque concentrée R*. Ajoutez 10 mL d'*éther R* puis agitez. Recueillez la phase éthérée. Desséchez-la sur environ 2 g de *sulfate de sodium anhydre R* et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 2,5 mg de *chlorhydrate d'émétine SCR* et 3 mg de *chlorhydrate de céphéline SCR* dans du *méthanol R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, méthanol R, acétate d'éthyle R, toluène R* (2:15:18:65 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : pulvérisez une solution d'*iode R* à 5 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R* et chauffez la plaque à 60 °C pendant 10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| _______ | _______ |
| Emétine : une bande jaune | Une bande jaune (émétine) |
| Céphéline : une bande brun-clair | Une bande brun clair (céphéline) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible fluorescence sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| _______ | _______ |
| Emétine : une bande intense de fluorescence jaune | Une bande intense de fluorescence jaune (émétine) |
| | Une bande de fluorescence bleu clair (céphéline) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

Dans le cas des teintures obtenues à partir de racine de *Cephaelis acuminata*, les bandes dues à l'émétine et à la céphéline dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont de dimensions semblables.

Dans le cas des teintures obtenues à partir de racine de *Cephaelis ipecacuanha*, la bande due à l'émétine est nettement plus grande que la bande due à la céphéline dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

ESSAI

**Ethanol** (*2.9.10*) : 95 pour cent à 105 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

DOSAGE

Transférez 10,00 g de teinture à examiner dans une colonne chromatographique, d'une longueur d'environ 0,2 m et d'un diamètre intérieur d'environ 15 mm, remplie de 8 g d'*oxyde d'aluminium basique R*. Après infiltration dans la couche d'oxyde d'aluminium, rincez la paroi interne de la colonne avec 3 fois 2 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Eluez par portions avec 40 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*, en veillant à éviter la formation de tourbillons ou le dessèchement en surface de l'oxyde d'aluminium. Recueillez la totalité de l'éluat. Evaporez au bain-marie jusqu'à obtention d'un volume d'environ 10 mL. Laissez refroidir, puis ajoutez 10,0 mL d'*acide chlorhydrique 0,02 M* et 20 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R*. Titrez l'acide en excès par l'*hydroxyde de sodium 0,02 M* en présence de 0,15 mL d'*indicateur mixte au rouge de méthyle R*.

Effectuez un dosage à blanc en remplaçant la teinture à examiner par 10,0 mL d'alcool dont le titre est indiqué sur l'étiquette.

1 mL d'*acide chlorhydrique 0,02 M* correspond à 4,807 mg d'alcaloïdes totaux, calculés en émétine.

**01/2008:1333**
**corrigé 6.0**

# ISPAGHUL (GRAINE D')

## Plantaginis ovatae semen

DÉFINITION

Graine mûre et sèche de *Plantago ovata* Forssk. (*P. ispaghula* Roxb.).

IDENTIFICATION

A. La graine d'ispaghul est beige rosé, lisse, en forme de bateau et incurvée. Elle mesure 1,5 mm à 3,5 mm de long, 1,5 mm à 2 mm de large et 1 mm à 1,5 mm d'épaisseur. La face concave présente, au centre, une tache claire correspondant au hile. La face convexe présente une tache brun clair, correspondant à l'emplacement de l'embryon et occupant environ le quart de la longueur de la graine.

B. Réduisez la graine d'ispaghul en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun pâle. Examinez au microscope en utilisant du *réactif lactique R*. La poudre présente principalement des fragments de l'épisperme à cellules polygonales remplies de mucilage ; des fragments des assises internes du tégument avec des cellules brunâtres et à parois fines, souvent associées aux assises externes de l'albumen ; des fragments d'albumen à cellules à parois épaissies, cellulosiques et contenant des grains d'aleurone et des gouttelettes d'huile ; de quelques fragments d'embryon à cellules à parois fines. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente des grains d'amidon, d'un diamètre de 3 µm à 25 µm, simples ou composés de 2 à 4 éléments.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Dans un tube à centrifugation à paroi épaisse, introduisez 50 mg de graine d'ispaghul pulvérisée (355) (*2.9.12*). Ajoutez 2 mL d'une solution d'*acide trifluoracétique R* à 230 g/L. Agitez énergiquement. Bouchez le tube et chauffez le mélange à 120 °C pendant 1 h. Centrifugez l'hydrolysat obtenu, transvasez le surnageant limpide dans un ballon de 50 mL, ajoutez 10 mL d'*eau R* et évaporez à siccité sous pression réduite. Reprenez le résidu avec 10 mL d'*eau R* et évaporez à nouveau à siccité sous pression réduite. Reprenez le résidu avec 2 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 10 mg d'*arabinose R* dans un minimum d'*eau R* et complétez à 10 mL avec du *méthanol R*.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 10 mg de *xylose R* dans un minimum d'*eau R* et complétez à 10 mL avec du *méthanol R*.

*Solution témoin (c).* Dissolvez 10 mg de *galactose R* dans un minimum d'*eau R* et complétez à 10 mL avec du *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *eau R, acétonitrile R* (15:85 *V/V*).

*Application* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Détection* : Pulvérisez du *réactif à l'acide aminohippurique R* et chauffez la plaque à 120 °C pendant 5 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultat* : voir ci-dessus la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Xylose : une bande rose-orange | Une bande rose-orange (xylose) |
| Arabinose : une bande rose-orange | Une bande rose-orange (arabinose) |
| Galactose : une bande jaune | Une bande jaune (galactose) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*). Effectuez la détermination sur 10,0 g de graine d'ispaghul.

**Indice de gonflement** (*2.8.4*) : au minimum 9.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de graine d'ispaghul pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 4,0 pour cent.

**01/2008:1334**
**corrigé 6.0**

# ISPAGHUL (GRAINE D'), TÉGUMENT DE LA

## Plantaginis ovatae seminis tegumentum

DÉFINITION

Episperme et assises adjacentes collabées prélevés sur la graine de *Plantago ovata* Forssk. (*P. ispaghula* Roxb.).

IDENTIFICATION

A. Le tégument se compose de fragments ou écailles beige rosé, pouvant atteindre environ 2 mm de long et 1 mm de large, dont certains présentent une tache brun clair correspondant à l'emplacement dans la graine de l'embryon qui en a été enlevé.

B. Réduisez la drogue en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune pâle. Examinez au microscope en utilisant du *réactif lactique R*. La poudre présente les éléments suivants : principalement des fragments de l'épisperme à cellules polygonales remplies de mucilage ; des fragments des assises internes du tégument avec des cellules, brunâtres et à parois fines, souvent associées aux assises externes de l'albumen. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente de rares grains d'amidon, d'un diamètre de 3-25 µm, simples ou composés de 2-4 éléments.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dans un tube à centrifugation à paroi épaisse, introduisez 10 mg de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*). Ajoutez 2 mL d'une solution d'*acide trifluoracétique R* à 230 g/L. Agitez énergiquement. Bouchez le tube et chauffez à 120 °C pendant 1 h. Centrifugez l'hydrolysat obtenu, transvasez le surnageant limpide dans un ballon de 50 mL, ajoutez 10 mL d'*eau R* et évaporez à siccité sous pression réduite. Reprenez le résidu avec 10 mL d'*eau R* et évaporez à nouveau à siccité sous pression réduite. Reprenez le résidu avec 2 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 10 mg d'*arabinose R* dans un minimum d'*eau R* et complétez à 10 mL avec du *méthanol R*.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 10 mg de *xylose R* dans un minimum d'*eau R* et complétez à 10 mL avec du *méthanol R*.

*Solution témoin (c)*. Dissolvez 10 mg de *galactose R* dans un minimum d'*eau R* et complétez à 10 mL avec du *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *eau R, acétonitrile R* (15:85 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Détection* : pulvérisez du *réactif à l'acide aminohippurique R* et chauffez à 120 °C pendant 5 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente 2 bandes rose orangé (arabinose et xylose) et une bande jaune (galactose) semblables quant à leur position et leur coloration aux bandes des chromatogrammes obtenus avec les solution témoins.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*). Effectuez la détermination sur 5,0 g de drogue.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 4,0 pour cent.

**Indice de gonflement** (*2.8.4*) : au minimum 40, déterminé sur 0,1 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**04/2008:1623**

# KARKADÉ

## Hibisci sabdariffae flos

DÉFINITION

Calice et calicule secs, entiers ou fragmentés d'*Hibiscus sabdariffa* L. récoltés pendant la période de fructification.

*Teneur* : au minimum 13,5 pour cent d'acides, exprimés en acide citrique ($C_6H_8O_7$ ; $M_r$ 192,1) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Saveur acide.

IDENTIFICATION

A. Le calice est concrescent et urcéolé sur sa moitié inférieure, sa moitié supérieure se sépare en 5 languettes acuminées et recourbées. Les languettes possèdent une nervure médiane bien marquée, légèrement proéminente, et portent une épaisse glande nectarifère mesurant environ 1 mm de diamètre. Le calicule se compose de 8-12 folioles étroites, élargies à la base, adhérentes à la base du calice. Le calice et le calicule sont charnus, secs, friables, rouge vif ou violet sombre s'éclaircissant légèrement à la base de la face interne.

B. Réduisez le karkadé en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est rouge ou rouge-violet. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments du parenchyme, pour la plupart rouges, avec de nombreuses macles d'oxalate de calcium et quelques cavités remplies de mucilage, parfois accompagnés de cellules épidermiques polygonales et de stomates anisocytiques (*2.8.3*) ; de nombreux fragments de faisceaux conducteurs à vaisseaux spiralés et réticulés ; des fibres sclérenchymateuses à large lumière ; rarement, des cellules parenchymateuses rectangulaires ponctuées ; des fragments de poils tecteurs unicellulaires lisses et flexueux et de très rares poils glanduleux ; des grains de pollen arrondis et à exine échineuse.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*) ajoutez 10 mL d'*éthanol à 60 pour cent V/V R*. Agitez pendant 15 min et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 2,5 mg de *rouge de quinaldine R* et 2,5 mg de *bleu sulfan R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, butanol R* (10:12:40 *V/V/V*).

*Dépôt* : 5 µL en bandes de 10 mm [ou 2 µL en bandes de 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez immédiatement à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Rouge de quinaldine : une bande rouge-orange | |
| | Une bande violette intense |
| Bleu sulfan : une bande bleue | |
| | Une bande bleu-violet intense |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 2 pour cent de fragments de fruits (funicules rouges, fragments gris-jaune de la capsule à 5 loges dont les parois fines se composent de plusieurs assises de fibres croisées, graines réniformes aplaties à surface ponctuée).

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 11,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

**Pouvoir colorant**. Réduisez en poudre grossière (1400) (*2.9.12*) et homogénéisez 100 g de drogue. Prélevez environ 10 g de cette poudre et réduisez-les en poudre plus fine (355) (*2.9.12*). Dans un flacon de 100 mL, introduisez 1,0 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), puis ajoutez 25 mL d'*eau R* bouillante et chauffez au bain-marie pendant 15 min, en agitant fréquemment. Filtrez le mélange à chaud dans une fiole jaugée de 50 mL ; rincez successivement le flacon de 100 mL et le filtre avec 3 fois 5 mL d'*eau R* chaude. Refroidissez, puis complétez à 50 mL avec de l'*eau R*. Prélevez 5 mL de cette solution et complétez à 50 mL avec de l'*eau R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 520 nm en utilisant l'*eau R* comme liquide de compensation. L'absorbance est au minimum de 0,350 pour la plante entière et au minimum de 0,250 pour la plante fragmentée.



DOSAGE

Agitez 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*) avec 100 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R* pendant 15 min. Filtrez. A 50,0 mL du filtrat, ajoutez 100 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R*. Titrez par l'*hydroxyde de sodium 0,1 M* jusqu'à pH 7,0. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (*2.2.20*).

1 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* correspond à 6,4 mg d'acide citrique.

**01/2008:1504**
**corrigé 6.0**

# KOLA

## Colae semen

DÉFINITION

Graine privée de tégument, entière ou fragmentée, séchée de *Cola nitida* (Vent.) Schott et Endl. (*C. vera* K. Schum.) et de ses variétés ainsi que de *Cola acuminata* (P. Beauv.) Schott et Endl. (*Sterculia acuminata* P. Beauv.).

*Teneur* : au minimum 1,5 pour cent de caféine ($M_r$ 194,2) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Les graines sont oblongues, plus ou moins obtuses, subtétragones, déformées par pression réciproque dans le fruit ; de grosseur variable, elles pèsent 5-15 g. Elles sont dures, à surface lisse d'un brun très foncé, un peu plus brun-rouge à l'intérieur. Chez *C. nitida* et ses variétés, les graines sont divisées en 2 parties sensiblement plan-convexes correspondant aux cotylédons, presque toujours séparées dans la drogue commerciale. Les cotylédons mesurent 3-4 cm de long sur 2-2,5 cm de large et 1-2 cm d'épaisseur. Chez *C. acuminata*, ils sont plus petits que chez *C. nitida* et se fragmentent en 4-6 morceaux irréguliers.

B. Réduisez la kola en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-rouge. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente les éléments suivants : de nombreux grains d'amidon ovoïdes ou réniformes mesurant 5-25 µm, à stries concentriques et à hile étoilé légèrement excentrique ; des débris de tissu cotylédonaire, à larges cellules polygonales, à parois épaisses, rougeâtres, remplies de grains d'amidon ; de rares fragments de l'assise externe cotylédonaire.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 1,0 g de kola pulvérisée (355) (*2.9.12*) ajoutez 5 mL d'*éthanol à 60 pour cent V/V R*. Agitez mécaniquement à 40 °C pendant 30 min. Filtrez.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 25 mg de *caféine R* dans 10 mL d'*éthanol à 60 pour cent V/V R*.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 50 mg de *théobromine R* dans 10 mL de phase mobile. Filtrez.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R.*

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R, acétate d'éthyle R* (10:13:77 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air pendant 5 min.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente 2 bandes principales d'atténuation de fluorescence semblables quant à leur position aux bandes des chromatogrammes obtenus avec chacune des solutions témoins (a) et (b).

*Détection B* : pulvérisez un mélange à volumes égaux d'*éthanol à 96 pour cent R* et d'*acide chlorhydrique R*, puis une solution préparée extemporanément en dissolvant 1 g d'*iode R* et 1 g d'*iodure de potassium R* dans 100 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*.

*Résultats B* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande principale brun-rouge semblable quant à sa position et sa coloration à la bande du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 2,00 g de kola pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 9,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* A 1,00 g ($m_1$) de kola pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 50 mL de *méthanol R*. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Laissez refroidir. Filtrez. Rincez le filtre avec 10 mL de *méthanol R*. Reprenez le résidu avec 50 mL de *méthanol R*. Traitez comme précédemment. Réunissez les filtrats et les solutions de rinçage dans une fiole jaugée de 200,0 mL et complétez à 200,0 mL avec du *méthanol R*. Introduisez 20,0 mL de cette solution dans un ballon à fond rond, évaporez à siccité sous pression réduite. Reprenez le résidu avec la phase mobile, transvasez dans une fiole jaugée de 50,0 mL et complétez à 50,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin.* Dans une fiole jaugée de 100,0 mL, dissolvez 30,0 mg ($m_2$) de *caféine SCR* et 15,0 mg de *théobromine R* dans la phase mobile et complétez à 100,0 mL avec la phase mobile. Introduisez 10,0 mL de cette solution dans une fiole jaugée de 100,0 mL et complétez à 100,0 mL avec la phase mobile.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : *méthanol R, eau R* (25:75 *V/V*).

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 272 nm.

*Injection* : le volume choisi de chaque solution ; injecteur à boucle.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 2,5 entre les pics dus à la caféine et la théobromine. Si nécessaire, ajustez le volume d'*eau R* dans la phase mobile.

Calculez la teneur en caféine à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{m_2 \times A_1 \times 50}{m_1 \times A_2}$$

$A_1$ = surface du pic dû à la caféine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à la caféine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai de kola dans la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse de *caféine SCR* dans la solution témoin, en grammes.

**01/2008:1534**

# LAVANDE (FLEUR DE)

## Lavandulae flos

DÉFINITION

Fleur séchée de *Lavandula angustifolia* P. Mill. (*L. officinalis* Chaix).

*Teneur* : au minimum 13 mL/kg d'huile essentielle (drogue anhydre).

CARACTÈRES

Odeur fortement aromatique.

IDENTIFICATION

*Première identification : A, B, D.*

*Seconde identification : A, B, C.*

A. La fleur, courtement pédonculée, est constituée par un calice tubuleux, gris-bleu, se terminant par 4 dents très courtes et un petit lobe arrondi, une corolle bleue, bilabiée, à lèvre supérieure bifide et à lèvre inférieure trilobée, 4 étamines didynames, surmontées d'anthères ovoïdes.

B. Réduisez la fleur de lavande en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est gris-bleu. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des poils tecteurs, bifurqués à un ou plusieurs étages ; des poils sécréteurs à pied court et à tête octocellulaire de type *Labiatae* ; des poils sécréteurs, à pied unicellulaire ou pluricellulaire et à tête unicellulaire ; des poils sécréteurs, à pied long, bosselé et à tête unicellulaire, séparés du pédoncule par une cellule intermédiaire à cuticule lisse, certains de ces poils présentent une couronne de petites cellules sphéroïdales juste en-dessous du point d'insertion de la cellule intermédiaire sur le pédoncule ; des fragments d'épiderme papilleux de la face intérieure des pétales ; des fragments d'épiderme du calice à cellules à parois sinueuses et renfermant des cristaux prismatiques d'oxalate de calcium ; des grains de pollen sphériques mesurant environ 45 µm de diamètre et ayant une exine avec 6 pores germinatifs en forme de fente et 6 arêtes en forme de ruban rayonnant à partir des pôles.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 0,5 g de fleur de lavande pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 5 mL d'*hexane R*, agitez pendant 5 min, puis filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 10 µL de *linalol R* et 10 µL d'*acétate de linalyle R* dans 5 mL d'*hexane R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente dans son tiers inférieur une bande bleu-gris (linalol) et dans son tiers médian une bande bleu-gris (acétate de linalyle). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente les bandes dues au linalol et à l'acétate de linalyle et en son milieu, entre ces bandes, une bande violet-rouge (époxydihydrocaryophyllène). D'autres bandes sont également présentes.

D. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai des autres espèces et variétés de lavande.

*Résultats* : les 5 pics principaux du chromatogramme obtenu avec la solution témoin sont semblables quant à leur temps de rétention à des pics du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner. Parmi ces pics, ceux du linalol et de l'acétate de linalyle sont majoritaires.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3 pour cent de tiges et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Autres espèces et variétés de lavande**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner.* Prélevez 0,2 mL du mélange huile essentielle-xylène obtenu dans le dosage et complétez à 5 mL avec de l'*hexane R*. Ajoutez 1 g de *sulfate de sodium anhydre R*, agitez et utilisez le surnageant.

*Solution témoin.* Dissolvez 0,1 g de *limonène R*, 0,2 g de *cinéole R*, 0,05 g de *camphre R*, 0,4 g de *linalol R*, 0,6 g d'*acétate de linalyle R* et 0,2 g d'*α-terpinéol R* dans 100 mL d'*hexane R*.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 60 m, Ø = 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R*.

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Rapport de division* : 1:100.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 15 | 70 |
| | 15 - 70 | 70 → 180 |
| Chambre à injection | | 220 |
| Détecteur | | 220 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : le même volume de chaque solution.

*Ordre d'élution* : ordre donné pour la préparation de la solution témoin. Notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au limonène et au cinéole,
– *nombre de plateaux théoriques* : au minimum 30 000, calculé pour le pic dû au limonène à 110 °C.

A l'aide des temps de rétention déterminés avec le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les 6 composants de la solution témoin. Ne tenez pas compte des pics dus à l'hexane et au xylène.

*Limite* :

– *camphre* : au maximum 1 pour cent.

**Eau** (*2.2.13*) : au maximum 100 mL/kg, déterminé sur 20,0 g de fleur de lavande.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 9,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez 20,0 g de fleur de lavande, un ballon à fond rond de 1000 mL et 500 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Introduisez 0,5 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 2 h.

**07/2010:1338**

# LAVANDE (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Lavandulae aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau, à partir des sommités fleuries de *Lavandula angustifolia* Mill. (*Lavandula officinalis* Chaix).

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, incolore ou jaune pâle.

*Odeur* : complexe, rappelant celle de l'acétate de linalyle.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Dissolvez 20 µL d'huile essentielle de lavande dans 1 mL de *toluène R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 10 µL de *linalol R*, 10 µL de *cinéole R* et 10 µL d'*acétate de linalyle R* dans 1 mL de *toluène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R*, *toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 2 µL] en bandes de 10 mm [ou 6 mm].

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 8 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min. Examinez immédiatement à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. De plus, d'autres bandes rouge-violet ou brun-vert sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner au-dessus de la bande de l'acétate de linalyle jusqu'au front du solvant.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande rouge-violet ou brun-vert |
| _______ | _______ |
| Acétate de linalyle : une bande violette ou brune | Une bande violette ou brune (acétate de linalyle) |
| | Une bande rouge-violet |
| _______ | _______ |
| 1,8-Cinéole : une bande brun-violet | Eventuellement, une bande brun-violet de faible intensité (1,8-cinéole) |
| Linalol : une bande violette ou brune | Une bande violette ou brune (linalol) |
| | Une bande brun-jaune faible |
| | Plusieurs bandes non résolues |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,878 à 0,892.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,455 à 1,466.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : – 12,5° à – 6,0°.

**Indice d'acide** (*2.5.1*) : au maximum 1,0, déterminé sur 5,0 g d'huile essentielle de lavande dissoute dans 50 mL du mélange de solvants prescrit.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner.* Dissolvez 200 µL d'huile essentielle de lavande dans de l'*heptane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 5 µL de *limonène R*, 5 µL de *cinéole R*, 5 µL de *3-octanone R*, 5 mg de *camphre R*, 40 µL de *linalol R*, 50 µL d'*acétate de linalyle R*, 10 µL de *terpinén-4-ol R*, 5 µL d'*acétate de lavandulyle R*, 5 µL de *lavandulol R* et 5 mg d'*α-terpinéol R* dans de l'*heptane R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 5 µL de *limonène R* dans de l'*heptane R* et complétez à 50,0 mL avec le même solvant. Prélevez 0,5 mL de solution et complétez à 5,0 mL avec de l'*heptane R*.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 60 m, Ø = 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur du film 0,25 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Rapport de division* 1:50.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 15 | 70 |
| | 15 - 70 | 70 → 180 |
| Chambre à injection | | 220 |
| Détecteur | | 220 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL.

*Ordre d'élution* : ordre indiqué pour la préparation de la solution témoin (a). Notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin (a) :

– *résolution* : au minimum 1,4 entre les pics dus au terpinén-4-ol et à l'acétate de lavandulyle.

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a), localisez les composants de la solution témoin (a) sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Déterminez la teneur pour cent de chacun de ces composants. Ces teneurs sont comprises entre les valeurs suivantes :

– *limonène* : au maximum 1,0 pour cent,
– 1,8-*cinéole* : au maximum 2,5 pour cent,
– *3-octanone* : 0,1 pour cent à 5,0 pour cent,
– *camphre* : au maximum 1,2 pour cent,
– *linalol* : 20,0 pour cent à 45,0 pour cent,
– *acétate de linalyle* : 25,0 pour cent à 47,0 pour cent,
– *terpinén-4-ol* : 0,1 pour cent à 8,0 pour cent,
– *acétate de lavandulyle* : au minimum 0,2 pour cent,
– *lavandulol* : au minimum 0,1 pour cent,
– *α-terpinéol* : au maximum 2,0 pour cent,
– *limite d'exclusion* : la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,05 pour cent).

**Pureté chirale**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,02 g d'huile essentielle de lavande dans du *pentane R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 µL de *linalol R* (mélange de (*R*)-linalol et de (*S*)-linalol), ajoutez 5 mg de *bornéol R* et 10 µL d'*acétate de linalyle R* (mélange d'acétate de (*R*)-linalyle et d'acétate de (*S*)-linalyle) dans du *pentane R* puis complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 25 m, Ø = 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *β-cyclodextrine modifiée pour chromatographie chirale R* (épaisseur du film 0,25 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,3 mL/min.

*Rapport de division* : 1:30.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 65 | 50 → 180 |
| Chambre à injection | | 230 |
| Détecteur | | 230 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL.

*Ordre d'élution* : (*R*)-linalol, (*S*)-linalol, bornéol, acétate de (*R*)-linalyle et acétate de (*S*)-linalyle ; selon les conditions opératoires et l'état de la colonne, le bornéol peut éluer avant ou après le (*S*)-linalol.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 5,5 entre les pics dus au (*R*)-linalol et au (*S*)-linalol ; au minimum 2,9 entre les pics dus au (*S*)-linalol et au bornéol et au minimum 2,0 entre les pics dus à l'acétate de (*R*)-linalyle et à l'acétate de (*S*)-linalyle.

Calculez la teneur pour cent en énantiomères (*S*) spécifiés à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_S}{A_S + A_R} \times 100$$

$A_S$ = surface du pic dû à l'énantiomère (*S*) correspondant,

$A_R$ = surface du pic dû à l'énantiomère (*R*) correspondant.

*Limites* :

– *(S)-linalol* : au maximum 12 pour cent,
– *acétate de (S)-linalyle* : au maximum 1 pour cent.

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

**07/2010:1439**

# LICHEN D'ISLANDE

## Lichen islandicus

DÉFINITION

Thalle séché, entier ou fragmenté, de *Cetraria islandica* (L.) Acharius s.l.

IDENTIFICATION

A. Le thalle, dont la longueur peut atteindre 15 cm, présente une dichotomie irrégulière ; il est composé de rubans, glabres, rigides, cassants, cannelés ou presque plats, d'une largeur de 0,3-1,5 cm et d'une épaisseur d'environ 0,5 mm, parfois dentelés avec la marge ciliée (pycnides). Sa face supérieure est verdâtre ou brun-vert ; sa face inférieure est blanc-gris ou brunâtre clair et présente des taches blanchâtres enfoncées (correspondant à des méats respiratoires). A l'extrémité des lobes terminaux on observe parfois, mais très rarement, des apothécies discoïdes brunes.

B. Réduisez le lichen d'Islande en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-gris. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : de nombreux fragments de pseudo-parenchyme composés d'hyphes à lumen étroit et paroi épaisse de l'assise externe et d'hyphes à large lumen de l'assise adjacente, formant un entrelacs lâche dans lequel, dans la zone médullaire, sont dispersées des cellules de l'algue verdâtres ou brunâtres et pouvant atteindre jusqu'à 15 µm de diamètre ; parfois quelques fragments de la partie marginale du thalle comportant des spermogonies tubulaires ou cylindriques, atteignant environ 160 µm en largeur et environ 400 µm en longueur.

C. A 1,0 g de lichen d'Islande pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL d'*eau R*, puis faites bouillir pendant 2-3 min. La solution brun-gris se gélifie après refroidissement et donne une coloration bleue par addition d'une solution d'*iode R*.

D. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de lichen d'Islande pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 5 mL d'*acétone R*, puis chauffez à reflux dans un bain-marie pendant 2-3 min. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg d'*anéthole R* et 5 mg d'*acide caféique R* dans 2 mL d'*acétone R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 μm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 μm)].

*Phase mobile* : *acétone R, méthanol R, acide formique anhydre R, toluène R* (5:5:10:80 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 20 μL [ou 4 μL] de solution à examiner et 10 μL [ou 2 μL] de solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R*. Chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min et examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande bleu-gris |
| Anéthole : une bande bleue ou violet-bleu | |
| _______ | _______ |
| | 2 bandes bleu-gris de faible intensité |
| | Une bande brun-gris ou grise de faible intensité |
| _______ | _______ |
| | Une bande violet-gris |
| Acide caféique : une bande bleu-gris | |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent.

**Plomb** (*2.4.27*) : au maximum 10,0 ppm.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de lichen d'Islande pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 3,0 pour cent.

**Indice de gonflement** (*2.8.4*) : au minimum 4,5, déterminé sur le lichen d'Islande pulvérisé (355) (*2.9.12*).



**01/2008:2148**
**corrigé 7.0**

# LIERRE (FEUILLE DE)

## Hederae folium

DÉFINITION

Feuilles séchées, entières ou fragmentées d'*Hedera helix* L., récoltées au printemps.

*Teneur* : au minimum 3,0 pour cent d'hédéracoside C ($C_{59}H_{96}O_{26}$ ; $M_r$ 1221) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Les feuilles entières mesurent 4-10 cm de long et de large, sont coriaces et cordées à la base. Le limbe palmatilobé comporte 3-5 lobes plus ou moins triangulaires, à bords entiers. La face supérieure est vert sombre avec une nervation rayonnante plus claire, la face inférieure est plutôt vert-gris, avec une nervation distinctement saillante. Le pétiole, long et cylindrique, d'un diamètre d'environ 2 mm, est parcouru de sillons longitudinaux. Des poils blancs épars sont présents sur le pétiole et à la surface des jeunes feuilles. Les feuilles plus âgées sont glabres. Quelques feuilles entières provenant des rameaux florifères, de forme ovale-rhomboïdale à lancéolée, d'une longueur de 3-8 cm, peuvent être présentes.

B. Réduisez la feuille de lierre en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est verte. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments du limbe, vus de face, montrant des cellules de l'épiderme supérieur et de l'épiderme inférieur, à parois anticlinales épaissies, plus ou moins sinueuses, à cuticule épaisse ; de nombreux stomates, présents uniquement sur l'épiderme inférieur, généralement de type anomocytique ou parfois anisocytique (*2.8.3*), entourés de cellules dont certaines présentent de légères stries cuticulaires ; parfois des poils tecteurs dispersés, en forme d'étoile composée de 4-8 branches unicellulaires se rejoignant à la base ; des fragments du limbe, vus en section transversale, faisant apparaître 1-3 (généralement 2) assises de cellules palissadiques et un mésophylle lacuneux très poreux contenant quelques grandes cellules mucilagineuses ; des macles d'oxalate de calcium, d'un diamètre d'environ 40 μm, présentes dans tout le mésophylle ; des amas de tissu fibrovasculaire lignifié provenant des nervures.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Procédez à une extraction de 0,50 g de feuille de lierre pulvérisée (355) (*2.9.12*) avec 5 mL de *méthanol R*. Chauffez à reflux au bain-marie à 60 °C pendant 30 min. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 1,0 mg d'*hédéracoside C R* et 1,0 mg d'*α-hédérine R* dans 1,0 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, acétone R, méthanol R, acétate d'éthyle R* (4:20:20:30 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 20 μL en bandes de 15 mm.

*Développement* : sur un parcours de 12 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez de la *solution alcoolique d'acide sulfurique R* et chauffez à 110 °C pendant 10 min ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande verte |
| _______ | _______ |
| α-Hédérine : une bande pourpre | Une bande pourpre très pâle (α-hédérine) |
| | Une large bande jaune |
| | 2-3 bandes pourpres ou vertes |
| _______ | _______ |
| Hédéracoside C : une bande pourpre | Une bande pourpre (hédéracoside C) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 10 pour cent d'éléments décolorés, au maximum 10 pour cent de tiges et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de feuille de lierre pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Mélange de solvants* : *eau R, méthanol R* (20:80 *V/V*).

*Solution à examiner*. Introduisez 1,00 g de feuille de lierre pulvérisée (355) (*2.9.12*) dans un ballon à fond rond de 250 mL et ajoutez 50 mL du mélange de solvants. Chauffez à reflux au bain-marie à 80 °C pendant 1 h. Refroidissez et filtrez à travers un tampon de coton hydrophile, en recueillant le filtrat dans une fiole jaugée de 100 mL. Ajoutez le tampon de coton hydrophile au résidu et extrayez à nouveau avec 30 mL du mélange de solvants, en chauffant à reflux pendant 30 min. Filtrez et réunissez les filtrats. Rincez le ballon et le tampon de coton hydrophile avec le mélange de solvants et utilisez le mélange de solvants pour compléter le contenu de la fiole jaugée à exactement 100,0 mL. Filtrez avant emploi sur une membrane appropriée.

*Solution témoin*. Dissolvez une quantité de *teinture titrée de feuille de lierre SCR* correspondant à 3,0 mg d'hédéracoside C dans du *méthanol R* et complétez à 5,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,125 m, Ø = 4 mm,

– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* approprié (5 µm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : mélangez 140 volumes d'*acétonitrile R* et 880 volumes d'*eau R* puis ajustez à pH 2,0 avec de l'*acide phosphorique R*,

– *phase mobile B* : *acide phosphorique R, acétonitrile R* (2:998 *V/V*),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 5 | 100 | 0 |
| 5 - 6 | 100 → 94 | 0 → 6 |
| 6 - 40 | 94 → 60 | 6 → 40 |
| 40 - 41 | 60 → 0 | 40 → 100 |
| 41 - 55 | 0 | 100 |

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 205 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *temps de rétention* : hédéracoside C = environ 20 min ; si nécessaire, ajustez les intervalles de temps du programme de gradient.

Calculez la teneur pour cent en hédéracoside C, par rapport à la drogue desséchée, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{F_1 \times m_2 \times 20 \times p}{F_2 \times m_1}$$

$F_1$ = surface du pic dû à l'hédéracoside C dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_2$ = surface du pic dû à l'hédéracoside C dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la drogue à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse de *teinture titrée de feuille de lierre SCR* utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en hédéracoside C dans la *teinture titrée de feuille de lierre SCR*.

**01/2008:0095**
**corrigé 6.0**

# LIN (GRAINE DE)

## Lini semen

DÉFINITION

Graines mûres et sèches de *Linum usitatissimum* L.

IDENTIFICATION

A. La graine est allongée, ovoïde, aplatie, avec un tégument brun-rouge foncé ou jaune, lisse et brillant. Les graines ont 4-6 mm de longueur, 2-3 mm de largeur et 1,5-2 mm d'épaisseur. Une des extrémités est arrondie et l'autre présente une pointe oblique près de laquelle le hile forme une légère dépression. Examinée à la loupe, la surface du tégument est finement ponctuée. A l'intérieur, le tégument présente un albumen étroit et blanchâtre et un embryon composé de 2 cotylédons larges, aplatis, jaunâtres et huileux ; la radicule est orientée vers le hile.

B. Réduisez la graine de lin en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est graisseuse au toucher. Examinée au microscope, en utilisant la *solution d'hydrate de chloral R*, la poudre présente : des cellules du tégument externe remplies de mucilage ; des fragments de l'assise collenchymateuse sous-jacente qui, vue de face, présente des cellules arrondies avec des espaces intercellulaires triangulaires, fréquemment associées à une assise de cellules scléreuses allongées aux parois parfois épaissies et ponctuées ; des cellules à parois minces ponctuées provenant de la couche hyaline souvent associées aux cellules scléreuses allongées qu'elles croisent perpendiculairement ; des cellules polygonales du tégument interne, modérément épaissies, pigmentées en orange-brun ; du parenchyme de l'albumen et des cotylédons contenant des grains d'aleurone et des gouttelettes d'huile.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 10 pour cent de graines mates et au maximum 1,5 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Indice de gonflement** (*2.8.4*) : au minimum 4.

**Cadmium** (*2.4.27*) : au maximum 0,5 ppm.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 8,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de graine de lin pulvérisée 355 (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 5,0 pour cent.

**01/2008:1233**
**corrigé 6.0**

# LIVÈCHE (RACINE DE)

## Levistici radix

DÉFINITION

Rhizome et racine séchés, entiers ou coupés de *Levisticum officinale* Koch.

*Teneur* : au minimum 4,0 mL/kg d'huile essentielle dans la drogue entière et au minimum 3,0 mL/kg d'huile essentielle dans la drogue coupée (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Le rhizome et les grosses racines sont souvent fendus longitudinalement. Le rhizome est court, atteignant jusqu'à 5 cm de diamètre, brun-gris clair ou brun-jaune, simple ou comportant plusieurs protubérances. Les racines, peu ramifiées, ont la même couleur que le rhizome ; leur épaisseur atteint habituellement 1,5 cm et leur longueur environ 25 cm. La cassure est généralement nette et montre une écorce très large, blanc-jaune et un bois étroit, jaune-brun.

B. Réduisez la racine de livèche en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune-brun. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des cellules du suber à contenu brun qui, vues de dessus, ont une forme polygonale ou arrondie ; un parenchyme abondant composé de cellules arrondies et à paroi fine pour la plupart, mais dont certaines ont une paroi plus épaisse ; des groupes de petits vaisseaux réticulés entourés de parenchyme non lignifié à cellules de petite taille ; des fragments de vaisseaux réticulés plus grands, de diamètre pouvant atteindre 125 µm ; des fragments de canaux sécréteurs de largeur pouvant atteindre 180 µm. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente des grains d'amidon simples, de forme arrondie ou ovoïde et mesurant environ 12 µm, et de nombreux grains composés de plus grande taille comportant souvent plusieurs éléments.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de la racine d'angélique.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
| --- | --- |
| _______ | _______ |
| Eugénol (marqué à 254 nm) | |
| | Une bande de fluorescence intense bleu pâle ou blanc |
| | Une bande de fluorescence intense bleu pâle ou blanc |
| Coumarine (marqué à 254 nm) | |
| _______ | _______ |
| | 1 ou 2 bandes de fluorescence moins intense bleu pâle ou blanc |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Racine d'angélique**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de racine de livèche fraîchement pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 5 mL de *méthanol R* et chauffez à ébullition pendant 30 s. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *coumarine R* et 25 µL d'*eugénol R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice* $F_{254}$ *pour CCM R*.

*Phase mobile* : *chlorure de méthylène R, toluène R* (50:50 *V/V*).

*Dépôt* : 20 µL, en bandes.

*Développement* : 2 fois sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm et marquez les bandes d'atténuation de fluorescence dues à la coumarine et à l'eugénol sur le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Examinez ensuite en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande de fluorescence bleu ou jaune dans le tiers inférieur.

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3 pour cent, déterminé sur 50 g de racine de livèche.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de racine de livèche pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 8,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 2,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez 40,0 g de racine de livèche pulvérisée (500) (*2.9.12*) immédiatement avant le dosage, un ballon de 2 L, 10 gouttes de *paraffine liquide R* et 500 mL *d'eau R* comme liquide d'entraînement. Introduisez 0,50 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 4 h.

**01/2008:2355**
**corrigé 7.0**

# MANDARINE (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Citri reticulatae aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue, par des moyens mécaniques appropriés, sans chauffage, à partir du zeste du fruit frais de *Citrus reticulata* Blanco.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide, verdâtre, jaune ou orange-rouge, présentant une fluorescence bleue.

Odeur caractéristique.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Prélevez 0,1 mL d'huile essentielle de mandarine et complétez à 1 mL avec du *toluène R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 2 µL de *N-méthylanthranilate de méthyle R*, 4 mg de *gaïazulène R* et 10 mg d'*α-terpinéol R* dans 10 mL de *toluène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (15:85 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 2 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats A* : la bande de fluorescence bleu intense du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à sa position et sa fluorescence à celle due au *N*-méthylanthranilate de méthyle dans le chromatogramme

obtenu avec la solution témoin. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

*Détection B* : pulvérisez une solution d'*acide phosphomolybdique R* à 200 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R* et chauffez à 100 °C pendant 10 min ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande bleue |
| Gaïazulène : une bande bleue | Une bande bleue |
| | Une bande bleue |
| _______ | _______ |
| | Une bande bleue |
| _______ | _______ |
| α-Terpinéol : une bande bleue | Une bande bleue (α-terpinéol) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention à ceux du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,848 à 0,855.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,474 à 1,478.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : + 64° à + 75°.

**Huiles grasses et huiles essentielles résinifiées** (*2.8.7*). L'huile essentielle de mandarine satisfait à l'essai.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner.* Prélevez 0,20 g d'huile essentielle de mandarine et complétez à 10,0 mL avec de l'*heptane R.*

*Solution témoin (a).* Prélevez 5 µL d'*α-pinène R,* 5 µL de *sabinène R,* 5 µL de *β-pinène R,* 5 µL de *β-myrcène R,* 5 µL de *p-cymène R,* 70 µL de *limonène R,* 20 µL d'*γ-terpinène R,* 5 µL de *N-méthylanthranilate de méthyle R* et complétez à 5,0 mL avec de l'*heptane R.*

*Solution témoin (b).* Dissolvez 5 µL de *limonène R* dans 50 mL d'*heptane R.* Prélevez 0,5 mL de cette solution et complétez à 5,0 mL avec de l'*heptane R.*

*Colonne* :
- *matériau* : silice fondue,
- *dimensions* : *l* = 60 m, Ø = 0,25 mm,
- *phase stationnaire* : *poly(diméthyl)(diphényl)siloxane R* (épaisseur du film 0,25 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R.*

*Débit* : 1,4 mL/min.

*Rapport de division* : 1:70.

*Température* :

| | **Intervalle (min)** | **Température (°C)** |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 90 | 50 → 230 |
| Chambre à injection | | 250 |
| Détecteur | | 250 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL.

*Ordre d'élution* : ordre donné pour la préparation de la solution témoin (a). Notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin (a) :
- *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au sabinène et au β-pinène et au minimum 1,5 entre les pics dus au *p*-cymène et au limonène.

*Identification des composants* : à l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a), localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les composants de la solution témoin (a). Ne tenez pas compte du pic dû à l'heptane.

Déterminez la teneur pour cent de chacun de ces composants. Ces teneurs sont comprises dans les valeurs suivantes :
- *α-pinène* : 1,6 pour cent à 3,0 pour cent,
- *sabinène* : au maximum 0,3 pour cent,
- *β-pinène* : 1,2 pour cent à 2,0 pour cent,
- *β-myrcène* : 1,5 pour cent à 2,0 pour cent,
- *p-cymène* : au maximum 1,0 pour cent,
- *limonène* : 65,0 pour cent à 75,0 pour cent,
- *γ-terpinène* : 16,0 pour cent à 22,0 pour cent,
- *N-méthylanthranilate de méthyle* : 0,30 pour cent à 0,60 pour cent,
- *limite d'exclusion* : la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b).

**Résidu à l'évaporation** (*2.8.9*) : 1,6 pour cent à 4,0 pour cent, déterminé après chauffage au bain-marie pendant 4 h.

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

**01/2008:1835**
**corrigé 6.0**

# MARRUBE BLANC (PARTIES AÉRIENNES FLEURIES DE)

## Marrubii herba

DÉFINITION

Parties aériennes fleuries séchées, entières ou fragmentées, de *Marrubium vulgare* L.

*Teneur* : au minimum 0,7 pour cent de marrubiine ($C_{20}H_{28}O_4$ ; $M_r$ 332,4) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Saveur amère.

IDENTIFICATION

A. Les tiges quadrangulaires peuvent atteindre 50 cm de longueur et 7 mm de largeur ; les jeunes tiges sont recouvertes d'abondants poils duveteux blanchâtres ; les tiges plus âgées sont gris-vert et les poils qui les recouvrent sont moins nombreux. Les feuilles les plus basses sont ovales allongées à sensiblement orbiculaires, les feuilles les plus hautes sont moins allongées ; toutes les feuilles sont pétiolées. Le limbe mesure 1,5-4 cm de longueur et 1-3,5 cm de largeur ; il présente une extrémité subaiguë, une base fuselée à quelque peu cordiforme, des bords dentés à crénelés ; le pétiole peut atteindre 3 cm de longueur ; la nervation est pennée, proéminente à la face inférieure et nettement déprimée à la face supérieure. Les feuilles sont recouvertes de poils blancs, fins et d'aspect laineux, plus abondants sur la face inférieure, les poils recouvrant la face supérieure vert-gris foncé des feuilles les plus âgées étant moins nombreux. Les fleurs sont petites, sessiles et forment des amas denses, axillaires. Le calice, persistant, mesure 5 mm de longueur et comporte des épines recourbées, situées en marge et qui se terminent en crochet, 5 épines

Drogues végétales

longues alternant avec 5 épines courtes ; la gorge du calice comporte un anneau interne de poils longs et soyeux ; la corolle à 4 lobes, blanc terne, mesure 7 mm de longueur, le lobe supérieur est bilabié, le lobe inférieur trilabié ; les 4 étamines sont courtes ; le style a un stigmate bifide.

B. Réduisez la drogue à examiner en poudre (710) (*2.9.12*). La poudre est vert-gris. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de feuilles composés de cellules épidermiques sinueuses, polygonales, de stomates du type diacytique (*2.8.3*) plus nombreux sur la surface inférieure et de cellules du mésophylle avec de petites aiguilles et des cristaux d'oxalate de calcium ; de très nombreux poils tecteurs, tordus ou vrillés, de 100-200 µm de long, unicellulaires ou pluricellulaires, unisériés et composés de 2-6 cellules, à jonctions renflées ; des poils en bouquet de 2 types, l'un avec 15-20 branches prenant naissance sur un pied court unicellulaire et l'autre, sessile, aux branches moins nombreuses ; des poils sécréteurs octocellulaires de type labiatae ; des poils secréteurs à pied unicellulaire ou bicellulaire et à tête unicellulaire à quadricellulaire ; des poils secréteurs de la face intérieure du calice atteignant jusqu'à 1000 µm de longueur, bicellulaires ou tricellulaires, fortement épaissis au niveau du renflement de l'articulation et à cellule distale allongée ; des grains de pollen sphériques d'environ 25 µm de diamètre, à exine lisse ; des fragments de tissu vasculaire provenant des tiges et des nervures.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner (a).* A 1,0 g de drogue pulvérisée (710) (*2.9.12*), ajoutez 2 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et 8 mL de *méthanol R*. Chauffez à reflux pendant 30 min, refroidissez et filtrez.

*Solution à examiner (b).* A 1,0 g de drogue pulvérisée (710) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Chauffez à reflux pendant 30 min, refroidissez et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 10 mg de *cholestérol R* et 10 mg de *gaïazulène R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *méthanol R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 20 µL [ou 5 µL] des solutions à examiner (a) et (b) et 10 µL [ou 2 µL] de solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution de *vanilline R* à 5 g/L dans un mélange de 20 volumes d'*éthanol à 96 pour cent R* et de 80 volumes d'*acide sulfurique R* puis examinez à la lumière du jour immédiatement après chauffage à 130 °C pendant 5-10 min.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et les solutions à examiner (a) et (b). Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans les chromatogrammes obtenus avec les solutions à examiner (a) et (b). La bande due à la marrubiine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a) est plus intense que celle du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b). La pré-marrubiine se transforme en marrubiine lors de l'extraction par l'acide chlorhydrique et le méthanol donnant ainsi une bande plus intense.

| **Haut de la plaque** | | |
|---|---|---|
| Gaïazulène : une bande violet-rouge | Une bande violet-bleu | Une bande violet-bleu |
| _______ | | _______ |
| | Une bande violet-bleu | Une bande violet-bleu |
| _______ | | _______ |
| Cholestérol : une bande violet-bleu | Une bande violet-bleu intense (marrubiine) | Une bande violet-bleu (marrubiine) |
| | Une bande violet-bleu | Une bande violet-bleu |
| | Une bande violet-bleu | Une bande violet-bleu |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner (a)** | **Solution à examiner (b)** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (710) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 15,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 3,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Réduisez 50 g de drogue à examiner en poudre (250) (*2.9.12*) et homogénéisez. Dans un ballon à fond rond de 50 mL, introduisez 1,00 g de la drogue pulvérisée et 15 mL d'un mélange de 2 volumes d'*acide chlorhydrique dilué R* et de 8 volumes de *méthanol R*. Chauffez à reflux dans un bain marie à 80 °C pendant 30 min. Laissez refroidir à température ambiante et filtrez sur un tampon de coton dans une fiole jaugée de 25 mL. Complétez à 25,0 mL avec du *méthanol R* en rinçant le ballon à fond rond et le filtre.

*Solution témoin.* Dissolvez 2,0 mg de *marrubiine R* dans 10,0 mL de *méthanol R*.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4 mm,

– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acétonitrile R,*

– *phase mobile B* : prélevez 0,5 mL d'*acide phosphorique R* et complétez à 1000 mL avec de l'*eau R,*

| **Intervalle (min)** | **Phase mobile A (pour cent *V/V*)** | **Phase mobile B (pour cent *V/V*)** |
|---|---|---|
| 0 → 15 | 40 → 90 | 60 → 10 |
| 15 → 20 | 90 → 40 | 10 → 60 |
| 20 → 25 | 40 | 60 |

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 217 nm.

*Injection* : 20 µL.

Localisez le pic dû à la marrubiine en comparant avec le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

Calculez la teneur pour cent en marrubiine, à l'aide de l'expression :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 2,5}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à la marrubiine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à la marrubiine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la drogue à examiner, en milligrammes,

$m_2$ = masse de *marrubiine R,* en milligrammes,

$p$ = teneur pour cent en marrubiine de la *marrubiine R*.

**01/2008:1876**

# MASTIC

## Mastix

DÉFINITION

Exsudat résineux séché obtenu à partir des tiges et des branches de *Pistacia lentiscus* L. var. *latifolius* Coss.

*Teneur* : au minimum 10 mL/kg d'huile essentielle (drogue anhydre).

IDENTIFICATION

A. Petits fragments vitreux non uniformes, durs, translucides ou opaques, sphériques ou piriformes, de couleur jaune clair à jaune-vert.

B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Dissolvez 1 g de mastic dans 10 mL de *chlorure de méthylène R,* puis filtrez après 1-2 min.

*Solution témoin.* Dissolvez 25 mg d'*eugénol R* et 25 mg de *bornéol R* dans 3 mL de *chlorure de méthylène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *éther de pétrole R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 1 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez du *réactif à la vanilline R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5 min.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de diverses couleurs peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande violette |
| _______ | _______ |
| | Une bande violet pâle |
| | Une bande violet très pâle |
| _______ | _______ |
| Eugénol : une bande brune | Une bande bleue |
| Bornéol : une bande bleu-vert | Une bande violet-bleu |
| | Une bande violet foncé |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Indice d'acide** (*2.5.1*) : 50 à 70, déterminé sur 1,0 g de mastic.

**Eau** (*2.2.13*) : au maximum 10 mL/kg, déterminé sur 25,0 g de mastic réduit en poudre grossière (1400) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 0,5 pour cent.

DOSAGE

**Huile essentielle** (*2.8.12*). Utilisez 20,0 g de mastic réduit en poudre grossière (1400) (*2.9.12*) juste avant la détermination, un ballon à fond rond de 500 mL et 200 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Ajoutez 0,50 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 2 h.

CONSERVATION

Ne pas réduire en poudre.

**01/2008:1544**

# MATRICAIRE (EXTRAIT FLUIDE DE)

## Matricariae extractum fluidum

DÉFINITION

Extrait fluide produit à partir de *Fleur de matricaire (0404).*

*Teneur* : au minimum 0,30 pour cent d'huile résiduelle bleue.

PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée à la préparation des extraits fluides, avec un mélange de 2,5 volumes d'une solution d'ammoniaque ($NH_3$) à 10 pour cent *m/m*, de 47,5 volumes d'eau et de 50 volumes d'éthanol à 96 pour cent.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, brunâtre.

Odeur intense caractéristique et saveur amère caractéristique.

*Solubilité* : miscible à l'eau et à l'éthanol à 96 pour cent avec formation d'un trouble, soluble dans l'éthanol à 50 pour cent *V/V*.

IDENTIFICATION

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Introduisez 10 mL d'extrait fluide de matricaire dans une ampoule à décantation et agitez avec 2 fois 10 mL de *pentane R*. Réunissez les phases pentaniques, desséchez sur 2 g de *sulfate de sodium anhydre R* et filtrez. Evaporez le filtrat à siccité au bain-marie et reprenez le résidu par 0,5 mL de *toluène R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 4 mg de *gaïazulène R*, 20 mg de *(-)-α-bisabolol R* et 20 mg d'*acétate de bornyle R* dans 10 mL de *toluène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente plusieurs bandes d'atténuation de fluorescence, dont 2 bandes principales dans son tiers médian (ène-yne-dicycloéther).

*Détection B* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats B* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente, dans sa partie médiane, une intense bande de fluorescence bleue (herniarine).

*Détection C* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et examinez à la lumière du jour en chauffant à 100-105 °C pendant 5-10 min.

*Résultats C* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente une bande violet-rouge ou violet-bleu dans son tiers inférieur ((-)-α-bisabolol), une bande brun-jaune ou vert-gris dans son tiers médian (acétate de bornyle) et une bande rouge ou violet-rouge dans son tiers supérieur (gaïazulène). Le chromatogramme obtenu avec la solution

à examiner présente, dans son tiers inférieur : des bandes brun-jaune ou jaune-vert et violettes ; une bande violet-rouge ou violet-bleu due au (-)-α-bisabolol dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin ; une bande brunâtre (ène-yne-dicycloéther) semblable quant à sa position à la bande de l'acétate de bornyle dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin ; une bande rouge ou violet-rouge (chamazulène) correspondant à la bande du gaïazulène dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Juste au-dessus de cette bande se trouvent 1 ou 2 bandes bleues ou violet-bleu ; d'autres faibles bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Extrait fluide de matricaire.

*Solution témoin*. Dissolvez 1,0 mg d'*acide chlorogénique R*, 2,5 mg d'*hypéroside R* et 2,5 mg de *rutine R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, acide acétique glacial R, eau R, acétate d'éthyle R* (7,5:7,5:18:67 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez sur la plaque encore chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R* ; pulvérisez ensuite une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R* ; laissez sécher à l'air pendant environ 30 min et examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente dans sa partie médiane une bande de fluorescence bleu clair (acide chlorogénique), puis, au-dessous, une bande de fluorescence brun-jaune (rutine) surmontée d'une autre bande de fluorescence brun-jaune (hypéroside). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande de fluorescence brun-jaune correspondant à la bande de la rutine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, une bande de fluorescence bleu clair correspondant à la bande de l'acide chlorogénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, une bande de fluorescence brun-jaune semblable quant à sa position à la bande de l'hypéroside dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin ; il présente également, au-dessus de la bande de fluorescence brun-jaune, une bande de fluorescence verte surmontée de plusieurs bandes de fluorescence bleuâtre ou verdâtre et, près du front du solvant, une bande de fluorescence jaunâtre.

ESSAI

**Ethanol** (*2.9.10*) : 38 pour cent *V/V* à 53 pour cent *V/V*.

**Résidu sec** (*2.8.16*) : au minimum 12,0 pour cent.

DOSAGE

Dans un ballon à fond rond de 1000 mL, introduisez 20,0 g d'extrait fluide de matricaire, ajoutez 300 mL d'*eau R* et distillez en recueillant le distillat dans un flacon, jusqu'à obtention d'un volume de 200 mL. Transvasez le distillat dans une ampoule à décantation. Dissolvez 65 g de *chlorure de sodium R* dans le distillat et agitez avec 3 fois 30 mL de *pentane R* utilisé au préalable pour rincer le réfrigérant à reflux et le flacon. Réunissez les phases pentaniques, desséchez sur 2 g de *sulfate de sodium anhydre R* et filtrez en recueillant le filtrat dans un ballon à fond rond de 100 mL taré, préalablement séché au dessiccateur pendant 3 h. Lavez le sulfate de sodium anhydre et le filtre avec 2 fois 20 mL de *pentane R*. Evaporez le pentane en chauffant dans un bain-marie à 45 °C, puis éliminez le résidu de pentane sous un courant d'air, pendant 3 min. Séchez le ballon au dessiccateur pendant 3 h et pesez. L'huile résiduelle est bleue (chamazulène).



**01/2008:0404**

# MATRICAIRE (FLEUR DE)

## Matricariae flos

DÉFINITION

Capitules secs de *Matricaria recutita* L. (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert).

*Teneur* :

– *huile essentielle bleue* : au minimum 4 mL/kg (drogue desséchée),
– *apigénine-7-glucoside totale* ($C_{21}H_{20}O_{10}$) : au minimum 0,25 pour cent (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Capitules épanouis constitués par un involucre formé de nombreuses bractées disposées sur 1-3 rangées ; un réceptacle de forme conique allongée, rarement hémisphérique (capitules jeunes) ; 12-20 fleurons ligulés marginaux à languette blanche ; plusieurs dizaines de fleurons tubulés centraux, jaunes. Les bractées de l'involucre sont ovales à lancéolées ; leur bord est scarieux, gris-brun. Le réceptacle, de forme conique, est creux et sans paillettes. La corolle du fleuron ligulé présente un tube jaune-brun à la base, se prolongeant pour former une languette blanche, ovale, allongée. L'ovaire inférieur est brun foncé, ovale ou sphérique ; le style est long et le stigmate bifide. Le fleuron tubulé est jaune et composé d'une corolle à 5 dents ; l'androcée comporte 5 étamines épipétales synanthérées ; leur gynécée est semblable à celui des fleurons ligulés.

B. Séparez le capitule en ses différentes parties. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. Les bractées montrent un bord composé de cellules à parois fines avec de rares stomates (*2.8.3*) et une partie centrale composée de cellules scléreuses allongées. L'épiderme interne de la corolle des fleurons ligulés est constitué de cellules polygonales à parois fines, légèrement papilleuses ; les cellules de l'épiderme externe étant nettement sinueuses et fortement striées ; la corolle des fleurons tubulés est composée de cellules épidermiques allongées dans le sens de l'axe et présentant de petits groupes de papilles à proximité du sommet des lobes. Des poils glanduleux composés d'un pédicelle court et d'une tête formée de 2-3 paires de cellules superposées sont présents sur la face externe des bractées et sur les corolles des 2 types de fleurons. Les ovaires comportent, à la base, un anneau scléreux et leur paroi est composée de bandes verticales de cellules à parois fines, allongées dans le sens de l'axe, avec de nombreux poils glanduleux, alternant avec des groupes fusiformes de petites cellules allongées radialement, et contenant du mucilage. Les cellules s'étendent à l'extrémité des stigmates pour former des papilles arrondies. De nombreuses petites macles d'oxalate de calcium apparaissent dans les tissus internes des ovaires et dans les lobes des anthères. Des grains de pollen, d'un diamètre d'environ 30 µm, sphériques ou triangulaires, présentent 3 pores et une exine échinulée.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 50 µL d'huile essentielle obtenue lors du dosage de l'huile essentielle, dans 1 mL de *xylène R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 2 µL de *chamazulène R*, 5 µL de *(−)-α-bisabolol R* et 10 mg d'*acétate de bornyle R* dans 5 mL de *toluène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min ; examinez immédiatement à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | 1 ou 2 bandes bleues ou violet-bleu |
| Chamazulène : une bande rouge ou violet-rouge | Une bande rouge ou violet-rouge (chamazulène) |
| _______ | _______ |
| Acétate de bornyle : une bande brun-jaune | |
| | Une bande brune (ène-yne-dicycloéther) |
| _______ | _______ |
| (–)-α-Bisabolol : une bande violet-rouge ou violet-bleu | Une bande violet-rouge ou violet-bleu ((–)-α-bisabolol) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Drogue brisée** : au maximum 25 pour cent de constituants, déterminé sur 20,0 g de drogue entière passant à travers un tamis (710) (*2.9.12*).

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 13,0 pour cent.

DOSAGE

**Huile essentielle** (*2.8.12*). Utilisez 30 g de drogue entière, un ballon de 1000 mL et 300 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Introduisez 0,50 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 3-4 mL/min pendant 4 h. A la fin de la distillation, arrêtez le flux d'eau vers la chambre de condensation et poursuivez la distillation jusqu'à ce que les composants bleus, entraînés par la vapeur, aient atteint la base du réfrigérant. Reprenez immédiatement la réfrigération, pour éviter de chauffer l'espace de séparation. Arrêtez la distillation après 10 min supplémentaires.

**Apigénine-7-glucoside totale**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Réduisez 40 g de drogue en poudre (500) (*2.9.12*). Introduisez 2,00 g de drogue pulvérisée dans un ballon à fond rond de 500 mL. Ajoutez 200 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Chauffez le mélange à reflux au bain-marie pendant 15 min. Refroidissez et filtrez. Rincez le filtre et le résidu avec quelques millilitres d'*éthanol à 96 pour cent R*. Ajoutez au filtrat 10 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* récemment préparée. Chauffez le mélange à reflux au bain-marie pendant environ 1 h. Refroidissez. Complétez à 250,0 mL avec de l'*éthanol à 96 pour cent R*. A 50,0 mL de solution, ajoutez 0,5 g d'*acide citrique R*. Agitez pendant 5 min et filtrez. Prélevez 5,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile (mélange initial).

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 10,0 mg d'*apigénine-7-glucoside R* dans 100,0 mL de *méthanol R*. Prélevez 25,0 mL de cette solution et complétez à 200,0 mL avec la phase mobile (mélange initial).

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 10,0 mg de *5,7-dihydroxy-4-méthylcoumarine R* dans 100,0 mL de *méthanol R*. Prélevez 25,0 mL de solution et complétez à 100,0 mL avec la phase mobile (mélange initial). A 4,0 mL de cette solution, ajoutez 4,0 mL de solution témoin (a) et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile (mélange initial).

*Précolonne* :

– *dimensions* : $l$ = 8 mm, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acide phosphorique R*, *eau R* (0,5:99,5 *V/V*),
– *phase mobile B* : *acide phosphorique R*, *acétonitrile R* (0,5:99,5 *V/V*),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 9 | 75 | 25 |
| 9 - 19 | 75 → 25 | 25 → 75 |
| 19 - 24 | 25 | 75 |

*Débit* : 1 mL/min.

*Détecteur* : spectrophotomètre à 340 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Conformité du système* : solution témoin (b) :

– *résolution* : au minimum 1,8 entre les pics dus à l'apigénine-7-glucoside et à la 5,7-dihydroxy-4-méthylcoumarine.

Calculez la teneur pour cent en apigénine-7-glucoside totale à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2}{A_2 \times m_1} \times P \times 0,625$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'apigénine-7-glucoside dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'apigénine-7-glucoside dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la drogue dans la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse d'*apigénine-7-glucoside R* dans la solution témoin (a), en grammes,

$P$ = teneur pour cent en apigénine-7-glucoside dans le réactif.

**01/2008:1836**

# MATRICAIRE (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Matricariae aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle bleue obtenue par entraînement à la vapeur d'eau, à partir des capitules ou des sommités florifères, frais ou séchés, de *Matricaria recutita* L. (*Chamomilla recutita* L. Rauschert). Il existe 2 types d'huile essentielle de matricaire, caractérisés comme étant riche en oxydes de bisabolol ou riche en (–)-α-bisabolol.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide visqueux limpide, d'un bleu intense.

Forte odeur caractéristique.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 20 µL d'huile essentielle de matricaire dans 1,0 mL de *toluène R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 2 mg de *gaïazulène R*, 5 µL de *(–)-α-bisabolol R* et 10 mg d'*acétate de bornyle R* dans 5,0 mL de *toluène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R*, *toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez à la lumière du jour.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Gaïazulène : une bande bleue | Une bande bleue (chamazulène) |
| _______ | _______ |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez de la solution d'*aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min. Examinez immédiatement à la lumière du jour.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, des bandes brun-jaune à jaune-vert (tiers inférieur), des bandes violettes (tiers inférieur) et d'autres faibles bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | 1 ou 2 bandes bleues à violet-bleu |
| Gaïazulène : une bande rouge à violet-rouge | Une bande rouge à violet-rouge (chamazulène) |
| _______ | _______ |
| Acétate de bornyle : une bande brun-jaune à vert-gris | Une bande brunâtre (ène-yne-dicycloéther) |
| _______ | _______ |
| (–)-α-Bisabolol : une bande violet-rouge à violet-bleu | Une bande violet-rouge à violet-bleu ((–)-α-bisabolol) |
| | Une bande brunâtre |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques dus au (–)-α-bisabolol et au chamazulène dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

## ESSAI

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. Dissolvez 20 µL d'huile essentielle de matricaire dans du *cyclohexane R* et complétez à 5,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 20 µL de *(–)-α-bisabolol R*, 5 mg de *chamazulène R* et 6 mg de *gaïazulène R* dans du *cyclohexane R* et complétez à 5,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

- *matériau* : silice fondue,
- *dimensions* : *l* = 30 m (une épaisseur de film de 1 µm peut être utilisée) à 60 m (une épaisseur de film de 0,2 µm peut être utilisée), Ø = 0,25-0,53 mm ; l'utilisation d'une colonne d'une longueur supérieure à 30 m, peut nécessiter un ajustement du programme de température,
- *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R*.

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1-2 mL/min.

*Rapport de division* : 1:100.

*Température* :

| | **Intervalle (min)** | **Température (°C)** |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 40 | 70 → 230 |
| | 40 - 50 | 230 |
| Chambre à injection | | 250 |
| Détecteur | | 250 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1,0 µL.

*Ordre d'élution* : ordre donné pour la préparation de la solution témoin. Notez les temps de rétention de ces substances.

*Rétention relative* par rapport au chamazulène (temps de rétention = environ 34,4 min) : β-farnésène = environ 0,5 ; oxyde de bisabolol B = environ 0,8 ; bisabolone = environ 0,87 ; (–)-α-bisabolol = environ 0,9 ; oxyde de bisabolol A = environ 1,02.

*Conformité du système* : solution témoin :

- *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au chamazulène et au gaïazulène.

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez le (–)-α-bisabolol et le chamazulène sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner. Localisez les oxydes de bisabolol (oxyde de bisabolol B, bisabolone et oxyde de bisabolol A) à l'aide des figures 1836.-1 et 1836.-2 (ne tenez pas compte du pic dû au cyclohexane). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de pic au temps de rétention du gaïazulène.

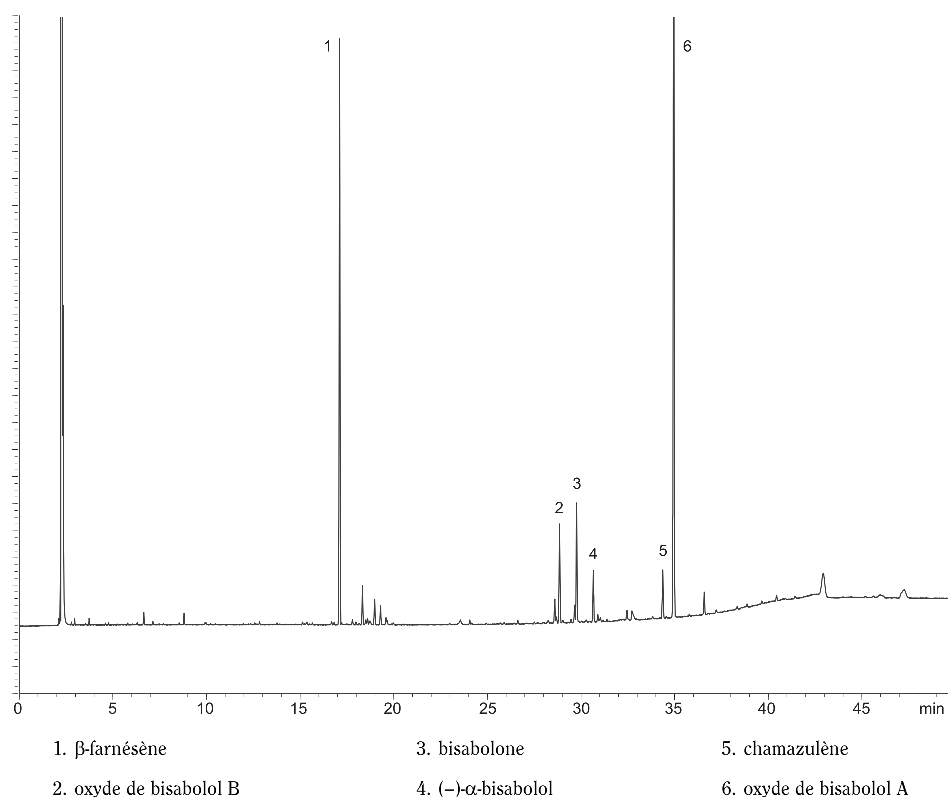
Déterminez la teneur pour cent des composants. Ces teneurs sont comprises dans les limites suivantes.

| | **Huile essentielle de matricaire riche en oxydes de bisabolol (pour cent)** | **Huile essentielle de matricaire riche en (–)-α-bisabolol (pour cent)** |
|---|---|---|
| Oxydes de bisabolol | 29 - 81 | |
| (–)-α-Bisabolol | | 10 - 65 |
| Chamazulène | ≥ 1,0 | ≥ 1,0 |
| Total des oxydes de bisabolol et (–)-α-Bisabolol | | ≥ 20 |

## CONSERVATION

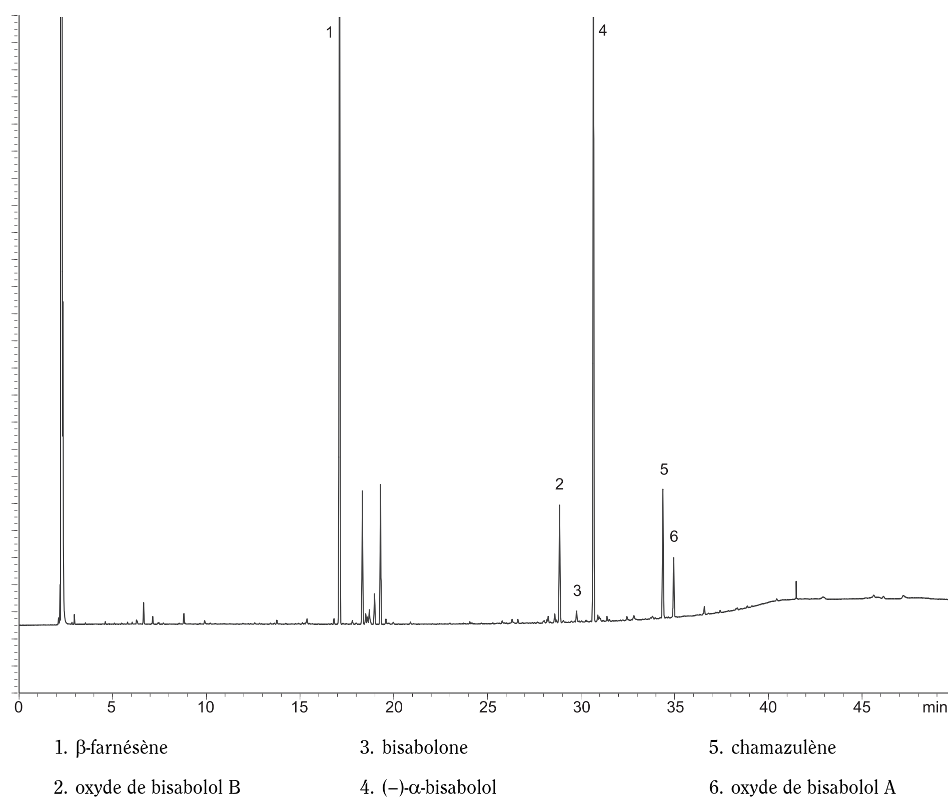
A une température ne dépassant pas 25 °C.

Drogues végétales




1. β-farnésène
2. oxyde de bisabolol B
3. bisabolone
4. (–)-α-bisabolol
5. chamazulène
6. oxyde de bisabolol A

Figure 1836.-1. – *Chromatogramme de l'huile essentielle de matricaire riche en oxydes de bisabolol*




1. β-farnésène
2. oxyde de bisabolol B
3. bisabolone
4. (–)-α-bisabolol
5. chamazulène
6. oxyde de bisabolol A

Figure 1836.-2. – *Chromatogramme de l'huile essentielle de matricaire riche en (–)-α-bisabolol*

Drogues végétales

**01/2009:2391**

# MAUVE (FEUILLE DE)

## Malvae folium

DÉFINITION

Feuille séchée, entière ou fragmentée, de *Malva sylvestris* L., de *Malva neglecta* Wallr. ou d'un mélange des 2 espèces.

IDENTIFICATION

A. Les feuilles de *M. sylvestris* mesurent jusqu'à 12 cm de longueur et 15 cm de largeur, comportent 3, 5 ou 7 lobes et sont sinueuses à la base ; les feuilles de *M. neglecta* mesurent jusqu'à 9 cm de longueur et de largeur, sont de forme arrondie ou réniforme, avec 5-7 lobes indistincts. Dans les 2 espèces, les feuilles présentent des bords dentés irréguliers et sont vertes ou vert-brun. Le limbe présente sur la face abaxiale une pilosité plus importante et une nervation plus proéminente que sur la face adaxiale. Les nervures principales de la face supérieure de la feuille et du pétiole peuvent être violettes. Le pétiole est aussi long que la feuille, mesure jusqu'à 2 mm de largeur, est arrondi et légèrement aplati et présente de discrets sillons longitudinaux verts ou vert-brun, ou violets. La drogue fragmentée se compose de fragments de feuilles froissés, parfois agglomérés, à nervation proéminente.

B. Réduisez la feuille de mauve en poudre (710) (*2.9.12*). La poudre est verte ou vert-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments, vus de face, de l'épiderme inférieur et de l'épiderme supérieur du limbe, à parois anticlinales droites ou plus ou moins sinueuses ; des stomates, principalement anisocytiques (*2.8.3*), présents sur les 2 faces ; des fragments de longs poils tecteurs à parois épaissies, effilés en pointe à l'apex, généralement unicellulaires mais parfois en bouquets de 2-8 éléments, tous fortement ponctués à la base, chez *M. sylvestris* ; des poils glanduleux en massue composés de 2-4 cellules, présents dans les 2 espèces ; des fragments de mésophylle constitués de parenchyme palissadique et de cellules du parenchyme lacuneux contenant du mucilage et des macles d'oxalate de calcium ; quelques grains de pollen sphériques, d'un diamètre de 130-170 µm, à exine échinulée.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 2,0 g de drogue pulvérisée (710) (*2.9.12*), ajoutez 20 mL d'une solution à 80 pour cent *V/V* de *tétrahydrofurane R*. Procédez à l'extraction pendant 10 min aux ultrasons, puis filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 3 mg de *rutine R* et 3 mg d'*hypéroside R* dans 20 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, acide acétique anhydre R, eau R, formiate d'éthyle R, 3-pentanone R* (4:11:14:20:50 *V/V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 4 µL] en bandes de 10 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 10-12 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : chauffez à 100 °C pendant 10 min ; exposez la plaque encore chaude, par pulvérisation ou immersion, à une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R*. Eliminez le solvant sous un courant d'air froid. Exposez la plaque, par pulvérisation ou immersion, à une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R*. Séchez à l'air et examinez après 15 min en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes de fluorescence présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| Hypéroside : une bande de fluorescence jaune | |
| | Une bande de fluorescence jaune |
| ——— | ——— |
| Rutine : une bande de fluorescence jaune | |
| | Une bande de fluorescence jaune |
| | Une bande de fluorescence bleu clair |
| | Une bande de fluorescence orange |
| | Une bande de fluorescence orange |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent d'organes étrangers, au maximum 5 pour cent de feuilles portant des pustules remplies de spores de *Puccinia malvacearum* et au maximum 2 pour cent d'éléments étrangers.

Les organes étrangers peuvent être des fleurs, des fruits ou des parties de la tige. Les pustules remplies de spores présentes sur les feuilles mesurent généralement 1 mm de largeur et sont rouges ou brunes. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. Les spores de *Puccinia malvacearum* sont oblongs ou ovales, à paroi brunâtre et petit appendice.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (710) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 17,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 3,0 pour cent.

**Indice de gonflement** (*2.8.4*) : au minimum 7, déterminé sur 1,0 g de drogue pulvérisée (710) (*2.9.12*).

**01/2011:1541**

# MAUVE (FLEUR DE)

## Malvae sylvestris flos

DÉFINITION

Fleur séchée, entière ou fragmentée, de *Malva sylvestris* L. ou de ses variétés cultivées.

IDENTIFICATION

A. La fleur de mauve possède un calicule à 3 pièces oblongues ou elliptiques-lancéolées, plus courtes que celles du calice et situées immédiatement en-dessous de celui-ci. Les 5 lobes du calice, gamosépale à la base, sont pubescents et largement triangulaires. La corolle, 3-4 fois plus longue que le calice, est constituée par 5 pétales. Les pétales cunéiformes, soudés à la base au tube staminal, sont échancrés sur leur bord supérieur. Les étamines nombreuses, soudées par leur filet, forment un tube staminal couvert de petits poils en étoile parfois mêlés à des poils simples, visibles à la loupe. Les carpelles, nombreux, ridés, glabres ou parfois pubescents,

Drogues végétales

sont cachés par le tube staminal et rangés en cercle autour d'un style central terminé par de nombreux stigmates filiformes. Dans les variétés cultivées, le nombre des pièces florales est de 3-7 pour le calicule, de 5-8 pour le calice et de 5-10 pour la corolle.

B. Réduisez la fleur de mauve en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est gris-bleu. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants (figure 1541.-1) : des poils tecteurs flexueux, unicellulaires, à parois épaisses, provenant du calice et du calicule et mesurant jusqu'à 2 mm de long, entiers [L] ou, le plus souvent, fragmentés [Q] ; des fragments de l'épiderme des sépales vu de face [D, J] portant des stomates anomocytiques (*2.8.3*) [Dc], des poils sécréteurs en massue à tête multicellulaire [Db] et des poils tecteurs courts, unicellulaires, plus ou moins courbés, isolés [J], ou groupés par 2-6 en étoile [Da] ; des fragments de poils tecteurs [N] ; des poils sécréteurs isolés, vus de face [F] ; ou en section transversale [G] ; des fragments du mésophylle du calice ou du calicule dont les cellules contiennent de petites macles d'oxalate de calcium [K] ; des nervures des sépales [P] avec des vaisseaux [Pa] accompagnés de cellules contenant des macles d'oxalate de calcium [Pb] ; des fragments de l'épiderme des pétales, à cellules allongées à bords sinueux, étroites dans l'espèce sauvage [A], plus courtes et plus larges dans les variétés cultivées [B], portant des poils sécréteurs sessiles, à tête pluricellulaire en massue [Ba, C, E] ; des fragments du mésophylle des pétales [H] comportant de larges cellules à mucilage [Hc], parfois des cellules contenant de petites macles d'oxalate de calcium [Hb] et des vaisseaux spiralés [Ha] ; des grains de pollen sphériques, à exine grossièrement échinulée d'environ 150 μm de diamètre [M].

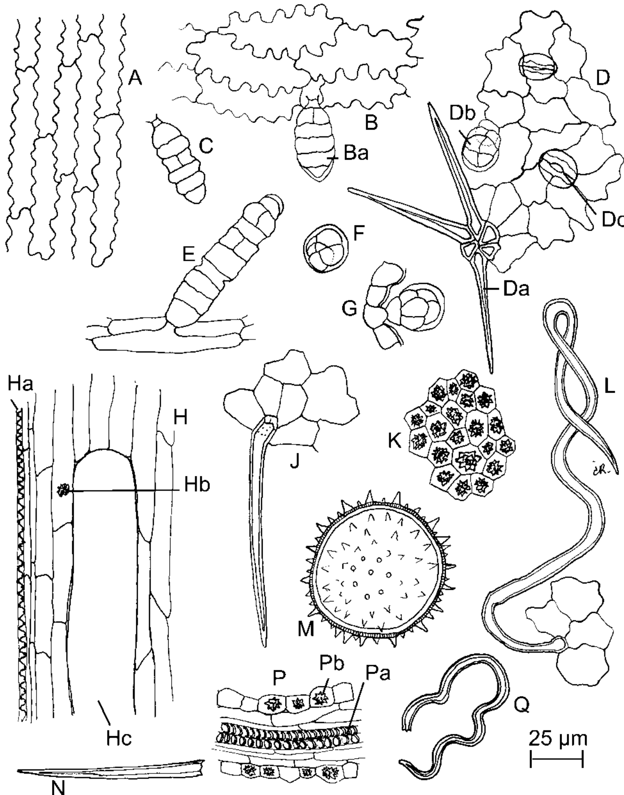



Figure 1541.-1.– *Dessin pour l'identification B de la fleur de mauve pulvérisée*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1 g de fleur de mauve pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL d'*éthanol à 60 pour cent V/V R*. Agitez pendant 15 min et filtrez.

*Solution témoin*. Solution de *rouge de quinaldine R* à 0,5 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, eau R, butanol R* (15:30:60 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 μL de solution à examiner et 5 μL de solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente une bande rouge-orange dans la partie supérieure de son 2e tiers. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente, au-dessous de la bande obtenue avec la solution témoin, 2 bandes violacées situées dans son 2e tiers ; la bande principale (6″-malonyl malvine) étant située juste au-dessous de l'autre bande violacée (malvine).

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de fleur de mauve pulvérisée.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 14,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 2,0 pour cent.

**Indice de gonflement** (*2.8.4*) : au minimum 15, déterminé sur 0,2 g de fleur de mauve pulvérisée (710) (*2.9.12*) et humectée avec 0,5 mL d'*éthanol anhydre R*.

**01/2008:1837**
**corrigé 7.0**

# MÉLALEUCA (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Melaleucae aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau à partir des feuilles et des tiges terminales de *Melaleuca alternifolia* (Maiden et Betch) Cheel, de *M. linariifolia* Smith, de *M. dissitiflora* F. Mueller et/ou d'autres espèces de *Melaleuca*.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, mobile, incolore ou jaune pâle.

Odeur caractéristique.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,1 mL d'huile essentielle de mélaleuca dans 5 mL d'*heptane R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 30 μL de *cinéole R*, 60 μL de *terpinén-4-ol R* et 10 mg d'*α-terpinéol R* dans 10 mL d'*heptane R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, heptane R* (20:80 *V/V*).

*Dépôt* : 10 μL, en bandes.

Drogues végétales

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R*. Chauffez en observant à 100-105 °C pendant 5-10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. De plus, d'autres bandes sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Cinéole : une bande brun-violet | Une bande brun-violet, de plus faible intensité (cinéole) |
| Terpinén-4-ol : une bande violet-brun | Une bande violet-brun (terpinén-4-ol) |
| α-Terpinéol : une bande violette ou violet-brun | Une bande violette ou violet-brun (α-terpinéol) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,885 à 0,906.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,475 à 1,482.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : + 5° à + 15°.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,15 mL d'huile essentielle de mélaleuca dans 10 mL d'*hexane R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 µL d'*α-pinène R*, 5 µL de *sabinène R*, 15 µL d'*α-terpinène R*, 5 µL de *limonène R*, 5 µL de *cinéole R*, 30 µL de *γ-terpinène R*, 5 µL de *p-cymène R*, 5 µL de *terpinolène R*, 60 µL de *terpinén-4-ol R*, 5 µL d'*aromadendrène R* et 5 mg d'*α-terpinéol R* dans 10 mL d'*hexane R*.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 30 m (une épaisseur du film de 1 µm peut être utilisée) à 60 m (une épaisseur du film de 0,2 µm peut être utilisée), Ø = 0,25-0,53 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R*.

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,3 mL/min.

*Rapport de division* : 1:50.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 1 | 50 |
| | 1 - 37 | 50 → 230 |
| | 37 - 45 | 230 |
| Chambre à injection | | 240 |
| Détecteur | | 240 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL.

*Ordre d'élution* : ordre indiqué pour la préparation de la solution témoin. Notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 2,7 entre les pics dus au terpinén-4-ol et à l'aromadendrène.

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez les composants de la solution témoin sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, ne tenez pas compte du pic dû à l'hexane.

Déterminez la teneur pour cent de ces composants. Ces teneurs sont comprises entre les valeurs suivantes :

– *α-pinène* : 1,0 pour cent à 6,0 pour cent,
– *sabinène* : au maximum 3,5 pour cent,
– *α-terpinène* : 5,0 pour cent à 13,0 pour cent,
– *limonène* : 0,5 pour cent à 4,0 pour cent,
– *cinéole* : au maximum 15,0 pour cent,
– *γ-terpinène* : 10,0 pour cent à 28,0 pour cent,
– *p-cymène* : 0,5 pour cent à 12,0 pour cent,
– *terpinolène* : 1,5 pour cent à 5,0 pour cent,
– *terpinén-4-ol* : au minimum 30,0 pour cent,
– *aromadendrène* : au maximum 7,0 pour cent,
– *α-terpinéol* : 1,5 pour cent à 8,0 pour cent.

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

**01/2008:2120**
**corrigé 6.0**

# MÉLILOT

## Meliloti herba

DÉFINITION

Partie aérienne séchée, entière ou fragmentée, de *Melilotus officinalis* (L.) Lam.

*Teneur* : au minimum 0,3 pour cent de coumarine ($C_9H_6O_2$ ; $M_r$ 146,1) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La tige du mélilot est verte, cylindrique, glabre et finement ridée. Les feuilles alternes et pétiolées sont trifoliées et possèdent 2 stipules lancéolées ; les folioles, qui mesurent jusqu'à 3 cm de long et 20 mm de large, sont de forme allongée à ovale et acuminées au sommet et à la base, avec un bord finement denté ; la face supérieure vert sombre est glabre, la face inférieure d'un vert plus pâle porte des poils fins et courts, notamment à la base. L'inflorescence racémeuse est constituée de nombreuses fleurs jaune pâle, d'une longueur d'environ 7 mm, comportant chacune un calice velu à 5 dents inégales profondément divisées et une corolle papilionacée. Le fruit est une gousse indéhiscente brun-jaune, courte et rétrécie à l'apex, à surface glabre et ridée transversalement, qui reste souvent incluse dans le calice.

B. Réduisez le mélilot en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de limbe foliaire vus de face présentant des cellules épidermiques légèrement sinueuses et irrégulièrement épaissies ainsi que de nombreux stomates pour la plupart anomocytiques (*2.8.3*) avec 3-6 cellules annexes ; des poils tecteurs unisériés formés de 2 courtes cellules basales à paroi lisse et d'une longue cellule terminale pliée à angle droit, à paroi épaisse et cuticule verruqueuse ; quelques poils glanduleux à court pédicelle de 2-3 cellules et

à tête ovoïde bisériée comportant 4 cellules indistinctes ; des fragments de pétales dispersés présentant des papilles ; des fragments de tissu vasculaire de la tige associés à des fibres cloisonnées, non lignifiées, contenant des prismes d'oxalate de calcium ; des fragments de l'assise fibreuse des anthères ; des grains de pollen sphériques à ovoïdes d'une longueur d'environ 25 µm, à 3 pores germinatifs et à exine lisse.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 0,3 g de mélilot pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 3 mL de *méthanol R*. Chauffez dans un bain-marie à 60 °C pendant 1 min. Filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 50 mg de *coumarine SCR* et 20 mg d'*acide o-coumarique R* dans 50 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : phase supérieure du mélange suivant : *acide acétique dilué R, éther R, toluène R* (10:50:50 *V/V/V*).

*Dépôt* : 25 µL en bandes de 10 mm.

*Développement* : sur un parcours de 12 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution alcoolique d'hydroxyde de potassium 2 M R* puis examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de couleurs diverses et de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Coumarine : une bande de fluorescence jaune-vert<br>——— | Une bande de fluorescence jaune-vert (coumarine)<br>——— |
| | Une bande de fluorescence bleue |
| Acide *o*-coumarique : une bande de fluorescence jaune-vert<br>——— | Une bande de fluorescence jaune-vert (acide *o*-coumarique) peut être présente<br>——— |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

## ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 2 pour cent de tiges d'un diamètre supérieur à 3 mm et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de mélilot pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

## DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Pulvérisez complètement environ 50 g de mélilot (500) (*2.9.12*). A 5,00 g de mélilot pulvérisé, ajoutez 90 mL de *méthanol R* et chauffez à reflux pendant 30 min. Laissez refroidir. Filtrez sous vide sur un filtre en fibre de verre. Reprenez le résidu et le filtre fragmenté par 90 mL de *méthanol R*. Traitez comme précédemment. Réunissez les filtrats et complétez à 250,0 mL avec du *méthanol R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 25,0 mg de *coumarine SCR* dans du *méthanol R* et complétez à 250,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : *acétonitrile R*, solution d'*acide phosphorique R* à 5 g/L (22:78 *V/V*).

*Débit* : 1,7 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 275 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Conformité du système* :

– *temps de rétention* : coumarine = environ 7,8 min.

Calculez la teneur pour cent en coumarine à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à la coumarine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à la coumarine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de mélilot dans la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse de *coumarine SCR* dans la solution témoin, en grammes.

**01/2011:1447**

# MÉLISSE (FEUILLE DE)

## Melissae folium

## DÉFINITION

Feuille séchée de *Melissa officinalis* L.

*Teneur* : au minimum 1,0 pour cent d'acide rosmarinique ($C_{18}H_{16}O_8$ ; $M_r$ 360,3) (drogue desséchée).

## CARACTÈRES

Odeur rappelant celle du citron.

## IDENTIFICATION

A. Les feuilles ont un pétiole de longueur variable ; le limbe est approximativement ovale, acuminé au sommet, en coeur ou arrondi à la base, sa longueur atteint 8 cm et sa largeur 5 cm ; les bords sont crénelés à dentés. La face supérieure est d'un vert intense, la face inférieure, d'un vert plus pâle, présente une nervure médiane très développée et une nervation proéminente, réticulée ; une pilosité éparse apparaît sur la face supérieure et le long des nervures sur la face inférieure qui est de plus finement ponctuée.

B. Réduisez la feuille de mélisse en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est verdâtre. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants (figure 1447.-1) : des fragments de l'épiderme supérieur, vus de face, à parois sinueuses [A, B, G], parfois accompagnés de parenchyme palissadique [Aa] ; des fragments de l'épiderme inférieur [D] portant des stomates de type diacytique (*2.8.3*) [Db] ; des poils tecteurs unicellulaires coniques, courts et droits, à cuticule finement striée, libres [E] ou sur un épiderme [Da] ; des poils tecteurs pluricellulaires, unisériés, à extrémité pointue, à cuticule épaisse et verruqueuse [C] ; des poils sécréteurs octocellulaires de type *lamiaceae*, vus de face [Ga] ; des poils sécréteurs à pied unicellulaire à tricellulaire et à tête unicellulaire ou bicellulaire plus rarement, vus de face [Ba] ou en section transversale [F].

Drogues végétales

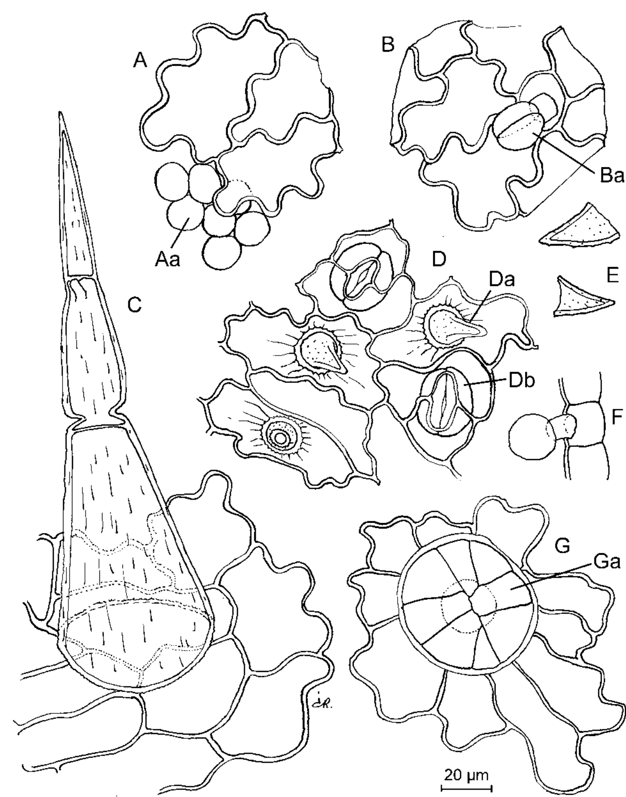



Figure 1447.-1.– *Dessin pour l'identification B de la feuille de mélisse pulvérisée*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Placez 2,0 g de feuille de mélisse pulvérisée (355) (*2.9.12*) dans un ballon à fond rond de 250 mL. Ajoutez 100 mL d'*eau R*. Distillez pendant 1 h en utilisant l'appareil pour la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*) et 0,5 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Après distillation, transférez la phase organique dans un ballon jaugé de 1 mL, rincez le tube gradué de l'appareil à l'aide d'un peu de *xylène R* et complétez à 1,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 1,0 µL de *citronellal R* et 10,0 µL de *citral R* (composé de néral et de géranial) dans 25 mL de *xylène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, hexane R* (10:90 *V/V*).

*Dépôt* : 20 µL [ou 4 µL], en bandes.

*Développement* : dans une cuve non saturée sur un parcours de 15 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 10-15 min ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Citronellal : une bande grise ou violet-gris à la frontière entre le tiers supérieur et le tiers moyen | Une bande grise ou violet-gris (citronellal) à la frontière entre le tiers supérieur et le tiers moyen<br>Une bande violet-rouge |
| _______ | _______ |
| Citral : 2 bandes violet-gris ou violet-bleu à la frontière entre le tiers moyen et le tiers inférieur | 2 bandes violet-gris ou violet-bleu (citral) à la frontière entre le tiers moyen et le tiers inférieur |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 10 pour cent de tiges de section supérieure à 1 mm et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers, déterminé sur 20 g de feuille de mélisse.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de feuille de mélisse pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 12,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Utilisez des flacons de verre brun. Dispersez 0,100 g de feuille de mélisse pulvérisée (355) (*2.9.12*) dans 90 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R*. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Refroidissez et filtrez dans une fiole jaugée de 100 mL. Rincez la fiole et le filtre avec 10 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Filtrez sur un filtre de 0,45 µm.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 20,0 mg d'*acide rosmarinique SCR* dans de l'*éthanol à 50 pour cent V/V R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Prélevez 20,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 50 pour cent V/V R*.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 5,0 mg d'*acide férulique R* dans la solution témoin (a) et complétez à 50,0 mL avec la même solution.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acide phosphorique R, acétonitrile R, eau R* (1:19:80 *V/V/V*),
– *phase mobile B* : *acide phosphorique R, méthanol R, acétonitrile R* (1:40:59 *V/V/V*),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 20 | 100 → 55 | 0 → 45 |
| 20 - 25 | 55 → 0 | 45 → 100 |
| 25 - 30 | 0 → 100 | 100 → 0 |

*Débit* : 1,2 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 330 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Rétention relative* par rapport à l'acide rosmarinique (temps de rétention = environ 11 min) : acide férulique = environ 0,8.

*Conformité du système* : solution témoin (b) :

– *résolution* : au minimum 4,0 entre les pics dus à l'acide férulique et à l'acide rosmarinique.

Drogues végétales

Calculez la teneur pour cent en acide rosmarinique à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 0,2}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'acide rosmarinique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'acide rosmarinique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),

$m_1$ = masse de feuille de mélisse utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse d'*acide rosmarinique SCR* utilisée pour préparer la solution témoin (a), en grammes,

$p$ = teneur pour cent en acide rosmarinique de l'*acide rosmarinique SCR*.

**01/2010:2524**

# MÉLISSE (FEUILLE DE), EXTRAIT SEC DE

## Melissae folii extractum siccum

### DÉFINITION

Extrait sec produit à partir de *Feuille de mélisse (1447)*.

*Teneur* : au minimum 2,0 pour cent d'acide rosmarinique ($C_{18}H_{16}O_8$ ; $M_r$ 360,3) (extrait sec).

### PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec de l'eau chaude (au minimum 70 °C) ou un solvant hydroalcoolique au plus équivalent en concentration à l'éthanol à 70 pour cent *V/V*.

### CARACTÈRES

*Aspect* : poudre amorphe, brune ou brun-vert.

### IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 0,2 g d'extrait à examiner, ajoutez 5 mL de *méthanol R*. Traitez aux ultrasons pendant 5 min et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 1,0 mg d'*hypéroside R*, 1,0 mg de *rutine R* et 5,0 mg d'*acide rosmarinique R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, acétate d'éthyle R* (6:6:90 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 2 µL] en bandes de 15 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 8 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : chauffez à 100 °C pendant 5 min ; pulvérisez sur la plaque encore chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 5 g/L dans l'*acétate d'éthyle R* ; examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes fluorescentes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de plus faible fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Acide rosmarinique : une bande de fluorescence bleu clair | Une bande de fluorescence bleu clair intense (acide rosmarinique) |
| | Une bande de fluorescence bleue |
| _______ | _______ |
| | Une bande de fluorescence bleue |
| _______ | _______ |
| Hypéroside : une bande de fluorescence orange ou jaune-vert | |
| | Une bande de fluorescence bleu clair |
| Rutine : une bande de fluorescence orange ou jaune-vert | |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

### ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.8.17*) : au maximum 6,0 pour cent.

### DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Utilisez des flacons de verre brun. A 0,200 g d'extrait à examiner, ajoutez 50 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R*. Traitez aux ultrasons pendant 10 min et complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 50 pour cent V/V R*. Filtrez sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm).

*Solution témoin (a).* Dissolvez 20,0 mg d'*acide rosmarinique SCR* dans de l'*éthanol à 50 pour cent V/V R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Prélevez 20,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 50 pour cent V/V R*.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 5 mg d'*acide férulique R* dans la solution témoin (a) et complétez à 50 mL avec la solution témoin (a).

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acide phosphorique R, acétonitrile R, eau R* (1:19:80 *V/V/V*),
– *phase mobile B* : *acide phosphorique R, méthanol R, acétonitrile R* (1:40:59 *V/V/V*),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 20 | 100 → 55 | 0 → 45 |
| 20 - 25 | 55 → 0 | 45 → 100 |

*Débit* : 1,2 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 330 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Rétention relative* par rapport à l'acide rosmarinique (temps de rétention = environ 11 min) : acide férulique = environ 0,8.

*Conformité du système* : solution témoin (b) :

– *résolution* : au minimum 4,0 entre les pics dus à l'acide férulique et à l'acide rosmarinique.

Calculez la teneur pour cent en acide rosmarinique à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 0,2}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'acide rosmarinique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'acide rosmarinique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),

$m_1$ = masse d'extrait à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse d'*acide rosmarinique SCR* utilisée pour préparer la solution témoin (a), en grammes,

$p$ = teneur pour cent en acide rosmarinique de l'*acide rosmarinique SCR*.

**01/2008:1838**

# MENTHA ARVENSIS (HUILE ESSENTIELLE PARTIELLEMENT DÉMENTHOLÉE DE)

## Menthae arvensis aetheroleum partim mentholum depletum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau à partir des parties aériennes fleuries, récemment cueillies, de *Mentha canadensis* L. (syn. *M. arvensis* L. var. *glabrata* (Benth) Fern., *M. arvensis* var. *piperascens* Malinv. ex Holmes), puis séparation partielle du menthol par cristallisation.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide incolore, jaune pâle ou jaune-vert.

Odeur caractéristique.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,1 mL d'huile essentielle à examiner dans 1,0 mL de *toluène R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 4 µL de *carvone R*, 4 µL de *pulégone R*, 10 µL d'*acétate de menthyle R*, 20 µL de *cinéole R* et 50 mg de *menthol R* dans 5 mL de *toluène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, une bande d'atténuation de fluorescence peut être présente dans le tiers supérieur du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| Carvone et pulégone : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence<br>Une bande d'atténuation de fluorescence |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min. Examinez immédiatement à la lumière du jour.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. De plus, la bande due au cinéole dans la solution témoin doit être absente dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner. Aucune bande brun-jaune en-dessous de la bande violet-rouge intense ne doit être présente dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| | Une bande violet-rouge intense (près du front de solvant) |
| Acétate de menthyle : une bande violet-bleu | Une bande violet-bleu (acétate de menthyle) |
| | Une bande verdâtre fortement colorée |
| | Une bande verdâtre |
| Carvone et pulégone : une bande rougeâtre | Une bande rougeâtre |
| Cinéole : une bande violette | |
| | Une bande nettement violette |
| Menthol : une bande bleue intense | Une bande bleue très intense (menthol) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez le chromatogramme obtenu dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. La carvone peut être absente dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,888 à 0,910.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,456 à 1,470.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : – 16,0° à – 34,0°.

**Indice d'acide** (*2.5.1*) : au maximum 1,0, déterminé sur 5,00 g d'huile essentielle à examiner dissous dans 50 mL du mélange de solvants prescrit.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,20 g d'huile essentielle à examiner dans de l'*hexane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg de *limonène R*, 20 mg de *cinéole R*, 40 mg de *menthone R*, 10 mg d'*isomenthone R*, 40 mg d'*acétate de menthyle R*, 20 mg d'*isopulégol R*, 60 mg de *menthol R*, 20 mg de *pulégone R* et 10 mg de *carvone R* dans de l'*hexane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 30 m (une épaisseur du film de 1 µm peut être utilisée) à 60 m (une épaisseur du film de 0,2 µm peut être utilisée), Ø = 0,25-0,53 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R*.

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Rapport de division* : 1:100.

Drogues végétales

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 10 | 60 |
| | 10 - 70 | 60 → 180 |
| | 70 - 75 | 180 |
| Chambre à injection | | 200 |
| Détecteur | | 220 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1,0 μL.

*Ordre d'élution* : ordre indiqué pour la préparation de la solution témoin. Notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au limonène et au cinéole.

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les composants de la solution témoin.

Déterminez la teneur pour cent de ces composants. Les pourcentages sont compris entre les valeurs suivantes :

– *limonène* : 1,5 pour cent à 7,0 pour cent,
– *cinéole* : au maximum 1,5 pour cent,
– *menthone* : 17,0 pour cent à 35,0 pour cent,
– *isomenthone* : 5,0 pour cent à 13,0 pour cent,
– *acétate de menthyle* : 1,5 pour cent à 7,0 pour cent,
– *isopulégol* : 1,0 pour cent à 3,0 pour cent,
– *menthol* : 30,0 pour cent à 50,0 pour cent,
– *pulégone* : au maximum 2,5 pour cent,
– *carvone* : au maximum 2,0 pour cent.

Le rapport entre la teneur en cinéole et la teneur en limonène est inférieur à 1.

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

**01/2011:0406**

# MENTHE POIVRÉE (FEUILLE DE)

## Menthae piperitae folium

DÉFINITION

Feuille séchée, entière ou coupée de *Mentha ×piperita* L.

*Teneur* : au minimum 12 mL/kg d'huile essentielle dans la drogue entière et au minimum 9 mL/kg d'huile essentielle dans la drogue coupée.

CARACTÈRES

Odeur caractéristique et pénétrante.

Saveur aromatique caractéristique.

La feuille de menthe poivrée est verte ou vert-brun avec, dans certaines variétés, des nervures violet-brun. Les pétioles sont verts ou violet-brun.

IDENTIFICATION

A. La feuille est entière, brisée ou coupée, mince, cassante et fréquemment froissée ; la feuille entière mesure 3-9 cm de long et 1-3 cm de large. Le limbe est ovale ou lancéolé, acuminé au sommet, bordé de dents aiguës, de base asymétrique. La nervation est pennée, proéminente sur la face inférieure, les nervures latérales faisant avec la nervure médiane un angle voisin de 45°. La face inférieure est légèrement pubescente. Les poils sécréteurs apparaissent à la loupe (× 6) en points jaunâtres et brillants. Le pétiole sillonné, d'un diamètre allant généralement jusqu'à 1 mm, mesure 0,5-1 cm de long.

B. Réduisez la feuille de menthe poivrée en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-brun. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants (figure 0406.-1) : des fragments d'épidermes portant des poils tecteurs et sécréteurs ; l'épiderme adaxial, vu de face [B, H], comprend des cellules à parois sinueuses, ondulées [Ha] et une cuticule striée sur les nervures (B), associé à du parenchyme palissadique [Hb] ; l'épiderme abaxial [C] porte des stomates diacytiques (*2.8.3*) [Ca], les poils tecteurs sont généralement sectionnés, effilés, unisériés, de 3-8 cellules, à cuticule striée [A, E] ; les poils sécréteurs sont de 2 sortes : a) à pied unicellulaire et petite tête unicellulaire, arrondie, d'un diamètre de 15-25 μm, vus de face [Ba, Cb] et en section transversale [D], et b) à pied unicellulaire et tête renflée, ovale, d'un diamètre de 55-70 μm, composée de 8 cellules rayonnantes, vus de face [Bb] et en section transversale [Ga] ; des fragments du bord du limbe [F], à cellules isodiamétriques, à parois anticlinales à peu près droites, moniliformes [Fa] et des poils tecteurs coniques, courts, unicellulaires ou bicellulaires [Fb] ; des fragments de mésophylle bifacial, vus en section transversale [G], à 1 seule assise palissadique [Gc] et à 4-6 couches de parenchyme lacuneux [Gb]. La poudre peut également présenter des cristaux jaunâtres de menthol sous la cuticule des cellules sécrétrices.

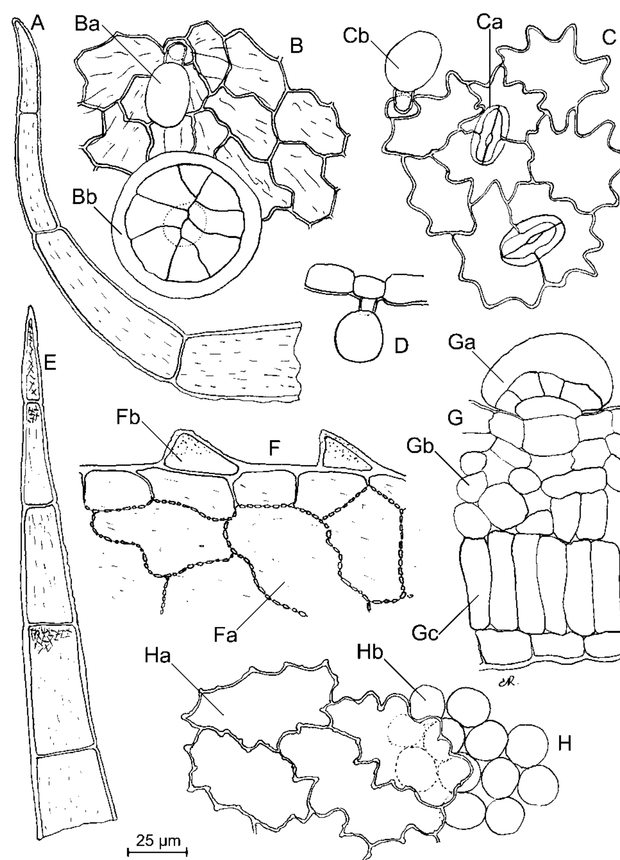



Figure 0406.-1.– *Dessin pour l'identification B de la feuille de menthe poivrée pulvérisée*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 0,2 g de feuille de menthe poivrée, récemment pulvérisée, ajoutez 2 mL de *chlorure de méthylène R*. Agitez pendant quelques minutes et filtrez. Evaporez le filtrat à siccité à environ 40 °C et dissolvez le résidu dans 0,1 mL de *toluène R*.

Drogues végétales

*Solution témoin.* Dissolvez 50 mg de *menthol R*, 20 µL de *cinéole R*, 10 mg de *thymol R* et 10 µL d'*acétate de menthyle R* dans du *toluène R*, puis complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $GF_{254}$ pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL de solution témoin et 20 µL de solution à examiner, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air jusqu'à évaporation complète des solvants.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres faibles bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| Thymol : une bande d'atténuation de fluorescence | |
| | Des bandes d'atténuation de fluorescence peuvent être présentes (carvone, pulégone) |
| ——— | ——— |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R*. Chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min tout en l'observant à la lumière du jour.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande rouge-violet intense (près du front de solvant) (hydrocarbures) |
| ——— | ——— |
| Acétate de menthyle : une bande bleu-violet | Une bande bleu-violet (acétate de menthyle) |
| | Une bande bleu-vert (menthone) |
| Thymol : une bande rose | |
| | Des bandes rose pâle, bleu-gris ou vert-gris peuvent être présentes (carvone, pulégone, isomenthone) |
| Cinéole : une bande bleu-violet ou brune | Une faible bande bleu-violet ou brune (cinéole) |
| ——— | ——— |
| Menthol : une bande bleue ou violette intense | Une bande bleue ou violette intense (menthol) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent de tiges dont le diamètre ne dépasse pas 1,5 mm, au maximum 2 pour cent de matières étrangères et au maximum 8 pour cent de feuilles présentant des taches brunes dues à *Puccinia menthae*.

Effectuez la détermination sur 10 g de feuille de menthe poivrée.

**Eau** (*2.2.13*) : au maximum 110 mL/kg, déterminé sur 20,0 g de feuille de menthe poivrée.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 15,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 1,5 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez 20,0 g de drogue contusée, un ballon de 500 mL et 200 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Introduisez 0,50 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 3-4 mL/min pendant 2 h.

**04/2009:2382**

# MENTHE POIVRÉE (FEUILLE DE), EXTRAIT SEC DE

## Menthae piperitae folii extractum siccum

DÉFINITION

Extrait sec produit à partir de *Feuille de menthe poivrée (0406)*.

*Teneur* : au minimum 0,5 pour cent d'acide rosmarinique ($C_{18}H_{16}O_8$ ; $M_r$ 360,33) (extrait desséché).

PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec de l'éthanol à 30-50 pour cent *V/V* ou de l'eau à au minimum 60 °C.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre amorphe, brune.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 0,2 g d'extrait à examiner, ajoutez 5 mL de *méthanol R*. Traitez aux ultrasons pendant 5 min et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 5 mg d'*acide rosmarinique R*, 1 mg d'*hypéroside R* et 1 mg de *rutine R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, acétate d'éthyle R* (6:6:90 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 4 µL] en bandes de 15 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 8 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : chauffez à 100 °C pendant 5 min ; pulvérisez, sur la plaque chaude, une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 5 g/L dans de l'*acétate d'éthyle R* ; examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Acide rosmarinique : une bande de fluorescence bleu clair | Une bande de fluorescence bleu clair (acide rosmarinique) |
| ——— | ——— |
| ——— | ——— |
| Hypéroside : une bande de fluorescence orange | |
| | Une bande de fluorescence jaune |
| | Une bande de fluorescence brune |
| Rutine : une bande de fluorescence orange | Une bande de fluorescence jaune |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Utilisez des flacons de verre brun. A 0,400 g d'extrait à examiner, ajoutez 15 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R*. Traitez aux ultrasons pendant 10 min et filtrez dans une fiole jaugée de 20 mL. Rincez la fiole et le filtre avec de l'*éthanol à 50 pour cent V/V R* et complétez à 20,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 10,0 mg d'*acide rosmarinique SCR* dans de l'*éthanol à 50 pour cent V/V R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 5 mg d'*acide férulique R* dans la solution témoin (a) et complétez à 50 mL avec la même solution.

*Colonne* :
– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* :
– *phase mobile A* : *acide phosphorique R, acétonitrile R, eau R* (1:19:80 *V/V/V*),
– *phase mobile B* : *acide phosphorique R, méthanol R, acétonitrile R* (1:40:59 *V/V/V*),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
| --- | --- | --- |
| 0 - 20 | 100 → 55 | 0 → 45 |
| 20 - 25 | 55 → 0 | 45 → 100 |
| 25 - 30 | 0 → 100 | 100 → 0 |

*Débit* : 1,2 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 330 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Rétention relative* par rapport à l'acide rosmarinique (temps de rétention = environ 11 min) : acide férulique = environ 0,8.

*Conformité du système* : solution témoin (b) :
– *résolution* : au minimum 4,0 entre les pics dus à l'acide férulique et à l'acide rosmarinique.

Calculez la teneur pour cent en acide rosmarinique, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 0,2}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'acide rosmarinique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'acide rosmarinique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),

$m_1$ = masse d'extrait à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse d'*acide rosmarinique SCR* utilisée pour préparer la solution témoin (a), en grammes,

$p$ = teneur pour cent en acide rosmarinique dans l'*acide rosmarinique SCR*.

**01/2008:0405**

# MENTHE POIVRÉE (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Menthae piperitae aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau, à partir des parties aériennes fleuries récemment cueillies de *Mentha* × *piperita* L.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide incolore, jaune pâle ou jaune-vert pâle.

Odeur et saveur caractéristiques, suivies d'une sensation de fraîcheur.

*Solubilité* : miscible à l'alcool et au chlorure de méthylène.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de *Mentha arvensis*.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
| --- | --- |
| ——— | ——— |
| Thymol : une bande d'atténuation de fluorescence | |
| | Des bandes d'atténuation de fluorescence peuvent être présentes (carvone, pulégone) |
| ——— | ——— |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes moins colorées peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
| --- | --- |
| | Une bande rouge-violet intense (près du front de solvant) (hydrocarbures) |
| | Une bande jaune-brun (menthofurane) |
| ——— | ——— |
| Acétate de menthyle : une bande bleu-violet | Une bande bleu-violet (acétate de menthyle) |
| | Une bande bleu-vert (menthone) |
| Thymol : une bande rose | |
| | Des bandes rose pâle, bleu-gris ou vert-gris peuvent être présentes (carvone, pulégone, isomenthone) |
| Cinéole : une bande bleu-violet à brun | Une faible bande bleu-violet à brun (cinéole) |
| ——— | ——— |
| Menthol : une bande intense bleu à violet | Une bande intense bleu à violet (menthol) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables, quant à leur temps de rétention, aux pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. La carvone et la pulégone peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,900 à 0,916.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,457 à 1,467.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : – 10° à – 30°.

**Indice d'acide** (*2.5.1*) : au maximum 1,4, déterminé sur 5,0 g d'huile essentielle à examiner dilués dans 50 mL du mélange de solvants prescrit.

**Huiles grasses et huiles essentielles résinifiées** (*2.8.7*). L'huile essentielle à examiner satisfait à l'essai des huiles grasses et huiles essentielles résinifiées.

***Mentha arvensis***

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Mélangez 0,1 g d'huile essentielle à examiner avec du *toluène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 50 mg de *menthol R*, 20 µL de *cinéole R*, 10 mg de *thymol R* et 10 µL d'*acétate de menthyle R* dans du *toluène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R*, *toluène R* (5 :95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL de solution témoin et 20 µL de solution à examiner, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 mm.

*Détection B* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultat B* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande bleue entre les zones dues au cinéole et au menthol.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de pic correspondant au temps de rétention de l'isopulégol et dont la surface est supérieure à 0,2 pour cent de la surface totale.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. Mélangez 0,20 g d'huile essentielle à examiner avec de l'*hexane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 10 µL de *limonène R*, 20 µL de *cinéole R*, 40 µL de *menthone R*, 10 µL de *menthofurane R*, 10 µL d'*isomenthone R*, 40 µL d'*acétate de menthyle R*, 20 µL d'*isopulégol R*, 60 mg de *menthol R*, 20 µL de *pulégone R*, 10 µL de *pipéritone R* et 10 µL de *carvone R* dans de l'*hexane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 5 µL d'*isopulégol R* dans de l'*hexane R* et complétez à 10 mL avec le même solvant. Prélevez 0,1 mL de solution et complétez à 5 mL avec de l'*hexane R*.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 60 m, Ø = 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur du film 0,25 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Rapport de division* : 1:50.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 10 | 60 |
| | 10 - 70 | 60 - 180 |
| | 70 - 75 | 180 |
| Chambre à injection | | 200 |
| Détecteur | | 220 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL.

*Ordre d'élution* : ordre donné pour la préparation de la solution témoin (a) ; notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin (a) :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au limonène et au cinéole et au minimum 1,5 entre les pics dus à la pipéritone et à la carvone.

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a), localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, les composants de la solution témoin. Ne tenez pas compte du pic dû à l'hexane.

Déterminez la teneur pour cent de ces composants. Ces teneurs sont comprises dans les limites suivantes :

– *limonène* : 1,0 pour cent à 5,0 pour cent,
– *cinéole* : 3,5 pour cent à 14,0 pour cent,
– *menthone* : 14,0 pour cent à 32,0 pour cent,
– *menthofurane* : 1,0 pour cent à 9,0 pour cent,
– *isomenthone* : 1,5 pour cent à 10,0 pour cent,
– *acétate de menthyle* : 2,8 pour cent à 10,0 pour cent,
– *isopulégol* : au maximum 0,2 pour cent,
– *menthol* : 30,0 pour cent à 55,0 pour cent,
– *pulégone* : au maximum 4,0 pour cent,
– *carvone* : au maximum 1,0 pour cent,
– *limite d'exclusion* : surface du pic obtenu avec la solution témoin (b) (0,05 pour cent).

Le rapport entre la teneur en cinéole et la teneur en limonène est au minimum 2.

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

**01/2008:1605**
**corrigé 6.0**

# MÉNYANTHE

## Menyanthidis trifoliatae folium

DÉFINITION

Feuille séchée, entière ou fragmentée, de *Menyanthes trifoliata* L.

CARACTÈRES

Saveur très amère et persistante.

IDENTIFICATION

A. La feuille est longuement pétiolée, trifoliée et munie de longues gaines partant de la base ; le pétiole peut atteindre 5 mm de diamètre et comporte des stries longitudinales marquées. Le limbe est divisé en folioles égales, sessiles, obovales pouvant atteindre 10 cm de long et 5 cm de large, aux bords entiers, parfois sinueux, avec des hydathodes brunâtres ou rougeâtres et à la base spatulée ; il est glabre, vert foncé sur sa face supérieure et vert plus pâle sur sa face inférieure, avec une nervure médiane saillante blanchâtre, large et finement striée.

B. Réduisez le ményanthe en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente des fragments d'épiderme supérieur à cellules polyédriques et à parois minces, ondulées ; des fragments d'épiderme inférieur à parois sinueuses ; des stomates anomocytiques (*2.8.3*) sur les deux faces, avec des cellules annexes présentant des stries radiales ; des cellules épidermiques papillées à paroi droite provenant des nervures ; des fragments du parenchyme du mésophylle avec de larges espaces intercellulaires (aérenchyme) ; des cellules irrégulières renfermant de rares sclérites ; des fragments de vaisseaux spiralés ou annelés.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Chauffez, en agitant, dans un bain-marie à 60 °C pendant 5 min. Laissez refroidir et filtrez. Evaporez à siccité sous pression réduite dans un bain-marie à 60 °C. Dissolvez le résidu dans 2,0 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *loganine R* dans 15 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R, acétate d'éthyle R* (8:15:77 *V/V/V*).

*Dépôt* : 30 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez du *réactif à la vanilline R*. Chauffez à l'étuve à 100-105 °C pendant 10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande violette |
| | Une bande bleu intense |
| Loganine : une bande violet-gris | Une bande violette à violet-gris |
| | Une bande grise à bleu-gris |
| | Une bande brunâtre |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

**Indice d'amertume** (*2.8.15*) : au minimum 3000.

**07/2008:1438**

# MILLEPERTUIS

## Hyperici herba

DÉFINITION

Sommité fleurie séchée, entière ou fragmentée, d'*Hypericum perforatum* L., récoltée pendant la floraison.

*Teneur* : au minimum 0,08 pour cent d'hypéricines totales, exprimées en hypéricine ($C_{30}H_{16}O_8$ ; $M_r$ 504,4) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La tige rameuse et glabre présente 2 côtes longitudinales plus ou moins saillantes. Les feuilles, opposées, sessiles, non stipulées, ovales-oblongues, mesurent 15-30 mm de long ; elles présentent sur les bords des points glanduleux noirs et, sur toute la surface, de nombreuses petites poches sécrétrices, fortement translucides, visibles par transparence. Les fleurs sont régulières et réunies en grappes corymbiformes à l'extrémité de la tige ; elles comportent 5 sépales verts, aigus, ponctués sur les bords de poches secrétrices noires, 5 pétales jaune orangé portant également sur les bords des poches secrétrices noires, 3 lames staminales divisées chacune en un grand nombre d'étamines jaune orangé et 3 carpelles surmontés de styles rouges.

La drogue peut également présenter les éléments suivants : fruits et graines immatures ou mûrs. Les fruits immatures sont verts ou jaunâtres, les graines blanchâtres. De rares fruits mûrs peuvent être présents, il s'agit de capsules sèches triloculaires remplies de nombreuses graines, brunes, ovales, plus ou moins larges, de 5-10 mm de long, avec de larges glandes linéaires ou punctiformes, des canaux à striations irrégulières contenant des sécrétions. Les graines mûres, brunes ou presque noires, de 1-1,3 mm de long, finement ponctuées longitudinalement, sont cylindriques ou triangulaires, avec des extrémités en pointe courte.

B. Réduisez le millepertuis en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune-vert. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments d'épiderme composé de cellules polygonales à paroi épaissie en chapelet, avec des stomates de type paracytique ou anomocytique (*2.8.3*) ; des fragments de feuilles et de sépales à grandes poches sécrétrices et cellules pigmentées en rouge ; des cellules allongées, à paroi mince, de l'épiderme des pétales, avec des parois anticlinales droites ou onduleuses ; des trachéides et des vaisseaux à paroi ponctuée, associés à des groupes de fibres épaissies ; des fragments de parenchyme à cellules rectangulaires lignifiées et ponctuées ; des fragments de l'assise fibreuse de l'anthère et des cellules allongées, à paroi mince et cuticule striée, du filet staminal ; de nombreux grains de pollen, isolés ou en groupes denses, à 3 pores germinatifs et exine lisse, et des cristaux d'oxalate de calcium en oursins.

La poudre peut également présenter les éléments suivants : des fragments du fruit, avec un exocarpe solide constitué de cellules polygonales arrondies, un endocarpe avec des fibres émoussées, à parois épaisses ; des fragments du tégument de la graine, blanchâtre ou brun, avec des cellules hexagonales ou polygonales arrondies à parois épaisses ; des fragments du tissu de réserve et de l'embryon, avec d'abondantes gouttelettes d'huile.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Agitez 0,5 g de millepertuis pulvérisé (500) (*2.9.12*) avec 10 mL de *méthanol R* pendant 10 min dans un bain-marie à 60 °C, puis filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *rutine R* et 5 mg d'*hypéroside R* dans du *méthanol R*, puis complétez à 5 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, acétate d'éthyle R* (6:9:90 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL de solution à examiner et 5 µL de solution témoin, en bandes de 10 mm.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C pendant 10 min.

*Détection* : pulvérisez de la solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R*, puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R*. Après environ 30 min, examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente dans son tiers inférieur une bande de fluorescence orange-jaune (rutine) et au-dessus une autre bande de fluorescence orange-jaune (hypéroside). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente dans son tiers inférieur 2 bandes de fluorescence orange-rouge dues à la rutine et à l'hypéroside et dans la partie inférieure du tiers supérieur une bande de fluorescence rouge due à la pseudohypéricine et au-dessus une autre bande de fluorescence rouge due à l'hypéricine. D'autres bandes de fluorescence jaune ou bleue sont visibles.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3 pour cent de tiges d'un diamètre supérieur à 5 mm et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de millepertuis pulvérisé (500) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 7,0 pour cent.

DOSAGE

*Solution à examiner*. Dans un ballon à fond rond de 100 mL, placez 0,800 g de millepertuis pulvérisé (500) (*2.9.12*), puis ajoutez 60 mL d'un mélange de 20 volumes d'*eau R* et de 80 volumes de *tétrahydrofurane R* ainsi qu'un agitateur magnétique. Chauffez à ébullition à reflux dans un bain-marie à 70 °C pendant 30 min. Centrifugez (2 min à 700 *g*) et décantez le surnageant dans une fiole de 250 mL. Reprenez le résidu avec 60 mL d'un mélange de 20 volumes d'*eau R* et de 80 volumes de *tétrahydrofurane R*. Chauffez de nouveau à reflux pendant 30 min. Centrifugez (2 min à 700 *g*) et décantez le surnageant. Réunissez les extraits et évaporez à siccité. Reprenez le résidu avec 15 mL de *méthanol R* à l'aide d'ultrasons et transférez dans un ballon jaugé de 25 mL. Rincez la fiole de 250 mL avec du *méthanol R* et complétez à 25,0 mL dans le ballon jaugé avec le même solvant. Centrifugez à nouveau, filtrez 10 mL à travers une seringue filtrante (0,2 µm). Rejetez les 2 premiers millilitres du filtrat. Introduisez 5,0 mL du filtrat dans un ballon jaugé et complétez à 25,0 mL avec du *méthanol R*.

*Liquide de compensation*. *Méthanol R*.

Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 590 nm de la solution à examiner, par comparaison au liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en hypéricines totales, exprimées en hypéricine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 125}{m \times 870}$$

en prenant 870 comme valeur de l'absorbance spécifique de l'hypéricine.

$A$ = absorbance à 590 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**07/2008:1874**
**corrigé 6.3**

# MILLEPERTUIS (EXTRAIT SEC QUANTIFIÉ DE)

## Hyperici herbae extractum siccum quantificatum

DÉFINITION

Extrait sec quantifié obtenu à partir de *Millepertuis (1438).*

*Teneur* :

- *hypéricines totales, exprimées en hypéricine* ($C_{30}H_{16}O_8$ ; $M_r$ 504,5) : 0,10 pour cent à 0,30 pour cent (extrait desséché),
- *flavonoïdes, exprimés en rutine* ($C_{27}H_{30}O_{16}$ ; $M_r$ 610,5) : au minimum 6,0 pour cent (extrait desséché),
- *hyperforine* ($C_{35}H_{52}O_4$ ; $M_r$ 536,8) : au maximum 6,0 pour cent (extrait desséché) et au maximum la teneur indiquée sur l'étiquette.

PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec de l'éthanol à 50-80 pour cent *V/V* ou du méthanol à 50-80 pour cent *V/V*.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre gris-brun.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dispersez 0,25 g d'extrait à examiner dans 5 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *rutine R* et 5 mg d'*hypéroside R* dans du *méthanol R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R*, *eau R*, *acétate d'éthyle R* (6:9:90 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 5 µL] en bandes de 10 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 7,5 cm].

*Séchage* : à 100-105 °C pendant 10 min.

*Détection* : pulvérisez une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R*, puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R*. Après environ 30 min, examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence orange-jaune |
| | 2 bandes de fluorescence rouge (hypéricine et pseudohypéricine) |
| _______ | _______ |
| | 3 bandes de fluorescence orange-jaune |
| _______ | _______ |
| Hypéroside : une bande de fluorescence orange-jaune | Une bande de fluorescence orange-jaune (hypéroside) |
| | Des bandes de fluorescence jaune et bleue éventuellement superposées |
| Rutine : une bande de fluorescence orange-jaune | Une bande de fluorescence orange-jaune (rutine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

DOSAGE

**Hypéricines totales**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 70,0 mg d'extrait à examiner dans 25,0 mL de *méthanol R*. Traitez aux ultrasons et centrifugez. Exposez la solution au rayonnement d'une lampe au xénon à environ 765 W/m² pendant 8 min.

*Solution témoin*. Dissolvez une quantité d'*extrait sec titré de millepertuis SCR* correspondant à 0,15 mg d'hypéricine, dans 25,0 mL de *méthanol R*. Traitez aux ultrasons et centrifugez. Exposez la solution au rayonnement d'une lampe au xénon à environ 765 W/m² pendant 8 min.

*Colonne* :

- *dimensions* : $l$ = 0,15 m, Ø = 4,6 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
- *température* : 40 °C.

*Phase mobile* : mélangez 39 volumes d'*acétate d'éthyle R*, 41 volumes d'une solution de *phosphate monosodique R* à 15,6 g/L ajustée à pH 2 avec de l'*acide phosphorique R* et 160 volumes de *méthanol R*.

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 590 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Enregistrement* : 15 min.

*Identification des pics* : utilisez le chromatogramme fourni avec l'*extrait sec titré de millepertuis SCR* et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin pour identifier les pics dus à la pseudohypéricine et à l'hypéricine.

*Conformité du système* : solution témoin :

– le chromatogramme obtenu est semblable au chromatogramme fourni avec l'*extrait sec titré de millepertuis SCR,*

– *résolution* : au minimum 2 entre les pics dus à la pseudohypéricine et à l'hypéricine.

Calculez la teneur pour cent en hypéricines totales, exprimées en hypéricine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{(A_1 + A_2) \times m_2 \times p}{A_3 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à la pseudohypéricine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'hypéricine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_3$ = surface du pic dû à l'hypéricine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse d'extrait à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse d'*extrait sec titré de millepertuis SCR* utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en hypéricine de l'*extrait sec titré de millepertuis SCR*.

**Hyperforine et flavonoïdes**. Chromatographie liquide (*2.2.29*). *Effectuez le dosage à l'abri de la lumière.*

*Mélange de solvants*: *eau R, méthanol R* (20:80 V/V).

*Solution à examiner*. Dissolvez 75,0 mg d'extrait à examiner dans 20,0 mL du mélange de solvants. Traitez au ultrasons et centrifugez.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 20,0 mg de *rutoside trihydraté SCR* dans 200,0 mL du mélange de solvants.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 75,0 mg d'*extrait sec titré de millepertuis SCR* dans 20,0 mL du mélange de solvants. Traitez aux ultrasons et centrifugez.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,15 m, Ø = 4,6 mm,

– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (3 µm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acide phosphorique R, eau R* (3:1000 *V/V*),

– *phase mobile B* : *acide phosphorique R, acétonitrile R* (3:1000 *V/V*),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) | Débit (mL/min) |
|---|---|---|---|
| 0 - 8 | 82 | 18 | 0,8 |
| 8 - 18 | 82 → 47 | 18 → 53 | 0,8 |
| 18 - 18,1 | 47 → 3 | 53 → 97 | 0,8 |
| 18,1 - 19 | 3 | 97 | 0,8 → 1,2 |
| 19 - 29 | 3 | 97 | 1,2 |
| 29 - 30 | 3 → 82 | 97 → 18 | 1,2 |

*Détection* : spectrophotomètre à 360 nm, puis à 275 nm après élution de la biapigénine (environ 22 min).

*Injection* : 10 µL.

*Identification des pics* : utilisez le chromatogramme fourni avec l'*extrait sec titré de millepertuis SCR* et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) pour identifier les pics dus à la rutine, à l'hypéroside, à l'isoquercitroside, au quercitroside, à la quercétine, à la biapigénine, à l'hyperforine et à l'adhyperforine.

*Conformité du système* : solution témoin (b) :

– le chromatogramme obtenu est semblable au chromatogramme fourni avec l'*extrait sec titré de millepertuis SCR,*

– *résolution* : au minimum 2,0 entre les pics dus à la rutine et à l'hypéroside, et au minimum 2,0 entre les pics dus à l'hyperforine et à l'adhyperforine.

Calculez la teneur pour cent en hyperforine à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_4 \times m_4 \times p \times 2,3}{A_5 \times m_3 \times 10}$$

$A_4$ = surface du pic dû à l'hyperforine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_5$ = surface du pic dû à la rutine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),

$m_3$ = masse d'extrait à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_4$ = masse de *rutoside trihydraté SCR* utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,

2,3 = facteur de correction de l'hyperforine par rapport à la rutine,

$p$ = teneur pour cent en rutine du *rutoside trihydraté SCR*.

Calculez la teneur pour cent en flavonoïdes, exprimés en rutine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{m_4 \times p \times (A_6 + A_7 + A_8 + A_9 + A_{10} + A_{11})}{m_3 \times A_5 \times 10}$$

$A_5$ = surface du pic dû à la rutine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),

$A_6$ = surface du pic dû à la rutine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_7$ = surface du pic dû à l'hypéroside dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_8$ = surface du pic dû à l'isoquercitroside dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_9$ = surface du pic dû au quercitroside dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_{10}$ = surface du pic dû à la quercétine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_{11}$ = surface du pic dû à la biapigénine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$m_3$ = masse d'extrait à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_4$ = masse de *rutoside trihydraté SCR* utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en rutine du *rutoside trihydraté SCR*.

## ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique la teneur en hyperforine.

**01/2008:1349**
**corrigé 6.0**

# MYRRHE

## Myrrha

DÉFINITION

Gomme résine, durcie à l'air, obtenue par incision ou par exsudation spontanée du tronc et des rameaux de *Commiphora molmol* Engler ou d'autres espèces de *Commiphora*.

CARACTÈRES

Saveur amère.

IDENTIFICATION

A. La myrrhe se présente sous forme de grains ou de fragments brun orangé clair ou foncé, irréguliers ou arrondis, de taille variable, constitués de composants de couleurs variées ; la surface des grains ou fragments est en général couverte d'une poussière grise ou brun-jaune.

B. Réduisez la myrrhe en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune-brun ou brun-rouge. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : quelques fragments de tissus végétaux comprenant des fragments d'écorce brun-rouge ; des cellules scléreuses simples ou groupées, de forme polyédrique ou allongée, à paroi lignifiée et ponctuée fortement épaissie par endroits et à contenu brunâtre ; des fragments de cellules parenchymateuses à paroi mince et de fibres sclérenchymateuses ; des cristaux d'oxalate de calcium irréguliers, de forme prismatique ou polyédrique, mesurant environ 10-25 µm.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de *Commiphora mukul*.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R*. Examinez à la lumière du jour, en chauffant à 100-105 °C pendant 10 min.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente une bande rouge orangé (thymol) dans son tiers inférieur et une bande violette (anéthole) dans son tiers médian. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande violet intense (furano-eudesma-1,3-diène) de taille et d'intensité supérieures à celles des autres bandes au-dessus de la bande de l'anéthole dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, puis une bande violette semblable quant à sa position à la bande de l'anéthole dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, et 2 bandes violet intense semblables quant à leur position à la bande du thymol dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin ; ces 2 bandes correspondent respectivement à la curzérénone (bande supérieure) et au 2-méthoxyfuranodiène (bande inférieure). D'autres bandes, pour la plupart violettes, sont également présentes.

ESSAI

**Commiphora mukul**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 0,5 g de myrrhe pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 5,0 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Chauffez le mélange au bain-marie pendant 2-3 min, puis refroidissez et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg de *thymol R* et 40 µL d'*anéthole R* dans 10 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (2:98 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande de fluorescence bleue ou violette dans son tiers inférieur.

**Matières insolubles dans l'éthanol** : au maximum 70 pour cent. Introduisez 1,00 g de myrrhe pulvérisée (250) (*2.9.12*) dans un ballon. Ajoutez 30 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et agitez vigoureusement pendant 10 min. Filtrez le surnageant sur un filtre en verre fritté (16) (*2.1.2*) taré, en évitant d'entraîner le résidu du ballon. Répétez l'extraction avec 2 fois 20 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*. Transférez le résidu quantitativement sur le filtre par rinçage du ballon avec de l'*éthanol à 96 pour cent R*. Séchez le filtre et le résidu à l'étuve à 100-105 °C. Pesez le résidu.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 15,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de myrrhe pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 7,0 pour cent.

**01/2008:1877**

# MYRRHE (TEINTURE DE)

## Myrrhae tinctura

DÉFINITION

Teinture produite à partir de *Myrrhe (1349)*.

PRODUCTION

La teinture de myrrhe est produite à partir de 1 partie de drogue et de 5 parties d'éthanol à 90 pour cent *V/V*, par une méthode appropriée.

CARACTÈRES

Liquide limpide brun-jaune à brun orangé.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Prélevez 5 mL de teinture de myrrhe et complétez à 10 mL avec de l'*alcool R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg de *thymol R* et 40 µL d'*anéthole R* dans 10 mL d'*éther R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (2:98 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et examinez à la lumière du jour en chauffant à 100-105 °C pendant 10 min.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes, pour la plupart violettes, sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande violet intense de dimension et d'intensité supérieures à celles des autres bandes (furanoeudesma-1,3-diène) |
| Anéthole : une bande violette | Une bande violette |
| Thymol : une bande rouge orangé | Deux bandes violet intense (curzérénone et en dessous 2-méthoxyfuranodiène) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Ethanol** (*2.9.10*) : 82 pour cent *V/V* à 88 pour cent *V/V*.

Drogues végétales

**Méthanol et 2-propanol** (*2.9.11*) : au maximum 0,05 pour cent *V/V* de méthanol et au maximum 0,05 pour cent *V/V* de 2-propanol.

**Résidu sec** (*2.8.16*) : au minimum 4,0 pour cent *m/m*.

CONSERVATION

L'emploi de récipients en plastique est déconseillé.

**01/2008:1602**
**corrigé 6.1**

# MYRTILLE (FRUIT FRAIS DE)

## Myrtilli fructus recens

DÉFINITION

Fruit mûr, frais ou congelé, de *Vaccinium myrtillus* L.

*Teneur* : au minimum 0,30 pour cent d'anthocyanosides, exprimés en chlorure de cyanidine 3-*O*-glucoside (chrysanthémine, $C_{21}H_{21}ClO_{11}$ ; $M_r$ 484,8) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Saveur sucrée, un peu astringente.

IDENTIFICATION

A. Le fruit frais de myrtille est une baie bleu-noir, globuleuse, d'environ 5 mm de diamètre. Il comporte à la base une cicatrice ou, rarement, un fragment de pédoncule. Le sommet, aplati, est surmonté par les restes du style persistant et du calice, qui forme un repli circulaire. Dans le mésocarpe violacé et juteux, 4 à 5 loges renferment de nombreuses petites graines ovoïdes brunes.

B. Le fruit frais de myrtille broyé est rouge violacé. Examinez-le au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. Il présente des cellules scléreuses, rose violacé, à paroi épaisse canaliculée, généralement en amas, provenant de l'endocarpe et du mésocarpe ; des fragments d'épicarpe brun-rouge, formés de cellules polygonales à paroi légèrement épaissie ; des fragments jaune-brun du tégument externe de la graine, composés de cellules allongées, à paroi présentant des épaississements en forme de fer à cheval ; des macles de cristaux d'oxalate de calcium.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 5 g de drogue, récemment broyée, ajoutez 20 mL de *méthanol R*. Agitez pendant 15 min et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *chrysanthémine R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, butanol R* (16:19:65 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande rouge violacé |
| Chrysanthémine : une bande rouge violacé | Une bande principale rouge violacé |
| | Un ensemble compact d'autres bandes principales :<br>– une bande rouge violacé<br>– plusieurs bandes bleu violacé |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Cendres totales** (*2.4.16*) : maximum 0,6 pour cent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : 80,0 pour cent à 90,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 5,000 g de drogue récemment broyée.

DOSAGE

Broyez extemporanément 50 g de drogue. A environ 5,00 g de drogue broyée, exactement pesés, ajoutez 95 mL de *méthanol R*. Agitez mécaniquement pendant 30 min. Filtrez dans une fiole jaugée de 100,0 mL, lavez le filtre et complétez au volume avec du *méthanol R*. Diluez cette solution au 1/50 dans une solution d'*acide chlorhydrique R* à 0,1 pour cent *V/V* dans le *méthanol R*.

Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution obtenue à 528 nm, en prenant une solution d'*acide chlorhydrique R* à 0,1 pour cent *V/V* dans le *méthanol R*, comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en anthocyanosides, exprimés en chlorure de cyanidine 3-*O*-glucoside, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 5000}{718 \times m}$$

718 = absorbance spécifique du chlorure de cyanidine 3-*O*-glucoside à 528 nm,

*A* = absorbance à 528 nm,

*m* = masse de la prise d'essai, en grammes.

CONSERVATION

Lorsque le fruit frais de myrtille est congelé, conservez-le à une température inférieure ou égale à – 18 °C.

**07/2008:2394**
**corrigé 6.4**

# MYRTILLE (FRUIT FRAIS DE), EXTRAIT SEC PURIFIÉ ET TITRÉ DE

## Myrtilli fructus recentis extractum siccum raffinatum et normatum

DÉFINITION

Extrait sec purifié et titré produit à partir de *Fruit frais de myrtille (1602)*.

*Teneur* : 32,4 pour cent à 39,6 pour cent d'anthocyanines, exprimées en chlorure de cyanidine 3-*O*-glucoside [chrysanthémine ($C_{21}H_{21}ClO_{11}$ ; $M_r$ 484,4)] (extrait desséché).

PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec de l'éthanol à 96 pour cent *V/V* ou du méthanol à au minimum 60 pour cent *V/V*. Un affinement peut être effectué par chromatographie à échange d'ions.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre amorphe violet-rouge foncé, hygroscopique.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,10 g d'extrait à examiner dans 25 mL de *méthanol R*. Agitez pendant 15 min et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 2 mg de *chrysanthémine R* et 2 mg de *myrtilline R* dans 5 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : plaque recouverte de *cellulose pour chromatographie R* (5-40 µm) [ou plaque recouverte de *cellulose pour chromatographie R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acide chlorhydrique R, acide acétique R, eau R* (3:15:82 *V/V/V*),

– *phase mobile B* : *eau R, acide acétique R* (40:60 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 2 µL] en bandes de 10 mm [ou 6 mm].

*Développement A* : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm] avec la phase mobile A.

*Séchage A* : à l'air chaud.

*Développement B* : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm] avec la phase mobile B.

*Séchage B* : à l'air.

*Détection* : examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| | Une bande rouge-violet |
| Chrysanthémine : une bande rouge-violet | Une bande rouge-violet (chrysanthémine) |
| Myrtilline : une bande rouge-violet | Une bande rouge-violet (myrtilline) |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai des anthocyanidines totales.

Les pics caractéristiques dus aux anthocyanines (pics 1-8, 10-15 et 17) dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leurs temps de rétention à ceux du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b).

## ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.8.17*) : au maximum 4,5 pour cent.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 2,0 pour cent.

**Anthocyanidines totales**. Chromatographie liquide (*2.2.29*). *Conservez les solutions à 4 °C.*

*Mélange de solvants* : *acide chlorhydrique R, méthanol R* (2:98 *V/V*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,1250 g d'extrait à examiner dans le mélange de solvants et complétez à 25,0 mL avec le mélange de solvants. Prélevez 5,0 mL de cette solution et complétez à 20,0 mL avec de l'*acide phosphorique dilué R*.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 10,0 mg de *chlorure de cyanidine SCR* dans le mélange de solvants et complétez à 25,0 mL avec le mélange de solvants. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec de l'*acide phosphorique dilué R*.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 0,1250 g d'*extrait sec de myrtille SCR* dans le mélange de solvants et complétez à 25,0 mL avec le mélange de solvants. Prélevez 5,0 mL de cette solution et complétez à 20,0 mL avec de l'*acide phosphorique dilué R*.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,250 m, Ø = 4,6 mm,

– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),

– *température* : 30 °C.

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acide formique anhydre R, eau R* (8,5:91,5 *V/V*),

– *phase mobile B* : *acide formique anhydre R, acétonitrile R, méthanol R, eau R* (8,5:22,5:22,5:41,5 *V/V/V/V*),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 35 | 93 → 75 | 7 → 25 |
| 35 - 45 | 75 → 35 | 25 → 65 |
| 45 - 46 | 35 → 0 | 65 → 100 |
| 46 - 50 | 0 | 100 |

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 535 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Identification des pics* : utilisez le chromatogramme fourni avec l'*extrait sec de myrtille SCR* et les chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins (a) et (b) pour identifier les pics dus aux anthocyanines et aux anthocyanidines.

*Temps de rétention* : les temps de rétention et l'ordre d'élution sont semblables à ceux indiqués dans le chromatogramme (figure 2394.-1).

*Conformité du système* : solution témoin (b) :

– *rapport pic/vallée* : au minimum 2,0, avec $H_p$ = hauteur au-dessus de la ligne de base du pic dû à la cyanidine 3-*O*-galactoside (pic 3) et $H_v$ = hauteur au-dessus de la ligne de base du point le plus bas du tracé entre ce pic et celui dû à la delphinidine 3-*O*-arabinoside (pic 4).

Calculez la teneur pour cent en anthocyanidines totales, exprimées en chlorure de cyanidine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times 100 \times p}{m_1 \times A_2 \times 1250}$$

$A_1$ = somme de la surface des pics dus aux anthocyanidines (pics 9, 16, 18-20) dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû au chlorure de cyanidine (pic 16) dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),

$m_1$ = masse de l'extrait à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse de *chlorure de cyanidine SCR* utilisée pour préparer la solution témoin (a), en grammes,

$p$ = teneur pour cent en chlorure de cyanidine dans le *chlorure de cyanidine SCR*.

*Limites* : au maximum 1,0 pour cent d'anthocyanidines totales, exprimées en chlorure de cyanidine.

## DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai des anthocyanidines totales avec la modification suivante.

*Injection* : solution à examiner et solution témoin (b).

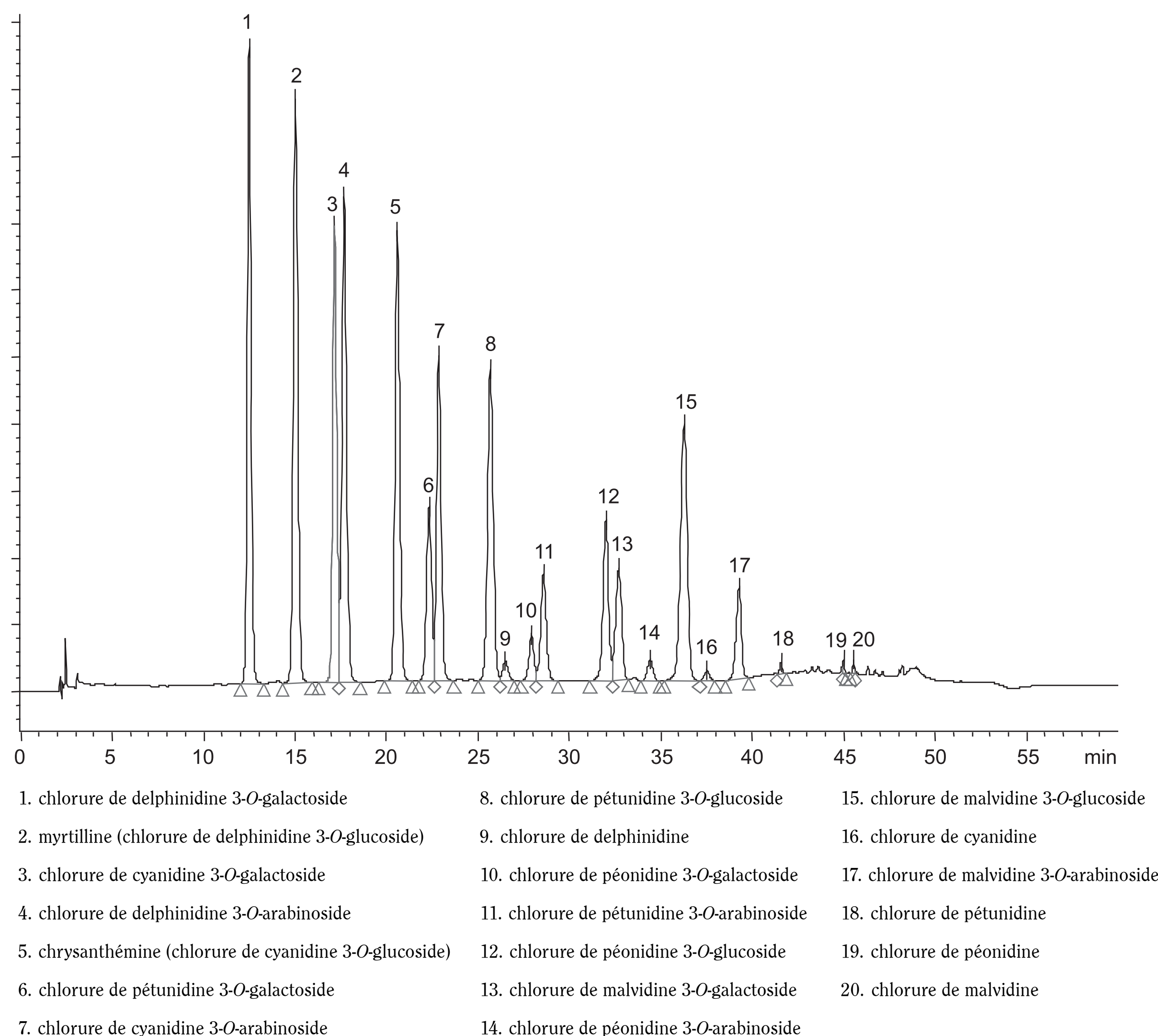



Figure 2394.-1. – *Chromatogramme pour le dosage de l'extrait sec purifié et titré de fruit frais de myrtille*

Calculez la teneur pour cent en anthocyanines totales, exprimées en chlorure de cyanidine 3-*O*-glucoside, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p}{m_1 \times A_2}$$

$A_1$ = somme de la surface des pics dus aux anthocyanines (pics 1-8, 10-15 et 17) dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû au chlorure de cyanidine 3-*O*-glucoside (pic 5) dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b),

$m_1$ = masse de l'extrait à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse d'*extrait sec de myrtille SCR* utilisée pour préparer la solution témoin (b), en grammes,

$p$ = teneur pour cent en chlorure de cyanidine 3-*O*-glucoside dans l'*extrait sec de myrtille SCR*.

**01/2008:1588**
**corrigé 6.0**

# MYRTILLE (FRUIT SEC DE)

## Myrtilli fructus siccus

DÉFINITION

Fruit mûr séché de *Vaccinium myrtillus* L.

*Teneur* : au minimum 1,0 pour cent de tanins, exprimés en pyrogallol ($C_6H_6O_3$ ; $M_r$ 126,1) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Saveur douce, un peu astringente.

IDENTIFICATION

A. Le fruit sec de myrtille est une baie bleu-noir ratatinée, subglobuleuse, de 5 mm environ de diamètre avec une cicatrice à la base. Le sommet est surmonté par les restes du style et le calice persistant, qui forme un repli circulaire. Le mésocarpe violet intense et charnu renferme de nombreuses petites graines ovoïdes, brunes.

B. Réduisez le fruit sec de myrtille en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-violet. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente des cellules scléreuses, rose-violet, à paroi épaisse canaliculée, généralement en amas et provenant de l'endocarpe et du mésocarpe ; des fragments d'épicarpe colorés en brun-rouge, formés de cellules polygonales à paroi légèrement épaissie ; des fragments jaune-brun du tégument externe de la graine, composés de cellules allongées, à paroi présentant des épaississements en forme de fer à cheval ; des macles et des prismes de cristaux d'oxalate de calcium de différente taille.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 2 g de fruit sec de myrtille pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 20 mL de *méthanol R*. Agitez pendant 15 min et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *chrysanthémine R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, butanol R* (16:19:65 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande rouge-violet de faible intensité. |
| Chrysanthémine : une bande rouge- violet | Une bande principale rouge-violet. |
| | Un ensemble compact d'autres bandes principales :<br>– une bande rouge-violet<br>– plusieurs bandes bleu-violet |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de fruit sec de myrtille pulvérisé.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 5,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des tanins dans les drogues végétales (*2.8.14*). Utilisez 1,500 g de fruit sec de myrtille pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**01/2008:1175**

# NÉROLI (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Neroli aetheroleum

DÉFINITION

L'huile essentielle de néroli est obtenue par entraînement à la vapeur d'eau à partir des fleurs fraîches de *Citrus aurantium* L. subsp. *aurantium* L. (*C. aurantium* L. subsp. *amara* Engl.).

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, jaune pâle ou jaune foncé.

Odeur caractéristique.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du bergaptène.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Anthranilate de méthyle : une bande de fluorescence bleue | Une bande de faible fluorescence bleue (anthranilate de méthyle) |
| Bergaptène : une bande de fluorescence jaune-vert | |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez la *solution d'aldéhyde anisique R* ; chauffez à 100-105 °C pendant 10 min ; examinez les chromatogrammes en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, la bande due au linalol est plus intense que la bande due à l'acétate de linalyle.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence brune |
| Acétate de linalyle : une bande de fluorescence rouge-brun | Une bande de fluorescence rouge-brun (acétate de linalyle) |
| _______ | _______ |
| Anthranilate de méthyle : une bande de fluorescence bleue | Une bande de faible fluorescence bleue (anthranilate de méthyle) |
| | Une bande de faible fluorescence rouge-brun |
| Linalol : une bande de fluorescence rouge-brun | Une bande d'intense fluorescence rouge-brun (linalol) |
| Bergaptène : une bande de fluorescence jaune-vert | |
| _______ | _______ |
| | Plusieurs bandes de fluorescence bleue et rouge-brun |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics principaux du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,863 à 0,880.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,464 à 1,474.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : + 1,5° à + 11,5°.

**Indice d'acide** (*2.5.1*) : au maximum 2,0.

**Bergaptène**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,1 g d'huile essentielle de néroli dans de l'*éthanol à 96 pour cent R* et complétez à 5,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 2 µL d'*anthranilate de méthyle R*, 10 µL d'*acétate de linalyle R*, 20 µL de *linalol R* et 5 mg de *bergaptène R* dans de l'*éthanol à 96 pour cent R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (15:85 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 2 µL], en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 8 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande correspondant à la bande du bergaptène dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner.* L'huile essentielle de néroli.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 20 µL de *β-pinène R,* 5 mg de *sabinène R,* 40 µL de *limonène R,* 40 µL de *linalol R,* 20 µL d'*acétate de linalyle R,* 5 mg d'*α-terpinéol R,* 5 µL d'*acétate de néryle R,* 5 µL d'*acétate de géranyle R,* 5 µL de *trans-nérolidol R,* 5 µL d'*anthranilate de méthyle R* et 5 µL *(E,E)-farnésol R* dans 2 mL d'*heptane R.*

*Solution témoin (b).* Dissolvez 5 µL d'*anthranilate de méthyle R* dans de l'*heptane R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Colonne* :
– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 60 m, Ø = 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur du film 0,25 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R.*

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Rapport de division* : 1:100.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 4 | 75 |
| | 4 - 42,8 | 75 → 230 |
| | 42,8 - 63 | 230 |
| Chambre à injection | | 270 |
| Détecteur | | 270 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 0,2 µL.

*Ordre d'élution* : ordre donné pour la préparation de la solution témoin (a). Notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin (a) :
– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au β-pinène et au sabinène.

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a), localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les composants de la solution témoin (a).

*Limites* :
– *β-pinène* : 7,0 pour cent à 17,0 pour cent,
– *limonène* : 9,0 pour cent à 18,0 pour cent,
– *linalol* : 28,0 pour cent à 44,0 pour cent,
– *acétate de linalyle* : 2,0 pour cent à 15,0 pour cent,
– *α-terpinéol* : 2,0 pour cent à 5,5 pour cent,
– *acétate de néryle* : maximum 2,5 pour cent,
– *acétate de géranyle* : 1,0 pour cent à 5,0 pour cent,
– *trans-nérolidol* : 1,0 pour cent à 5,0 pour cent,
– *anthranilate de méthyle* : 0,1 pour cent à 1,0 pour cent,
– *(E,E)-farnésol* : 0,8 pour cent à 4,0 pour cent,
– *limite d'exclusion* : la surface du pic du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b).

**Pureté chirale**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*).

*Solution à examiner.* Dissolvez 20 mg d'huile essentielle de néroli dans du *pentane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin.* A 10 µL de *linalol R,* ajoutez 10 µL d'*acétate de linalyle R* puis complétez à 10,0 mL avec du *pentane R.*

*Colonne* :
– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 25 m, Ø = 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *β-cyclodextrine modifiée pour chromatographie chirale R* (épaisseur du film 0,25 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R.*

*Débit* : 1,3 mL/min.

*Rapport de division* : 1:30.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 65 | 50 → 180 |
| Chambre à injection | | 230 |
| Détecteur | | 230 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL.

*Conformité du système* : solution témoin :
– *résolution* : au minimum 5,5 entre les pics dus au (*R*)(−)-linalol (1[er] pic) et au (*S*)(+)-linalol (2[e] pic), au minimum 2,7 entre les pics dus à l'acétate de (*R*)(−)-linalyle (3[e] pic) et à l'acétate de (S)(+)-linalyle (4[e] pic).

Calculez la teneur pour cent en énantiomères (*S*) spécifiés à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1}{A_1 + A_2} \times 100$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'énantiomère (*S*) correspondant,

$A_2$ = surface du pic dû à l'énantiomère (*R*) correspondant.

*Limites* :
– *(S)(+)-linalol* : au maximum 30 pour cent,
– *acétate de (S)(+)-linalyle* : au maximum 5 pour cent.

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

**01/2008:1552**
**corrigé 7.0**

# NOIX MUSCADE (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Myristicae fragrantis aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau des noix séchées et broyées de *Myristica fragrans* Houtt.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide incolore ou jaune pâle.

Odeur épicée.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Dissolvez 1 mL d'huile essentielle à examiner dans du *toluène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin.* Dissolvez 20 µL de *myristicine R* dans 10 mL de *toluène R.*

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez du *réactif à la vanilline R*, chauffez à 100-105 °C pendant 10 min et examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente dans son tiers supérieur une bande rosâtre ou brun-rouge (myristicine). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une série de bandes dont 1 est semblable quant à sa position et sa coloration à la bande du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Au-dessus de cette bande se situent 1 bande brunâtre (safrole) et 1 bande violette (hydrocarbures). En-dessous de la bande de la myristicine 5 bandes bleues d'intensité variable apparaissent.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics principaux du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,885 à 0,905.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,475 à 1,485.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : + 8° à + 18°.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. L'huile essentielle à examiner.

*Solution témoin*. Dissolvez 15 µL de *α-pinène R*, 15 µL de *β-pinène R*, 15 µL de *sabinène R*, 5 µL de *car-3-ène R*, 5 µL de *limonène R*, 5 µL de *γ-terpinène R*, 5 µL de *terpinén-4-ol R*, 5 µL de *safrole R* et 10 µL de *myristicine R* dans 1 mL d'*hexane R*.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 25-60 m, Ø = environ 0,3 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* à phase greffée.

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Rapport de division* : 1:100.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 10 | 50 |
| | 10 - 75 | 50 → 180 |
| | 75 - 130 | 180 |
| Chambre à injection | | 200 - 220 |
| Détecteur | | 240 - 250 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 0,2 µL.

*Ordre d'élution* : ordre donné pour la préparation de la solution témoin. Notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au β-pinène et au sabinène.

*Identification des composants* : à l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les composants de la solution témoin.

Déterminez la teneur pour cent de chacun de ces composants. Ces teneurs sont comprises entre les valeurs suivantes :

– *α-pinène* : 15 pour cent à 28 pour cent,
– *β-pinène* : 13 pour cent à 18 pour cent,
– *sabinène* : 14 pour cent à 29 pour cent,
– *car-3-ène* : 0,5 pour cent à 2,0 pour cent,
– *limonène* : 2,0 pour cent à 7,0 pour cent,
– *γ-terpinène* : 2,0 pour cent à 6,0 pour cent,
– *terpinén-4-ol* : 2,0 pour cent à 6,0 pour cent,
– *safrole* : au maximum 2,5 pour cent,
– *myristicine* : 5,0 pour cent à 12,0 pour cent.

CONSERVATION

A l'abri de la chaleur.

**01/2008:2383**

# NOTOGINSENG (RACINE DE)

## Notoginseng radix

DÉFINITION

Racine principale traitée à la vapeur et séchée, entière ou fragmentée, sans racines secondaires, de *Panax pseudoginseng* Wall. var. *notoginseng* (Burk.) Hoo et Tseng [*Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen ex C.Y. Wu et K.M. Feng].

*Teneur* : au minimum 3,8 pour cent pour la somme des ginsénosides Rg1 ($C_{42}H_{72}O_{14},2H_2O$ ; $M_r$ 837) et Rb1 ($C_{54}H_{92}O_{23},3H_2O$ ; $M_r$ 1163) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La racine principale est conique, subconique ou cylindrique. Elle peut atteindre jusqu'à 6 cm de long et 4 cm de diamètre. La surface externe, parcourue de stries transversales peu profondes et de cicatrices des racines secondaires, est gris-brun ou gris-jaune. Au niveau du collet, la cicatrice de la tige aérienne est entourée de protubérances verruqueuses. La texture de la racine de notoginseng est compacte. La cassure est lisse, brillante, gris-brun, et présente un anneau gris-jaune (zone cambiale) et de nombreuses stries rayonnantes.

B. Réduisez la racine de notoginseng en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est gris-jaune clair. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments abondants de cellules parenchymateuses à parois fines ; des fragments de canaux sécréteurs contenant une résine brun-jaune ; de rares vaisseaux de bois à ornementation réticulée ou ponctuée, d'un diamètre d'environ 30 µm ; de rares fragments de suber. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. Les grains d'amidon, souvent déformés, simples ou composés de 2-3 éléments, sont très abondants et d'un diamètre de 1-10 µm.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de *Panax ginseng* ou *Panax quinquefolium*.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Drogues végétales

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande violette (au front du solvant) |
| | Une bande violette |
| Arbutoside : une bande brune | |
| _______ | _______ |
| | Une bande violette (ginsénosides Rg1 + Rg2) |
| | 2 bandes violettes |
| | 2 faibles bandes violettes |
| _______ | _______ |
| Aescine : une bande grise | Une bande violette |
| | Plusieurs bandes violettes et verdâtres |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

***Panax ginseng*** **ou** ***Panax quinquefolium***. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Chauffez à reflux, 1,0 g de racine de notoginseng pulvérisée (355) (*2.9.12*) avec 10 mL d'une solution de *méthanol R* à 70 pour cent *V/V* pendant 15 min. Filtrez après refroidissement et complétez à 10,0 mL avec du *méthanol R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 5,0 mg d'*aescine R* et 5,0 mg d'*arbutoside R* dans 1 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, eau R, butanol R,* (25:50:100 *V/V/V*) ; laissez reposer pendant 10 min et utilisez la phase supérieure.

*Dépôt* : 20 µL, en bandes de 15 mm [ou 4 µL de solution à examiner et 2 µL de solution témoin, en bandes de 8 mm].

*Développement* : dans une cuve non saturée, sur un parcours de 10 cm [ou 5 cm].

*Séchage* : à l'air pendant 30 min.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 105-110 °C pendant 5-10 min ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : l'absence de bande violette dans le chromatogramme obtenue avec la solution à examiner immédiatement au dessus de la bande due à l'arbutoside dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin laisse supposer la présence de *Panax ginseng*. La présence d'un bande brune immédiatement au dessous de la bande violette dus aux ginsénosides Rg1 + Rg2 dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner laisse supposer la présence de *Panax quinquefolium*.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de racine de notoginseng pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 6,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 1,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Réduisez environ 50 g de racine de notoginseng en poudre (355) (*2.9.12*). Dans un ballon à fond rond de 250 mL, introduisez 0,250 g de racine de notoginseng pulvérisée et 70 mL d'une solution de *méthanol R* à 50 pour cent *V/V*. Après addition de quelques grains de pierre ponce, chauffez à ébullition à reflux au bain-marie pendant 1 h. Après refroidissement, centrifugez et recueillez le surnageant. Traitez le résidu comme précédemment. Mélangez les liquides recueillis et évaporez à siccité, sous pression réduite, à une température ne dépassant pas 60 °C. Reprenez le résidu avec 10,0 mL d'une solution tampon, ajustée à pH 4,5, composée de 3,5 g de *phosphate monosodique R* et de 7,2 g de *phosphate monopotassique R* dans 1000 mL d'*eau R* (solution A). Lavez une cartouche d'environ 0,36 g de *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* avec 5 mL de *méthanol R*, puis 20 mL d'*eau pour chromatographie R*. Déposez 5,0 mL de solution A sur la cartouche. Rincez avec 20 mL d'*eau pour chromatographie R*, puis avec 15 mL d'une solution de *méthanol R* à 30 pour cent *V/V*. Rejetez les éluats après avoir vérifié qu'ils ne contiennent pas de ginsénosides, sinon recommencez le dosage avec une autre référence de cartouche. Eluez la cartouche avec 20 mL de *méthanol R* et évaporez l'éluat à siccité. Reprenez le résidu avec 5,0 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 3,0 mg de *ginsénoside Rb1 R*, 3,0 mg de *ginsénoside Rg1 R* et 3,0 mg de *ginsénoside Rf R* dans du *méthanol R*, puis complétez à 5,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,10 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice aminopropylsilylé pour chromatographie R* (3 µm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acétonitrile R,*
– *phase mobile B* : *eau pour chromatographie R,*

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 14 | 90 | 10 |
| 14 - 18 | 90 → 80 | 10 → 20 |
| 18 - 55 | 80 | 20 |

*Débit* : 2 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 203 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 3,0 entre les pics dus aux ginsénosides Rf et Rg1.

Calculez la somme des teneurs pour cent en ginsénosides Rb1 et Rg1 à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times 2 \times p_1}{m_1 \times A_3} + \frac{A_2 \times m_3 \times 2 \times p_2}{m_1 \times A_4}$$

$A_1$ = surface du pic dû au ginsénoside Rb1 dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû au ginsénoside Rg1 dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_3$ = surface du pic dû au ginsénoside Rb1 dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$A_4$ = surface du pic dû au ginsénoside Rg1 dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai desséchée, en grammes,

$m_2$ = masse de *ginsénoside Rb1 R* dans la solution témoin, en grammes,

$m_3$ = masse de *ginsénoside Rg1 R* dans la solution témoin, en grammes,

$p_1$ = teneur pour cent en ginsénoside Rb1 dans le *ginsénoside Rb1 R*,

$p_2$ = teneur pour cent en ginsénoside Rg1 dans le *ginsénoside Rg1 R*.

**01/2009:1878**

# OLIVIER (FEUILLE D')

## Oleae folium

DÉFINITION

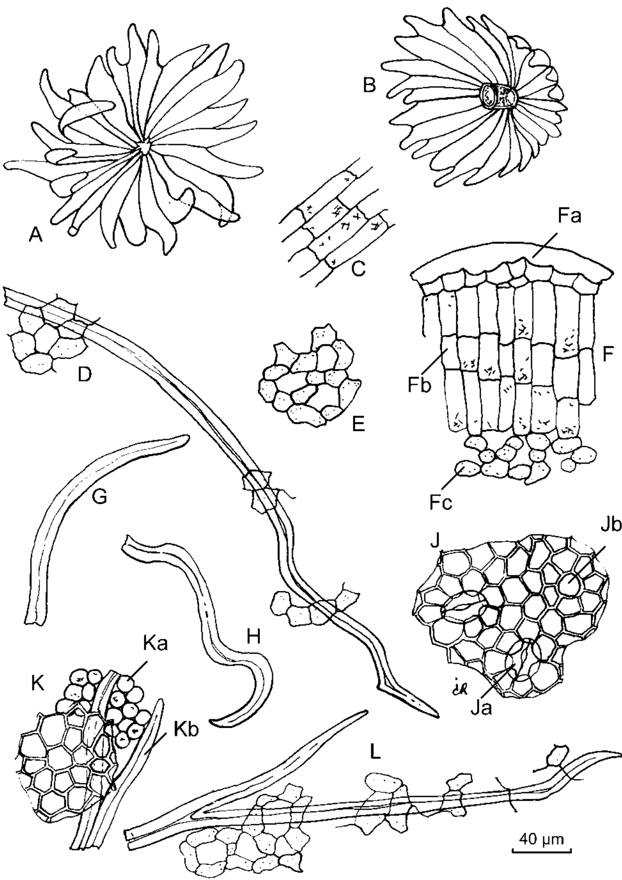
Feuille séchée d'*Olea europaea* L.

*Teneur* : au minimum 5,0 pour cent d'oleuropéine ($C_{25}H_{32}O_{13}$ ; $M_r$ 540,5) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La feuille est simple, épaisse et coriace, lancéolée à obovale, d'une longueur de 30-50 mm et d'une largeur de 10-15 mm ; elle possède un apex mucroné et se rétrécit à la base en un court pétiole ; les bords sont entiers et réfléchis sur la face abaxiale. La face supérieure est de couleur vert-gris, lisse et luisante ; la face inférieure est plus claire et pubescente, surtout le long de la nervure médiane et des principales nervures latérales.

B. Réduisez la feuille d'olivier en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la solution d'*hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments d'épiderme vus de face, à petites cellules polygonales à paroi épaisse et, sur l'épiderme inférieur uniquement, à petits stomates anomocytiques (*2.8.3*) ; des fragments de limbe vus en coupe présentant une cuticule épaisse, 3 assises de cellules palissadiques et un parenchyme lacuneux à petites cellules ; de nombreuses sclérites à paroi très épaisse et pour la plupart semblables à des fibres se terminant en pointe émoussée ou parfois fourchée, isolées ou associées au parenchyme du mésophylle ; de nombreux poils peltés en écusson, de très grande taille, formés d'un pédicelle unicellulaire central à partir duquel rayonnent environ 10-30 cellules à paroi mince qui se séparent des cellules adjacentes sur les bords de l'écusson, lui donnant ainsi un aspect dentelé irrégulier.




A. Poil pelté en écusson, vu de dessus

B. Poil pelté en écusson, vu de dessous

C. Parenchyme palissadique

D, G, H et L. Sclérites semblables à des fibres, accompagnés pour certains de fragments du parenchyme du mésophylle lacuneux

E. Parenchyme lacuneux

F. Fragment du limbe, vu en section transversale, présentant une cuticule épaisse (Fa), du parenchyme palissadique composé de 3 assises cellulaires (Fb) et du parenchyme lacuneux (Fc)

J. Fragment d'épiderme inférieur avec des stomates anomocytiques (Ja) et cicatrice de poil pelté (Jb)

K. Fragment d'épiderme supérieur, vu de face, avec parenchyme palissadique sous-jacent (Ka) et de sclérites du mésophylle lacuneux (Kb)

Figure 1878.-1. – *Dessin pour l'identification de la feuille d'olivier (voir Identification B)*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de feuille d'olivier pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Chauffez à reflux pendant 15 min. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg d'*oleuropéine R* et 1 mg de *rutine R* dans 1 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R, chlorure de méthylène R* (1,5:15:85 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez du *réactif à la vanilline R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5 min ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande bleu-violet foncé (front du solvant)<br>Une bande bleu-violet foncé |
| _______ | _______ |
| Oleuropéine : une bande vert-brun | Une bande vert-brun (oleuropéine) |
| _______ | _______ |
| Rutine : une bande jaune-brun | |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de feuille d'olivier pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 9,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Dans un flacon, introduisez 1,000 g de feuille d'olivier pulvérisée (355) (*2.9.12*) et ajoutez 50 mL de *méthanol R*. Chauffez dans un bain-marie à 60 °C pendant 30 min, en agitant. Laissez refroidir et filtrez dans une fiole jaugée de 100 mL. Rincez la fiole et le filtre avec du *méthanol R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Prélevez 2,5 mL de cette solution et complétez à 25,0 mL avec de l'*eau R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 5,0 mg d'*oleuropéine SCR* dans 5,0 mL de *méthanol R*. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 25,0 mL avec de l'*eau R*.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,15 m, Ø = 3,9 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
– *température* : 25 °C.

Drogues végétales

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : prélevez 1,0 mL d'*acide acétique glacial R* et complétez à 100 mL avec de l'*eau R*,
– *phase mobile B* : *méthanol R*,

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 5 | 85 → 40 | 15 → 60 |
| 5 - 12 | 40 → 20 | 60 → 80 |
| 12 - 15 | 20 → 85 | 80 → 15 |

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 254 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Temps de rétention* : oleuropéine = environ 9 min.

Calculez la teneur pour cent en oleuropéine à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 8}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'oleuropéine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'oleuropéine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai dans la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse d'*oleuropéine SCR* dans la solution témoin, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en oleuropéine dans l'*oleuropéine SCR*.

**04/2009:2313**

# OLIVIER (FEUILLE D'), EXTRAIT SEC DE

## Oleae folii extractum siccum

DÉFINITION

Extrait sec produit à partir de *Feuille d'olivier (1878)*.

*Teneur* : au minimum 16,0 pour cent d'oleuropéine ($C_{25}H_{32}O_{13}$ ; $M_r$ 540,5) (extrait desséché).

PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec de l'éthanol à 65-96 pour cent *V/V*.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre amorphe, brun-vert ou brune.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 0,25 g d'extrait à examiner, ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Traitez aux ultrasons pendant 15 min et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg d'*oleuropéine R* et 1 mg de *rutine R* dans 1 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *eau R, acide formique anhydre R, acétate d'éthyle R* (7:13:80 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 2 µL] en bandes de 10 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande bleu-violet foncé |
| ——— | ——— |
| Oleuropéine : une bande vert-brun | Une bande vert-brun (oleuropéine) |
| ——— | ——— |
| Rutine : une bande jaune | |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.8.17*) : au maximum 8,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*). *Préparez les solutions immédiatement avant l'emploi.*

*Solution à examiner*. A 0,250 g d'extrait à examiner, ajoutez 50 mL de *méthanol R*. Traitez aux ultrasons pendant 15 min et filtrez dans une fiole jaugée de 100 mL. Rincez le ballon et le filtre avec 2 mL de *méthanol R* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 10,0 mg d'*oleuropéine SCR* dans 10,0 mL de *méthanol R* et complétez à 25,0 mL avec de l'*eau R*.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 4 mg de *rutine R* dans 10 mL de solution témoin (a).

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,15 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie R* (5 µm),
– *température* : 25 °C.

*Phase mobile* : *acide trifluoracétique R, méthanol R, eau R* (1:400:600 *V/V/V*).

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 233 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Enregistrement* : 2 fois le temps de rétention de l'oleuropéine.

*Rétention relative* par rapport à l'oleuropéine (temps de rétention = environ 11 min) : rutine = environ 0,7.

*Conformité du système* : solution témoin (b) :

– *résolution* : au minimum 3,0 entre les pics dus à la rutine et de l'oleuropéine.

Calculez la teneur pour cent en oleuropéine à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 4}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'oleuropéine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'oleuropéine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),

$m_1$ = masse de la prise d'essai à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse d'*oleuropéine SCR* utilisée pour préparer la solution témoin (a), en grammes,

$p$ = teneur pour cent en oleuropéine de l'*oleuropéine SCR*.

**01/2008:0777**
**corrigé 6.0**

# OPIUM BRUT

## Opium crudum

DÉFINITION

*L'opium brut n'est destiné qu'à servir de matière première dans la fabrication de préparations galéniques. Il n'est pas délivré tel quel.*

Latex séché à l'air, obtenu par incision des capsules encore vertes de *Papaver somniferum* L.

*Teneur* :

– *morphine* ($C_{17}H_{19}NO_3$ ; $M_r$ 285,3) : au minimum 10,0 pour cent (drogue desséchée),

– *codéine* ($C_{18}H_{21}NO_3$ ; $M_r$ 299,4) : au minimum 2,0 pour cent (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Odeur caractéristique.

*Aspect* : masses brun-noir de taille variable, plus ou moins molles, brillantes, devenant dures et cassantes après séchage.

IDENTIFICATION

*Enlevez l'enrobage éventuel, divisez l'opium brut en tranches minces, si nécessaire desséchez à une température voisine de 60 °C pendant 48 h et pulvérisez (500) (2.9.12).*

A. Examinée au microscope, une suspension d'opium brut dans une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 20 g/L présente les éléments suivants : des granulations de latex agglomérées en masses irrégulières et des filaments allongés brun-clair. Quelques débris de vaisseaux et des cristaux réfringents plus ou moins allongés sont également visibles, ainsi que, en quantité moins importante, des grains de pollen arrondis et des débris de fibres allongés. Des poils de taille variable à pointe effilée et des grains d'amidon en petit nombre, introduits lors de la manipulation du latex, peuvent être présents. Des fragments d'épicarpe formés de cellules polygonales à paroi épaisse, délimitant un lumen étoilé, peuvent également être présents.

B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Triturez 0,10 g d'opium brut pulvérisé avec 5 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*, ajoutez 3 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R* et transvasez dans une fiole conique de 25 mL. Chauffez dans un bain-marie à 50-60 °C en agitant pendant 30 min. Refroidissez, filtrez, lavez le filtre avec de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R* et complétez le filtrat à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin.* Dissolvez 2,0 mg de *chlorhydrate de papavérine R*, 12,0 mg de *phosphate de codéine R*, 12,0 mg de *chlorhydrate de noscapine R* et 25,0 mg de *chlorhydrate de morphine R* dans de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R* et complétez à 25,0 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R.*

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, éthanol à 96 pour cent R, acétone R, toluène R* (2:6:40:40 *V/V/V/V*) : utilisez un mélange récemment préparé.

*Dépôt* : 20 µL, en bandes de 20 mm sur 3 mm.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C pendant 15 min et laissez refroidir.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'iodobismuthate de potassium R2*, puis une solution d'*acide sulfurique R* à 4 g/L.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente dans sa partie inférieure une bande rouge orangé ou rouge (morphine) surmontée d'une bande de coloration similaire (codéine) et, dans sa partie supérieure, une bande rouge orangé ou rouge (papavérine) surmontée d'une bande de coloration similaire (noscapine). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente des bandes rouge orangé ou rouges au même niveau que celles du chromatogramme obtenu avec la solution témoin et peut également présenter une bande rouge foncé (thébaïne) située entre la bande due à la codéine et celle due à la papavérine.

C. A 1,0 g d'opium brut pulvérisé, ajoutez 5 mL d'*eau R* et agitez pendant 5 min, puis filtrez. Au filtrat, ajoutez 0,25 mL de *solution de chlorure ferrique R2.* Il se développe une coloration rouge qui ne disparaît pas par addition de 0,5 mL d'*acide chlorhydrique dilué R.*

ESSAI

**Thébaïne**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Mettez en suspension 1,00 g d'opium brut, découpé en tranches minces, dans 50 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R*, mélangez à l'aide d'ultrasons pendant 1 h, laissez refroidir et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Laissez reposer. A 10,0 mL du surnageant, ajoutez 5 mL de *solution tampon chlorure d'ammonium pH 9,5 R*, complétez à 25,0 mL avec de l'*eau R* et mélangez. Transférez 20,0 mL de cette solution dans une colonne chromatographique d'une longueur d'environ 0,15 m et d'un diamètre intérieur d'environ 30 mm, remplie de 15 g de *kieselguhr pour chromatographie R*. Laissez reposer pendant 15 min. Eluez avec 2 fois 40 mL d'un mélange de 15 volumes de *2-propanol R* et de 85 volumes de *chlorure de méthylène R.* Evaporez l'éluat à siccité, sous vide, à 40 °C. Transférez le résidu dans une fiole jaugée à l'aide de la phase mobile et complétez à 25,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin.* Dissolvez 25,0 mg de *thébaïne R* dans la phase mobile et complétez à 25,0 mL avec la phase mobile, puis prélevez 10,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec la phase mobile.

*Précolonne* :

– *dimensions* : *l* = 4 mm, Ø = 4,0 mm,

– *phase stationnaire* : *gel de silice octylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,

– *phase stationnaire* : *gel de silice octylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : dissolvez 1,0 g d'*heptanesulfonate de sodium monohydraté R* dans 420 mL d'*eau R*, ajustez à pH 3,2 à l'aide d'acide phosphorique à 4,9 g/L de $H_3PO_4$ (environ 5 mL) et ajoutez 180 mL d'*acétonitrile R.*

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 280 nm.

*Injection* : le volume choisi de chaque solution avec un injecteur à boucle.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *nombre de plateaux théoriques* : au minimum 3000 ;

– *coefficient de distribution massique* : au minimum 3,0 pour le pic dû à la thébaïne.

Drogues végétales

Calculez la teneur pour cent de l'alcaloïde à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{m_1 \times A_2 \times 625}{m_2 \times A_1 \times 5} \times \frac{100}{100 - h}$$

$m_1$ = masse de l'alcaloïde utilisée dans la préparation de la solution témoin, en grammes,

$m_2$ = masse de l'opium brut utilisée dans la préparation de la solution à examiner, en grammes,

$A_1$ = surface du pic dû à l'alcaloïde dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$A_2$ = surface du pic dû à l'alcaloïde dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$h$ = perte à la dessiccation, en pour cent.

*Limite* :

– *thébaïne* : au maximum 3,0 pour cent (drogue desséchée).

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 15,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 4 h sur 1,000 g d'opium brut, découpé en tranches minces.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 6,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai de la thébaïne avec les modifications suivantes.

*Solution témoin.* Dissolvez 0,100 g de *chlorhydrate de morphine R* et 25,0 mg de *codéine R* dans la phase mobile, puis complétez à 25,0 mL avec la phase mobile. Prélevez 10,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec la phase mobile.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 2,5 entre les pics dus à la morphine et à la codéine ; si nécessaire, ajustez la quantité d'acétonitrile dans la phase mobile ;
– *répétabilité* : écart type relatif de la surface du pic dû à la morphine au maximum de 1,0 pour cent après 6 injections.

Calculez la teneur pour cent en morphine et en codéine à l'aide de l'expression donnée dans l'essai de la thébaïne.

Pour le calcul, 1 mg de *chlorhydrate de morphine R* correspond à 0,759 mg de morphine et 1 mg de *codéine R* correspond à 0,943 mg de codéine.

**01/2008:1839**
**corrigé 6.0**

# OPIUM (EXTRAIT SEC TITRÉ D')

## Opii extractum siccum normatum

DÉFINITION

Extrait sec titré produit à partir d'*Opium brut (0777).*

*Teneur* :

– *morphine* ($C_{17}H_{19}NO_3$ ; $M_r$ 285,3) : 19,6 pour cent à 20,4 pour cent (extrait desséché),
– *codéine* ($C_{18}H_{21}NO_3$ ; $M_r$ 299,4) : au minimum 2,0 pour cent (extrait desséché),

Teneur ajustée, si nécessaire, avec un excipient approprié (lactose, dextrine, par exemple).

PRODUCTION

L'extrait sec titré d'opium est produit à partir de la drogue et d'eau par une méthode appropriée.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre brune amorphe.

IDENTIFICATION

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Triturez 0,05 g d'extrait à examiner avec 5 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Transvasez dans une fiole conique de 25 mL. Rincez avec 3 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R* et transvasez dans la même fiole conique de 25 mL. Chauffez dans un bain-marie à 50-60 °C en agitant pendant 30 min. Refroidissez, filtrez, lavez le filtre avec de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R* et complétez le filtrat et les eaux de lavage à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin.* Dissolvez 5 mg de *chlorhydrate de morphine R* dans la solution préparée comme suit et complétez à 5 mL avec la même solution : dissolvez 2 mg de *chlorhydrate de papavérine R*, 12 mg de *phosphate de codéine R* et 12 mg de *chlorhydrate de noscapine R* dans de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R* et complétez à 25 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, éthanol à 96 pour cent R, acétone R, toluène R* (2:6:40:40 *V/V/V/V*). Utilisez un mélange récemment préparé.

*Dépôt* : 20 µL [ou 6 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 8 cm].

*Séchage* : à 100-105 °C pendant 15 min.

*Détection* : laissez refroidir et pulvérisez de la *solution d'iodobismuthate de potassium R2* puis une solution d'*acide sulfurique R* à 4 g/L ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Une bande rouge foncé (thébaïne) située entre la bande due à la codéine et celle due à la papavérine peut être présente dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Noscapine : une bande rouge-orange ou rouge | Une bande rouge-orange ou rouge (noscapine) |
| Papavérine : une bande rouge-orange ou rouge | Une bande rouge-orange ou rouge (papavérine) |
| Codéine : une bande rouge-orange ou rouge | Une bande rouge-orange ou rouge (codéine) |
| Morphine : une bande rouge-orange ou rouge | Une bande rouge-orange ou rouge (morphine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. A 0,5 g d'extrait à examiner, ajoutez 5 mL d'*eau R*, agitez pendant 5 min et filtrez. Au filtrat, ajoutez 0,25 mL de *solution de chlorure ferrique R2*. Il se développe une coloration rouge qui ne disparaît pas par addition de 0,5 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*.

ESSAI

**Thébaïne**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Mettez en suspension 0,500 g d'extrait à examiner dans 50 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R*, mélangez à l'aide d'ultrasons pendant 1 h, laissez refroidir et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Laissez reposer. A 10,0 mL du surnageant, ajoutez 5 mL de *solution tampon chlorure d'ammonium pH 9,5 R*, complétez à 25,0 mL avec de l'*eau R* et mélangez. Transférez 20,0 mL de cette solution dans une colonne chromatographique d'une longueur d'environ 0,15 m et d'un diamètre intérieur d'environ 30 mm, remplie de 15 g de *kieselguhr pour chromatographie R*. Laissez reposer pendant 15 min. Eluez avec 2 fois 40 mL d'un mélange de 15 volumes de *2-propanol R* et de 85 volumes de *chlorure de méthylène R*. Evaporez l'éluat à siccité sous vide à 40 °C. Transférez le résidu dans une fiole jaugée à l'aide de la phase mobile et complétez à 25,0 mL avec la phase mobile.

Drogues végétales

*Solution témoin (a).* Dissolvez 5,0 mg de *thébaïne SCR* dans la phase mobile et complétez à 50,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 12,0 mg de *chlorhydrate de morphine SCR* dans la phase mobile et complétez à 15,0 mL avec la phase mobile (solution A). Dissolvez 10,0 mg de *codéine SCR* dans la phase mobile et complétez à 50,0 mL avec la phase mobile. A 10,0 mL de cette solution ajoutez 10,0 mL de solution A et mélangez.

*Précolonne* :

– *dimensions* : $l$ = 4 mm, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : dissolvez 1,0 g d'*heptanesulfonate de sodium monohydraté R* dans 420 mL d'*eau R*, ajustez à pH 3,2 avec une solution d'*acide phosphorique R* à 4,9 g/L et ajoutez 180 mL d'*acétonitrile R*.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 280 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Conformité du système* :

– *résolution* : au minimum 2,5 entre les pics dus à la morphine et à la codéine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b),
– *coefficient de distribution massique* : au minimum 3,0 pour le pic dû à la thébaïne dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

Calculez la teneur pour cent en thébaïne à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times F \times p}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'alcaloïde considéré dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'alcaloïde considéré dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai de l'extrait à examiner dans la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse de la prise d'essai d'alcaloïde considéré dans la solution témoin, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en alcaloïde dans l'alcaloïde SCR considéré,

$F$ = 6,250 pour la détermination de la thébaïne.

*Limite* :

– *thébaïne* : au maximum 6,0 pour cent (extrait desséché).

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 5,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 4 h sur 1,000 g d'extrait à examiner.

## DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai de la thébaïne avec les modifications suivantes.

*Injection* : solution à examiner et solution témoin (b).

*Conformité du système* :

– *répétabilité* : écart type relatif de la surface du pic dû à la morphine au maximum de 1,0 pour cent après injection de la solution témoin (b) 6 fois.

Calculez la teneur pour cent en morphine et en codéine à l'aide de l'expression indiquée dans l'essai de la thébaïne, avec $F$ = 10,417 pour la morphine et $F$ = 3,125 pour la codéine.

**01/2008:1840**
**corrigé 6.0**

# OPIUM (POUDRE TITRÉE D')

## Opii pulvis normatus

## DÉFINITION

Opium brut pulvérisé (180) (*2.9.12*) et séché à une température ne dépassant pas 70 °C.

*Teneur* :

– *morphine* ($C_{17}H_{19}NO_3$ ; $M_r$ 285,3) : 9,8 pour cent à 10,2 pour cent (drogue desséchée à 100-105 °C pendant 4 h),
– *codéine* ($C_{18}H_{21}NO_3$ ; $M_r$ 299,4) : au minimum 1,0 pour cent (drogue desséchée à 100-105 °C pendant 4 h).

Teneur ajustée, si nécessaire, avec un excipient approprié ou de l'opium brut pulvérisé.

## CARACTÈRES

*Aspect* : poudre brun-jaune ou brun foncé.

## IDENTIFICATION

A. Examinez au microscope en utilisant une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 20 g/L. La poudre titrée d'opium présente des granulations de latex agglomérées en masses irrégulières et des filaments allongés brun clair. Quelques débris de vaisseaux et des cristaux réfringents plus ou moins allongés sont également visibles, ainsi que, en quantité moins importante, des grains de pollen arrondis et des débris de fibres allongés. Des poils de taille variable, à pointe effilée peuvent être présents ainsi que des fragments d'épicarpe formés de cellules polygonales, à paroi épaisse, délimitant un lumen étoilé. Examinez au microscope en utilisant du *glycérol à 85 pour cent R*. Des particules d'excipient et un petit nombre de grains d'amidon, introduits lors de la manipulation du latex, peuvent être observés.

B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Triturez 0,10 g de poudre titrée d'opium avec 5 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*, rincez avec 3 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R* et transvasez dans une fiole conique de 25 mL. Chauffez dans un bain-marie à 50-60 °C en agitant pendant 30 min. Refroidissez, filtrez, lavez le filtre avec de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R* et complétez le filtrat à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin.* Dissolvez 2,0 mg de *chlorhydrate de papavérine R*, 12,0 mg de *phosphate de codéine R*, 12,0 mg de *chlorhydrate de noscapine R* et 25,0 mg de *chlorhydrate de morphine R* dans de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R* et complétez à 25,0 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R*.

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, éthanol à 96 pour cent R, acétone R, toluène R* (2:6:40:40 *V/V/V/V*). Utilisez un mélange récemment préparé.

*Dépôt* : 20 µL en bandes de 20 mm sur 3 mm.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C pendant 15 min.

*Détection* : laissez refroidir et pulvérisez de la *solution d'iodobismuthate de potassium R2*, puis une solution d'*acide sulfurique R* à 4 g/L ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, une bande rouge foncé (thébaïne) située entre la bande de la codéine et la bande de la papavérine peut être présente dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| Noscapine : une bande rouge-orange ou rouge | Une bande rouge-orange ou rouge (noscapine) |
| _______ | _______ |
| Papavérine : une bande rouge-orange ou rouge | Une bande rouge-orange ou rouge (papavérine) |
| _______ | _______ |
| Codéine : une bande rouge-orange ou rouge | Une bande rouge-orange ou rouge (codéine) |
| Morphine : une bande rouge-orange ou rouge | Une bande rouge-orange ou rouge (morphine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

C. A 1,0 g de poudre titrée d'opium, ajoutez 5 mL d'*eau R* et agitez pendant 5 min, puis filtrez. Au filtrat, ajoutez 0,25 mL de *solution de chlorure ferrique R2*. Il se développe une coloration rouge qui ne disparaît pas par addition de 0,5 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*.

ESSAI

**Thébaïne**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Mettez en suspension 1,00 g de poudre titrée d'opium dans 50 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R*, mélangez à l'aide d'ultrasons pendant 1 h, laissez refroidir et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Laissez reposer. A 10,0 mL du surnageant, ajoutez 5 mL de *solution tampon chlorure d'ammonium pH 9,5 R*, complétez à 25,0 mL avec de l'*eau R* et mélangez. Transférez 20,0 mL de cette solution dans une colonne chromatographique d'une longueur d'environ 0,15 m et d'un diamètre intérieur d'environ 30 mm, remplie de 15 g de *kieselguhr pour chromatographie R*. Laissez reposer pendant 15 min. Eluez avec 2 fois 40 mL d'un mélange de 15 volumes de *2-propanol R* et de 85 volumes de *chlorure de méthylène R*. Evaporez l'éluat à siccité, sous vide, à 40 °C. Transférez le résidu dans une fiole jaugée à l'aide de la phase mobile et complétez à 25,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin*. Dissolvez 25,0 mg de *thébaïne R* dans la phase mobile et complétez à 25,0 mL avec la phase mobile. Prélevez 10,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec la phase mobile.

*Précolonne* :

– *dimensions* : *l* = 4 mm, Ø = 4,0 mm,

– *phase stationnaire* : *gel de silice octylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,

– *phase stationnaire* : *gel de silice octylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : dissolvez 1,0 g d'*heptanesulfonate de sodium monohydraté R* dans 420 mL d'*eau R*, ajustez à pH 3,2 avec de l'acide phosphorique à 4,9 g/L de $H_3PO_4$ (environ 5 mL) et ajoutez 180 mL d'*acétonitrile R*.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 280 nm.

*Injection* : un volume adéquat avec un injecteur à boucle.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *coefficient de distribution massique* : au minimum 3,0 pour le pic dû à la thébaïne.

Calculez la teneur pour cent de chaque alcaloïde à l'aide de l'expression :

$$\frac{m_1 \times A_2 \times 125}{m_2 \times A_1} \times \frac{100}{100 - h}$$

$m_1$ = masse de l'alcaloïde dans la solution témoin, en grammes,

$m_2$ = masse de la prise d'essai dans la solution à examiner, en grammes,

$A_1$ = surface du pic dû à l'alcaloïde dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$A_2$ = surface du pic dû à l'alcaloïde dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$h$ = perte à la dessiccation, en pour cent.

*Limite* :

– *thébaïne* : au maximum 3,0 pour cent (drogue desséchée).

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 8,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 4 h sur 1,000 g de poudre titrée d'opium.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 6,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai de la thébaïne avec les modifications suivantes.

*Solution témoin*. Dissolvez 0,100 g de *chlorhydrate de morphine R* et 25,0 mg de *codéine R* dans la phase mobile et complétez à 25,0 mL avec la phase mobile. Prélevez 10,0 mL de solution et complétez à 100,0 mL avec la phase mobile.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 2,5 entre les pics dus à la morphine et à la codéine ; si nécessaire, ajustez la quantité d'acétonitrile dans la phase mobile,

– *répétabilité* : écart type relatif de la surface du pic dû à la morphine au maximum de 1,0 pour cent après 6 injections.

Calculez la teneur pour cent en morphine et en codéine à l'aide de l'expression donnée dans l'essai de la thébaïne. Pour le calcul, 1 mg de *chlorhydrate de morphine R* correspond à 0,759 mg de morphine et 1 mg de *codéine R* correspond à 0,943 mg de codéine.

**01/2008:1841**
**corrigé 6.0**

# OPIUM (TEINTURE TITRÉE D')

## Opii tinctura normata

DÉFINITION

Teinture titrée produite à partir d'*Opium brut (0777)*.

*Teneur* :

– *morphine* ($C_{17}H_{19}NO_3$ ; $M_r$ 285,3) : 0,95 pour cent à 1,05 pour cent,

– *codéine* ($C_{18}H_{21}NO_3$ ; $M_r$ 299,4) : au minimum 0,1 pour cent.

PRODUCTION

La teinture titrée d'opium est produite à partir de la drogue et d'éthanol à 70 pour cent *V/V* et d'eau à volumes égaux, selon une procédure appropriée.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide brun-rouge.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Prélevez 1,0 mL de teinture à examiner et complétez à 10 mL avec de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *chlorhydrate de morphine R* dans la solution préparée comme suit et complétez à 5 mL avec la même solution : dissolvez 2 mg de *chlorhydrate de papavérine R*, 12 mg de *phosphate de codéine R* et 12 mg de *chlorhydrate de noscapine R* dans de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R* et complétez à 25 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, éthanol à 96 pour cent R, acétone R, toluène R* (2:6:40:40 *V/V/V/V*). Utilisez un mélange récemment préparé.

*Dépôt* : 20 µL [ou 6 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 8 cm].

*Séchage* : à 100-105 °C pendant 15 min.

*Détection* : laissez refroidir et pulvérisez de la *solution d'iodobismuthate de potassium R2* puis une solution d'*acide sulfurique R* à 4 g/L. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Une bande rouge foncé (thébaïne) située entre la bande due à la codéine et celle due à la papavérine peut être présente dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Noscapine : une bande rouge-orange ou rouge | Une bande rouge-orange ou rouge (noscapine) |
| Papavérine : une bande rouge-orange ou rouge | Une bande rouge-orange ou rouge (papavérine) |
| Codéine : une bande rouge-orange ou rouge | Une bande rouge-orange ou rouge (codéine) |
| Morphine : une bande rouge-orange ou rouge | Une bande rouge-orange ou rouge (morphine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Ethanol** (*2.9.10*) : 31 pour cent *V/V* à 34 pour cent *V/V*.

**Thébaïne**. Chromatographie liquide (*2.2.29*)

*Solution à examiner*. Prélevez 2,000 g de teinture à examiner et complétez à 25,0 mL avec de l'*éthanol à 50 pour cent V/V R*. A 10,0 mL de cette solution, ajoutez 5 mL de *solution tampon chlorure d'ammonium pH 9,5 R*, complétez à 25,0 mL avec de l'*eau R* et mélangez. Transférez 20,0 mL de cette solution dans une colonne chromatographique d'une longueur d'environ 0,15 m et d'un diamètre intérieur d'environ 30 mm, remplie de 15 g de *kieselguhr pour chromatographie R*. Laissez reposer pendant 15 min. Eluez avec 2 fois 40 mL d'un mélange de 15 volumes de *2-propanol R* et de 85 volumes de *chlorure de méthylène R*. Evaporez l'éluat à siccité sous vide à 40 °C. Transférez le résidu dans une fiole jaugée à l'aide de la phase mobile et complétez à 25,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 5,0 mg de *thébaïne SCR* dans la phase mobile et complétez à 50,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 12,0 mg de *chlorhydrate de morphine SCR* dans la phase mobile et complétez à 15,0 mL avec la phase mobile (solution A). Dissolvez 10,0 mg de *codéine SCR* dans la phase mobile et complétez à 50,0 mL avec la phase mobile. A 10,0 mL de cette solution ajoutez 10,0 mL de solution A et mélangez.

*Précolonne* :

– *dimensions* : $l$ = 4 mm, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : dissolvez 1,0 g d'*heptanesulfonate de sodium monohydraté R* dans 420 mL d'*eau R*, ajustez à pH 3,2 avec une solution d'*acide phosphorique R* à 4,9 g/L et ajoutez 180 mL d'*acétonitrile R*.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 280 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Conformité du système* : solution témoin (b) :

– *résolution* : au minimum 2,5 entre les pics dus à la morphine et à la codéine.

Calculez la teneur pour cent en thébaïne à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times F \times p}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'alcaloïde considéré dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'alcaloïde considéré dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai de la teinture à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse de la prise d'essai d'alcaloïde considéré dans la solution témoin, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en alcaloïde dans l'alcaloïde SCR considéré,

$F$ = 1,563 pour la détermination de la thébaïne.

*Limite* :

– *thébaïne* : au maximum 0,3 pour cent.

**Résidu sec** (*2.8.16*) : au minimum 4,0 pour cent *m/m*, déterminé sur 3,00 g de teinture à examiner.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai de la thébaïne avec les modifications suivantes.

*Injection* : solution à examiner et solution témoin (b).

*Conformité du système* :

– *répétabilité* : écart type relatif de la surface du pic dû à la morphine au maximum de 1,0 pour cent après injections de la solution témoin (b) 6 fois.

Calculez la teneur pour cent en morphine et en codéine à l'aide de l'expression indiquée dans l'essai de la thébaïne, avec $F$ = 2,604 pour la morphine et $F$ = 0,781 pour la codéine.

**01/2008:1604**

# ORANGE AMÈRE (ÉPICARPE ET DE MÉSOCARPE D'), TEINTURE D'

## Aurantii amari epicarpii et mesocarpii tinctura

DÉFINITION

Teinture produite à partir d'*Epicarpe et de mésocarpe d'orange amère (1603)*.

PRODUCTION

La teinture d'épicarpe et de mésocarpe d'orange amère est produite à partir de 1 partie de drogue récemment pulvérisée (2000) (*2.9.12*) et de 5 parties d'*alcool à 70 pour cent V/V*, par un procédé approprié.

Drogues végétales

CARACTÈRES

Liquide à saveur amère.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Teinture à examiner.

*Solution témoin.* Dissolvez 1,0 mg de *naringine R* et 1,0 mg d'*acide caféique R* dans 1 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *eau R, acide formique anhydre R, acétate d'éthyle R* (10:15:75 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air, puis chauffez à l'étuve à 110-120 °C pendant 5 min.

*Détection* : pulvérisez sur la plaque chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R,* puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R.* Après 1 h, examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs d'autres bandes de fluorescence sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence bleu clair |
| | Une bande de fluorescence bleu clair |
| Acide caféique : une bande de fluorescence bleu clair | |
| | Une bande de fluorescence bleu clair |
| | Une bande de fluorescence bleu clair |
| Naringine : une bande de fluorescence vert foncé | Une bande de fluorescence vert foncé (naringine) |
| | Une bande de fluorescence rouge (néoériocitrine) |
| | Une bande de fluorescence orange |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

DOSAGE

**Ethanol** (*2.9.10*) : 63 pour cent à 67 pour cent *V/V.*

**Méthanol et 2-propanol** (*2.9.11*) : au maximum 0,05 pour cent *V/V* de méthanol et au maximum 0,05 pour cent *V/V* de 2-propanol.

**Résidu sec** : au minimum 6,0 pour cent *m/m,* déterminé sur 2,00 g de teinture à examiner.

**01/2009:1603**

# ORANGE AMÈRE (ÉPICARPE ET MÉSOCARPE D')

## Aurantii amari epicarpium et mesocarpium

DÉFINITION

Epicarpe et mésocarpe séchés du fruit mûr de *Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium* (*C. aurantium* L. ssp. *amara* Engl.) en partie exempts de tissu blanc lacuneux provenant du mésocarpe et de l'endocarpe.

*Teneur* : au minimum 20 mL/kg d'huile essentielle (drogue anhydre).

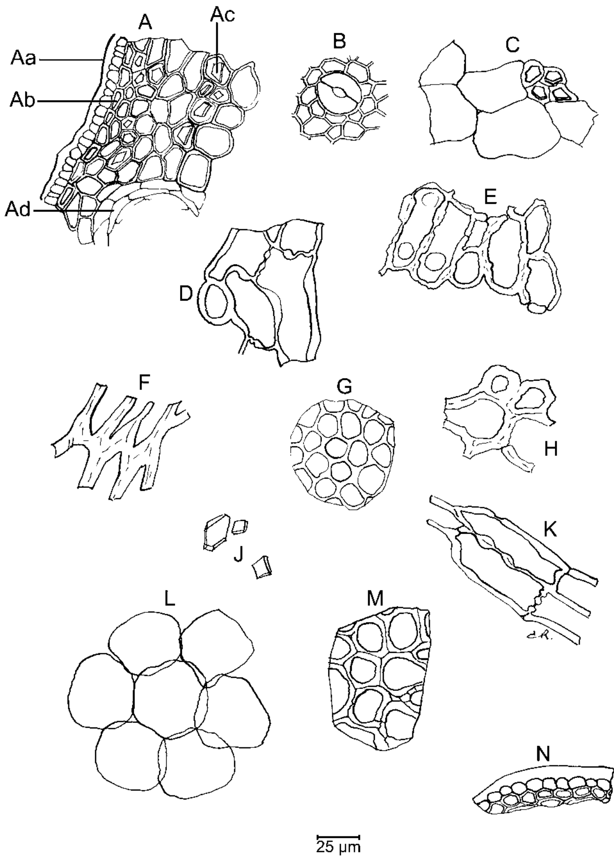
CARACTÈRES

Odeur aromatique et saveur amère et épicée.

IDENTIFICATION

A. L'épicarpe et le mésocarpe d'orange amère sont constitués de morceaux elliptiques ou irréguliers d'une longueur de 5-8 cm, d'une largeur de 3-5 cm et d'une épaisseur d'environ 3 mm. La surface externe est jaunâtre ou brun-rouge, avec des ponctuations bien distinctes ; la surface interne est jaunâtre ou blanc-brun.

B. Réduisez la drogue en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun clair. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R.* La poudre présente les éléments suivants : des petites cellules polygonales, à parois anticlinales légèrement épaissies, remplies de granulations pigmentées rouge-orange, et de quelques stomates anomocytiques (*2.8.3*) ; des fragments de l'hypoderme présentant des épaississements collenchymateux ; des groupes de cellules du parenchyme contenant chacun un cristal prismatique d'oxalate de calcium et des fragments de poches sécrétrices lysigènes ; des cellules parenchymateuses contenant des cristaux d'hespéridine qui se dissolvent dans une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 20 g/L en donnant une couleur jaune.




A. Fragment, vu en section transversale, présentant l'épicarpe à cuticule épaisse (Aa), l'hypoderme collenchymateux (Ab), une portion de parenchyme du mésocarpe contenant des cristaux prismatiques (Ac) d'oxalate de calcium et un fragment de poche sécrétrice (Ad)

B. Fragment d'épicarpe avec stomate anomocytique, vu de face

C. Groupe de cellules du mésocarpe, contenant pour certaines des cristaux d'oxalate de calcium

D, E, F, H, K et M. Fragments de mésocarpe

G. Cellules sous-épicarpiques collenchymateuses

J. Cristaux prismatiques d'oxalate de calcium

L. Groupe de cellules du parenchyme

N. Fragment d'épicarpe montrant la cuticule épaisse et l'hypoderme à épaississement collenchymateux, vu en section transversale

Figure 1603.-1. – *Dessin pour l'identification de l'épicarpe et mésocarpe d'orange amère (voir Identification B)*

Drogues végétales

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de drogue pulvérisée (710) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R* et chauffez dans un bain-marie à 65 °C, sous agitation, pendant 5 min. Laissez refroidir et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 1,0 mg de *naringine R* et 1,0 mg d'*acide caféique R* dans 1 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *eau R, acide formique anhydre R, acétate d'éthyle R* (10:15:75 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air, puis chauffez à l'étuve à 110-120 °C pendant 5 min.

*Détection* : pulvérisez sur la plaque chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R*, puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R*. Après 1 h au minimum, examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence bleu clair |
| | Une bande de fluorescence bleu clair |
| Acide caféique : une bande de fluorescence bleu clair | |
| | Une bande de fluorescence bleu clair |
| | Une bande de fluorescence bleu clair |
| Naringine : une bande de fluorescence vert foncé | Une bande de fluorescence vert foncé (naringine) |
| | Une bande de fluorescence rouge (néoériocitrine) |
| | Une bande de fluorescence orange |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eau** (*2.2.13*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé par entraînement sur 20,0 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 7,0 pour cent.

**Matières extractibles** : au minimum 6,0 pour cent.

A 2,000 g de drogue pulvérisée (250) (*2.9.12*), ajoutez un mélange de 3 mL d'*eau R* et de 7 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et extrayez pendant 2 h en agitant fréquemment. Filtrez, évaporez à siccité 2,000 g de filtrat au bain marie et desséchez le résidu à l'étuve à 100-105 °C pendant 3 h. Laissez refroidir dans un dessiccateur sur du *pentoxyde de diphosphore R*. Pesez. La masse du résidu n'est pas inférieure à 120 mg.

DOSAGE

Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez 15,0 g de drogue réduite en poudre (710) (*2.9.12*) immédiatement avant le dosage, un ballon à fond rond de 500 mL, et 200 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Introduisez 0,5 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 90 min.

**01/2008:1811**

# ORANGE DOUCE (HUILE ESSENTIELLE D')

## Aurantii dulcis aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue, par des moyens mécaniques appropriés, sans chauffage, à partir du zeste frais du fruit de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (*Citrus aurantium* L. var. *dulcis* L.). Un antioxydant approprié peut être ajouté.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide mobile, limpide, jaune pâle ou orangé, qui peut devenir trouble par refroidissement.

Odeur caractéristique du zeste frais.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du bergaptène.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| Bergaptène : une bande de fluorescence jaune-vert | |
| ——— | ——— |
| | Plusieurs bandes de fluorescence bleue |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence brune |
| Acétate de linalyle : une bande de fluorescence orange-brun | Une bande de fluorescence orange-brun faible (acétate de linalyle) |
| ——— | ——— |
| | Plusieurs bandes de fluorescence orange |
| Linalol : une bande de fluorescence orange-brun | Une bande de fluorescence orange-brun (linalol) |
| Bergaptène : une bande de fluorescence jaune-vert faible | |
| | Plusieurs bandes de fluorescence orange-brun |
| ——— | ——— |
| | Plusieurs bandes de fluorescence bleue |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux pics caractéristiques obtenus avec la solution témoin.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,842 à 0,850.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,470 à 1,476.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : + 94° à + 99°.

**Indice de peroxyde** (*2.5.5, Procédé B*) : au maximum 20.

**Huiles grasses et huiles essentielles résinifiées** (*2.8.7*). L'huile essentielle à examiner satisfait à l'essai des huiles grasses et huiles essentielles résinifiées.

**Bergaptène**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Diluez 0,2 mL d'huile essentielle à examiner dans 1 mL d'*alcool R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 2 mg de *bergaptène R*, 10 μL de *linalol R* et 20 μL d'*acétate de linalyle R* dans de 10 mL d'*alcool R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (15:85 *V/V*).

*Dépôt* : 10 μL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats A* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande de fluorescence jaune-vert qui est présente dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

*Détection B* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 10 min ; examinez la plaque en lumière ultraviolette à 365 nm.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner.* Diluez 300 μL d'huile essentielle à examiner dans de l'*acétone R* et complétez à 1 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (a).* Diluez 10 μL d'*α-pinène R*, 10 μL de *β-pinène R*, 10 μL de *sabinène R*, 20 μL de *β-myrcène R*, 800 μL de *limonène R*, 10 μL d'*octanal*, 10 μL de *décanal R*, 10 μL de *linalol R*, 10 μL de *citral R* (composé de néral et de géranial) et 10 μL de *valencène R* dans 1 mL d'*acétone R*.

*Solution témoin (b).* Dissovez 5 μL de *β-pinène R* dans 10 mL d'*acétone R*. Prélevez 0,5 mL et complétez à 10 mL avec de l'*acétone R*.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 30 m, Ø = 0,53 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur de film 1 μm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1 mL/min.

*Rapport de division* : 1:100.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 6 | 50 |
| | 6 - 31 | 50 → 150 |
| | 31 - 41 | 150 → 180 |
| | 41 - 55 | 180 |
| Chambre à injection | | 250 |
| Détecteur | | 250 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 0,5 μL.

*Ordre d'élution* : ordre indiqué pour la préparation de la solution témoin (a) ; notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin (a)

– *résolution* : au minimum 3,9 entre les pics dus au β-pinène et au sabinène et au minimum 1,5 entre les pics dus au valencène et au géranial.

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a), localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les composants de la solution témoin (a).

Déterminez la teneur pour cent de ces composants. Ces teneurs sont comprises dans les limites suivantes :

– *α-pinène* : 0,4 pour cent à 0,6 pour cent,
– *β-pinène* : 0,02 pour cent à 0,3 pour cent,
– *sabinène* : 0,2 pour cent à 1,1 pour cent,
– *β-myrcène* : 1,7 pour cent à 2,5 pour cent,
– *limonène* : 92,0 pour cent à 97,0 pour cent,
– *octanal* : 0,1 pour cent à 0,4 pour cent,
– *décanal* : 0,1 pour cent à 0,4 pour cent,
– *linalol* : 0,2 pour cent à 0,7 pour cent,
– *néral* : 0,02 pour cent à 0,10 pour cent,
– *valencène* : 0,02 pour cent à 0,5 pour cent,
– *géranial* : 0,03 pour cent à 0,20 pour cent.

*Limite d'exclusion* : la surface du pic dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,01 pour cent).

**Résidu à l'évaporation** : 1,0 pour cent à 5,0 pour cent. Evaporez à siccité au bain-marie 5,0 g d'huile essentielle à examiner et desséchez à 100-105 °C pendant 4 h.

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

**01/2009:1810**

# ORANGER AMER (FLEUR D')

## Aurantii amari flos

DÉFINITION

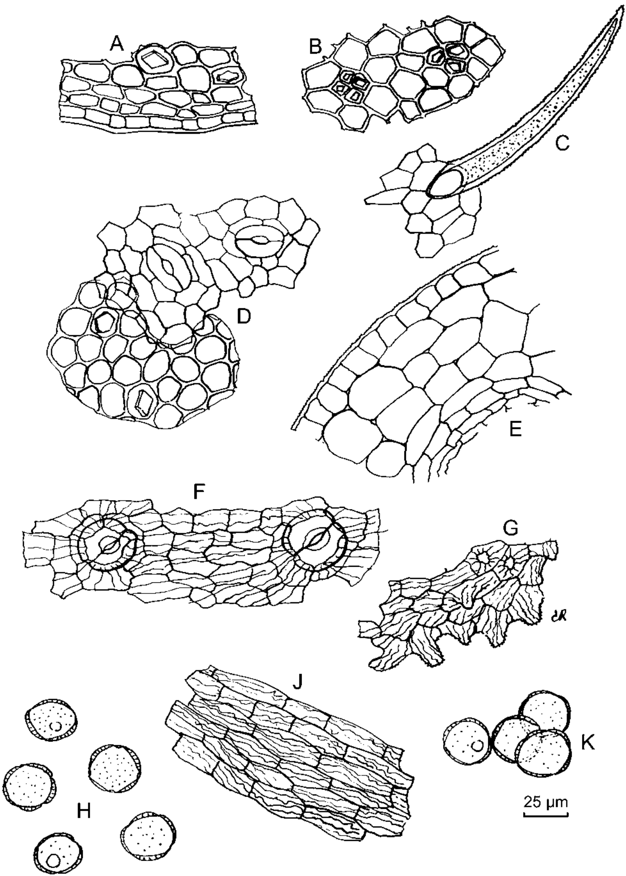
Fleur entière, non épanouie, séchée de *Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium* (*C. aurantium* L. ssp. *amara* Engl.).

*Teneur* : au minimum 8,0 pour cent de flavonoïdes totaux, exprimés en naringine ($C_{27}H_{32}O_{14}$ ; $M_r$ 580,5) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Les fleurs d'oranger amer, en boutons, sont blanches ou blanc-jaune et peuvent atteindre une longueur de 25 mm. La corolle dialypétale est composée de 5 pétales épais, oblongs et concaves, ponctués de poches sécrétrices visibles à la loupe ; le calice gamosépale persistant, court et vert-jaune, est composé de 5 sépales ouverts, connés, formant une structure en étoile attachée au pédoncule vert-jaune dont la longueur est d'environ 5-10 mm. Les boutons floraux renferment au moins 20 étamines à anthères jaunes et à filets soudés à la base par groupes de 4 ou 5 ; l'ovaire supère, composé de 8-10 loges pluriovulées, est sphérique, de couleur noir-brun et entouré à la base par un disque hypogine annulaire et granuleux ; le style, épais et cylindrique, se termine par un stigmate capité.

B. Réduisez la fleur d'oranger amer en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune-brun. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : de très nombreux grains de pollen sphériques à exine finement ponctuée et à 3-5 pores germinatifs ; des fragments de l'épiderme des sépales avec des poils unicellulaires et de gros cristaux prismatiques d'oxalate de calcium dans le mésophylle sous-jacent ; des fragments de l'épiderme des pétales avec une cuticule aux stries bien visibles ; des fragments de larges poches sécrétrices schizolysigènes dont le diamètre peut atteindre 100 μm ; de nombreux stomates anomocytiques (*2.8.3*). Examinez au microscope en utilisant une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 20 g/L. Le milieu de montage se colore en jaune en raison de la présence d'hespéridine dans la drogue.




A. Epiderme des sépales et cellules du mésophylle sous-jacent contenant des cristaux prismatiques d'oxalate de calcium, vu en section transversale

B. Cellules du mésophylle, certaines contenant des prismes d'oxalate de calcium

C. Epiderme des sépales avec poil tecteur unicellulaire

D. Epiderme des sépales, vu de face, avec stomates anomocytiques et une partie du mésophylle sous-jacent contenant des cristaux prismatiques d'oxalate de calcium

E. Fragment d'une large poche sécrétrice schizolyzigène

F, G et J. Epiderme des pétales vu de face montrant la cuticule striée

H et K. Grains de pollen sphériques à exine finement ponctuée

Figure 1810.-1. – *Dessin pour l'identification de la fleur d'oranger amer (voir Identification B)*

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai Fleur d'oranger doux.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence jaune de faible intensité |
| | Une bande de fluorescence jaune de faible intensité |
| Hespéridine : une bande de fluorescence jaune-vert | Une bande de fluorescence jaune-vert (hespéridine) |
| Naringine : une bande de fluorescence jaune | Une bande de fluorescence jaune (naringine) |
| | Une bande de fluorescence rouge (néoériocitrine) |
| | Une bande de fluorescence jaune (diosmine et néodiosmine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Fleur d'oranger doux**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 0,5 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 5 mL de *méthanol R*. Chauffez en agitant à 40 °C pendant 10 min. Filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 3,0 mg de *naringine R* et 3,0 mg d'*hespéridine R* dans 10 mL de *méthanol R.*

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *eau R, acide formique anhydre R, acétate d'éthyle R* (10:15:75 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air ; chauffez à l'étuve à 110-120 °C pendant 5 min.

*Détection* : pulvérisez, sur la plaque chaude, une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R,* puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R.* Après au minimum 1 h, examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande jaune semblable quant à sa position à la bande de la naringine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin et immédiatement dessous, une bande rouge due à la néoériocitrine.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 11,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

DOSAGE

*Solution mère.* A 0,175 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 95 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R.* Chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Laissez refroidir et filtrez sur un filtre de verre fritté (*2.1.2*). Rincez le filtre avec 5 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R.* Réunissez le filtrat et la solution de rinçage dans un ballon jaugé et complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 50 pour cent V/V R.*

*Solution à examiner.* Dans un tube à essai (10 mm × 180 mm), introduisez 0,150 g de *magnésium R* pulvérisé (250) (*2.9.12*), un barreau aimanté de 25 mm de longueur et 2,00 mL de solution mère. Maintenez le tube vertical, centrifugez à 125 *g* et ajoutez goutte à goutte avec précaution, surtout au début, 2,0 mL d'*acide chlorhydrique R,* puis 6,0 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R.* Bouchez le tube, mélangez en agitant par retournement.

*Solution de compensation.* Dans un 2[e] tube à essai, introduisez 2,00 mL de solution mère et ajoutez goutte à goutte avec précaution, surtout au début, 2,0 mL d'*acide chlorhydrique R,* puis 6,0 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R.*

Après 10 min, mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 530 nm.

Calculez la teneur pour cent en flavonoïdes totaux, exprimés en naringine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 9,62}{m}$$

en prenant 52 comme valeur de l'absorbance spécifique du produit de réaction de la naringine.

$A$ = absorbance à 530 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2011:1880**

# ORIGAN

## Origani herba

DÉFINITION

Feuilles et fleurs séchées, détachées des tiges, d'*Origanum onites* L., d'*Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Ietsw. ou d'un mélange des 2 espèces.

*Teneur* :

– *huile essentielle* : au minimum 25 mL/kg (drogue anhydre),

– *somme des teneurs en carvacrol et thymol* (chacun $C_{10}H_{14}O$ ; $M_r$ 150,2) : au minimum 60 pour cent dans l'huile essentielle.

IDENTIFICATION

A. *O. onites*. La feuille est vert-jaune et mesure généralement 4-22 mm de long et 3-14 mm de large ; elle est longuement ou brièvement pétiolée, ou sessile ; le limbe est ovale, elliptique ou ovale-lancéolé, à bords entiers ou en dents de scie, à sommet acuminé ou obtus ; la nervation jaunâtre est bien visible sur la face adaxiale. Les fleurs sont solitaires ou proviennent de fragments des corymbes ; le calice, de même aspect que la bractée, est discret ; la corolle est blanche, au sommet d'inflorescences ou de fleurs isolées, ou peu visible ; les bractées sont imbriquées et de même couleur verte que les feuilles. Des fragments de tiges brun-jaune ou jaunâtres sont présents.

*O. vulgare* (subsp. *hirtum*). La feuille est verte et mesure généralement 3-28 mm de long et 2,5-19 mm de large ; elle est pétiolée ou sessile ; le limbe est ovale ou ovale-elliptique, à bords entiers ou en dents de scie, à sommet acuminé ou obtus. Les fleurs sont rares et proviennent de fragments des corymbes ; les bractées de couleur jaune-vert sont imbriquées ; le calice, de même aspect que la corolle, est discret ; la corolle est blanche et au sommet d'inflorescences peu ou très peu apparentes.

B. Réduisez l'origan en poudre (710) (*2.9.12*). La poudre est verte (*O. vulgare*) ou vert-jaune (*O. onites*). Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R* (figure 1880.-1).

La poudre d'*O. onites* présente des fragments d'épiderme foliaire [A, D, G] constitué de cellules à parois sinueuses, de stomates diacytiques (*2.8.3*) [Ga], de poils tecteurs et de poils sécréteurs ; les poils sécréteurs sont de 2 sortes : les uns de type *lamiaceae*, à 8-16 cellules, vus de face [Da], les autres, très fréquents, à tête unicellulaire et pied uni- [Gc], bi- [H] ou tricellulaire ; les poils tecteurs sont à paroi épaisse et lisse ; les uns sont pluricellulaires [B, Gb], souvent brisés [Aa] et contiennent des prismes d'oxalate de calcium ; les autres, rares, sont unicellulaires et coniques [C]; des cicatrices de poils tecteurs ou sécréteurs sont visibles sur les épidermes [Gd, Ge] ; les grains de pollen, à exine lisse, sont fréquents [E, F].

La poudre d'*O. vulgare* subsp. *hirtum* présente des fragments de l'épiderme supérieur à cellules à parois sinueuses en chapelet, accompagné de parenchyme palissadique [J] ; des fragments de l'épiderme inférieur [N] composé de cellules à parois finement et irrégulièrement épaissies, de stomates diacytiques (*2.8.3*) [Na], de poils tecteurs et de poils sécréteurs ; les poils sécréteurs sont de 2 sortes : les uns de type *lamiaceae*, à 12 cellules, vus de face [Nb], les autres, peu abondants, à tête unicellulaire [Nc] et pied bi- ou tricellulaire ; les poils tecteurs sont à paroi épaisse et verruqueuse et contiennent de fines aiguilles d'oxalate de calcium ; les uns sont coniques, pluricellulaires et en dents de scie [L, M] ; les autres, rares, sont unicellulaires [K] ; les grains de pollen, à exine lisse, sont peu fréquents [E, F].

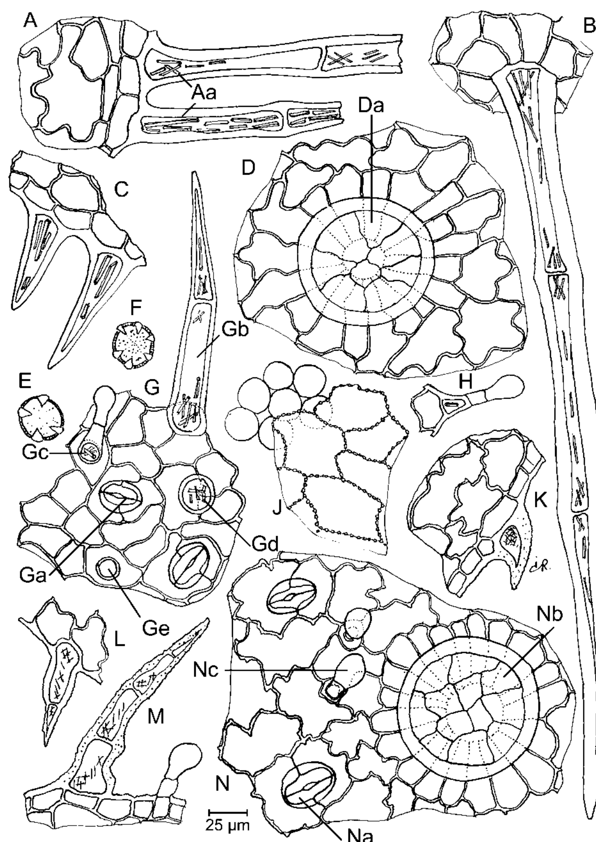



Figure 1880.-1.– *Dessin pour l'identification B de l'origan pulvérisé*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g d'origan pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 5 mL de *chlorure de méthylène R* et agitez pendant 3 min. Filtrez sur environ 2 g de *sulfate de sodium anhydre R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 1 mg de *thymol R* et 10 µL de *carvacrol R* dans 10 mL de *chlorure de méthylène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *chlorure de méthylène R*.

*Dépôt* : 20 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* à raison de 10 mL pour une plaque de 200 mm de côté ; chauffez à 100-105 °C pendant 10 min.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes sont également présentes dans le tiers inférieur et la partie supérieure du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| | Une bande pourpre-bleu |
| _______ | _______ |
| | Une bande vert pâle |
| Thymol : une bande rose | Une bande rose (thymol) |
| Carvacrol : une bande violet clair | Une bande violet clair (carvacrol) |
| _______ | _______ |
| | Une bande pourpre pâle |
| | Une bande grise |
| | Une bande vert pâle |
| | Une bande pourpre-bleu |
| | Une bande brun intense |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eau** (*2.2.13*) : au maximum 120 mL/kg, déterminé sur 20,0 g d'origan pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 15,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 4,0 pour cent.

DOSAGE

**Huile essentielle** (*2.8.12*). Utilisez 30,0 g d'origan, un ballon à fond rond de 1000 mL et 400 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 2 h, sans *xylène R* dans le tube gradué.

**Carvacrol et thymol**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. Filtrez l'huile essentielle, obtenue lors du dosage de l'huile essentielle, sur une petite quantité de *sulfate de sodium anhydre R* et complétez à 5,0 mL avec de l'*heptane R* en rinçant l'appareil et le sulfate de sodium anhydre.

*Solution témoin*. Dissolvez et 50 mg de *carvacrol R* 0,20 g et de *thymol R* dans de l'*heptane R* puis complétez à 5,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,

– *dimensions* : *l* = 60 m, Ø = 0,25 mm,

– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur du film 0,25 µm).

*Gaz vecteur* : *azote pour chromatographie R* ou *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Rapport de division* : 1:100.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 45 | 40 → 250 |
| Chambre à injection | | 190 |
| Détecteur | | 210 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 0,2 µL.

*Ordre d'élution* : ordre indiqué pour la préparation de la solution témoin ; notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au thymol et au carvacrol.

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez les composants de la solution témoin sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Déterminez la teneur pour cent de la somme en carvacrol et en thymol.

**04/2009:1229**

# ORTHOSIPHON

## Orthosiphonis folium

DÉFINITION

Feuille et extrémité des tiges, séchées et fragmentées, d'*Orthosiphon stamineus* Benth. (*O. aristatus* Miq. ; *O. spicatus* Bak.).

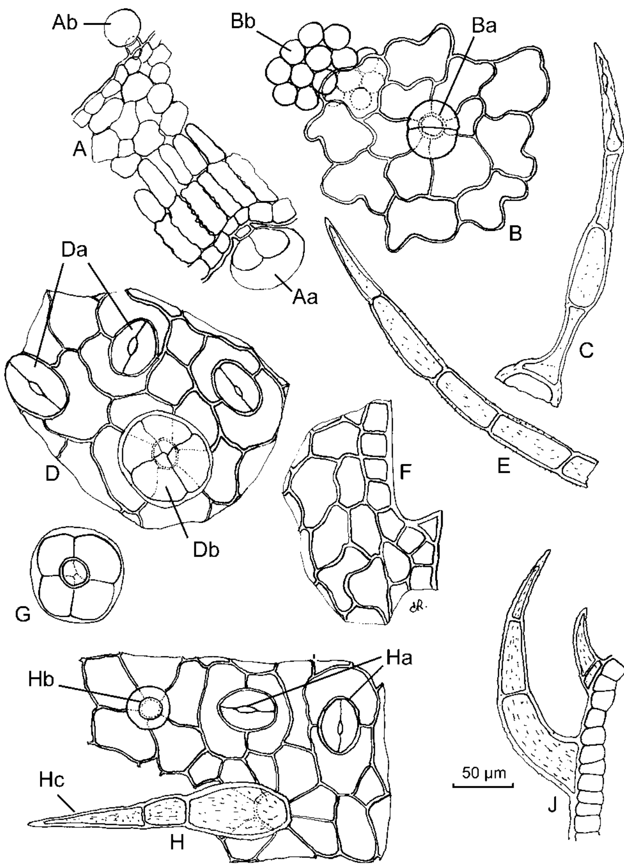
*Teneur* : au minimum 0,05 pour cent de sinensétine ($C_{20}H_{20}O_7$ ; $M_r$ 372,4) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La feuille d'orthosiphon est friable et peut atteindre 7,5 cm de long et 2,5 cm de large. Le pétiole est court. Le limbe est ovale ou lancéolé, acuminé et, à la base, cunéiforme. La face abaxiale des feuilles est vert-gris clair et la face adaxiale est vert foncé ou vert-brun. La nervation est pennée et présente peu de nervures secondaires. Examinées à la loupe (× 10), les nervures secondaires, après un parcours parallèle à la nervure principale, divergent selon un angle aigu. Le bord du limbe est irrégulièrement et grossièrement denté, parfois crénelé et légèrement recourbé du côté abaxial. Les pétioles sont minces, quadrangulaires, d'une longueur de 4-8 mm et, comme les nervures principales, le plus souvent violacés. Occasionnellement, des inflorescences en grappe, constituées de fleurs blanc-bleu ou violettes, pas encore épanouies, sont présentes.

B. Réduisez l'orthosiphon en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert foncé. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments d'épiderme, à cellules à contours sinueux, portant des poils tecteurs, coniques unicellulaires ou bicellulaires et des poils articulés, unisériés, jusqu'à 450 µm de long, de 3-8 cellules à parois épaisses ponctuées ; des poils capités, à tête unicellulaire ou bicellulaire ; des poils sécréteurs, à pied unicellulaire et à tête généralement quadricellulaire ; des stomates de type diacytique (*2.8.3*), plus nombreux sur l'épiderme inférieur.

Drogues végétales




A. Limbe, en section transversale, montrant un poil sécréteur à tête quadricellulaire (Aa) et un poil capité à tête unicellulaire (Ab)

B. Epiderme supérieur, vu de face, montrant un poil capité à tête bicellulaire (Ba) et le parenchyme palissadique sous-jacent (Bb)

C et E. Poils tecteurs articulés (fragments seulement observés en général)

D. Epiderme inférieur, vu de face, avec des stomates diacytiques (Da) et un poil sécréteur à tête quadricellulaire (Db)

F. Bord du limbe

G. Poil sécréteur

H. Epiderme inférieur, vu de face, avec des stomates diacytiques (Ha), poil capité à tête unicellulaire (Hb) et poil tecteur pluricellulaire (Hc)

J. Poils tecteurs sur le bord du limbe

Figure 1229.-1. – *Dessin pour l'identification de l'orthosiphon (voir Identification B)*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Agitez 1 g d'orthosiphon pulvérisé (710) (*2.9.12*) avec 10 mL de *méthanol R* dans un bain-marie à 60 °C pendant 5 min. Filtrez la solution refroidie.

*Solution témoin*. Dissolvez 1 mg de *sinensétine R* dans du *méthanol R* et complétez à 20 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *méthanol R, acétate d'éthyle R, toluène R* (5:40:55 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, des bandes de fluorescence rouge sont présentes dans le tiers inférieur et près du front de solvant du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | 1 ou 2 bandes de fluorescence bleue ou bleu-violet plus ou moins intense<br>_______ |
| Sinensétine : une bande de fluorescence bleu clair intense<br>_______ | Une bande majeure de fluorescence bleue (sinensétine)<br>_______ |
| | 2 bandes de fluorescence bleuâtre |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent de tiges d'un diamètre supérieur à 1 mm et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 11,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g d'orthosiphon pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 12,5 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Chauffez au bain-marie pendant 30 min, en agitant, 2,5 g d'orthosiphon pulvérisé (355) (*2.9.12*) avec 100 mL de *chlorure de méthylène R*. Filtrez. Recueillez le filtrat et recommencez 2 fois sur le résidu de filtration, comme précédemment. Réunissez les filtrats. Evaporez le solvant sous pression réduite. Dissolvez le résidu dans 25,0 mL de phase mobile en utilisant un bain à ultrasons si nécessaire. Filtrez la solution sur un filtre de nitrate de cellulose d'une porosité de 0,45 µm.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg ($m_2$) de *sinensétine R* dans 80 mL de phase mobile en utilisant un bain à ultrasons si nécessaire et complétez à 100,0 mL avec la phase mobile.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : *tétrahydrofurane R, acide acétique R, eau R, méthanol R* (5:8:42:45 *V/V/V/V*).

*Débit* : 0,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 258 nm.

*Injection* : 20 µL.

Calculez la teneur pour cent en sinensétine à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{m_2 \times F_1 \times 25}{m_1 \times F_2}$$

$F_1$ = surface du pic de sinensétine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_2$ = surface du pic de sinensétine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai d'orthosiphon, en grammes,

$m_2$ = masse de sinensétine dans la solution témoin, en grammes.

**01/2011:1897**

# ORTIE (FEUILLE D')

## Urticae folium

DÉFINITION

Feuilles séchées, entières ou fragmentées d'*Urtica dioica* L., d'*Urtica urens* L. ou du mélange des 2 espèces.

*Teneur* : au minimum 0,3 pour cent pour la somme d'acide caféoylmalique et d'acide chlorogénique, exprimée en acide chlorogénique ($C_{16}H_{18}O_9$ ; $M_r$ 354,3) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Les feuilles sont vert foncé, vert-gris foncé ou vert-brun sur la face supérieure, plus pâles sur la face inférieure ; les 2 faces portent des poils urticants disséminés, ainsi que de courts poils tecteurs plus nombreux le long des bords et sur les nervures de la face inférieure. Le limbe fortement rétréci, ovale ou oblong, mesure jusqu'à 100 mm de longueur et 50 mm de largeur, son bord est grossièrement découpé en dents de scie et sa base est cordée ou arrondie. La nervation, réticulée, est nettement proéminente sur la face inférieure. Le pétiole vert ou vert-brun, arrondi ou aplati, mesure environ 1 mm de largeur et présente des stries et des torsions longitudinales ; il porte des poils urticants et des poils tecteurs.

B. Réduisez la feuille d'ortie en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est verte ou vert-gris. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants (figure 1897.-1) : des fragments de poils urticants [A, B, C] unicellulaires, pouvant atteindre 2 mm de longueur, composés d'une cellule allongée et fuselée à pointe urticante légèrement renflée, cassante, issue d'une base multicellulaire saillante [Ca] ; des petits poils sécréteurs [F] (35-65 µm), à pied uni- ou bicellulaire et à tête bi- ou quadricellulaire, isolés [Fa] ou sur des fragments d'épiderme [Fb] ; des fragments de l'épiderme supérieur des feuilles, vu de face [G] ou en section transversale [D], présentant des cellules à parois peu sinueuses [Da, Gc], des poils tecteurs unicellulaires, droits ou légèrement courbés, élargis à la base, pouvant atteindre 700 µm de longueur [Dc, Ga] et d'abondants cystolithes de grande taille [Db, Ea, Gb], vides ou renfermant des masses denses, granuleuses, de carbonate de calcium ; du parenchyme palissadique, vu de face [E], à cellules arrondies [Eb] entourant des cystolithes (Ea), ou en section transversale [Dd] ; des fragments de l'épiderme inférieur des feuilles présentant des cellules à parois sinueuses ou ondulées [H], des stomates de type anomocytique [Ha] ou anisocytique [Hb] (*2.8.3*) accompagnés de mésophylle lacuneux vu de face [Hc] et en section transversale [De], contenant de petites macles d'oxalate de calcium vues de face [Hd] et en section transversale [Df] ; quelques petits groupes de vaisseaux accompagnés de parenchyme contenant des macles d'oxalate de calcium [J].

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 1 g de feuille d'ortie pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Chauffez à reflux pendant 15 min. Refroidissez et filtrez. Evaporez à siccité sous vide à 40 °C. Dissolvez le résidu dans 2 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 1 mg de *scopolétine R* et 2 mg d'*acide chlorogénique R* dans 20 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, méthanol R, eau R, acétate d'éthyle R* (2,5:4:4:50 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 4 µL] en bandes de 10 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 8 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : chauffez à 100 °C pendant 5 min. Pulvérisez sur la plaque encore chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R*. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres faibles bandes de fluorescence bleue ou jaune peuvent être présentes dans la moitié inférieure du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | 2 bandes rouges |
| Scopolétine : une bande de fluorescence bleue intense | Une bande de fluorescence bleue (scopolétine) |
| | Une bande de fluorescence bleue |
| _______ | _______ |
| _______ | _______ |
| Acide chlorogénique : une bande de fluorescence bleue | Une bande de fluorescence bleue (acide chlorogénique) |
| | Une bande jaune-brun |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

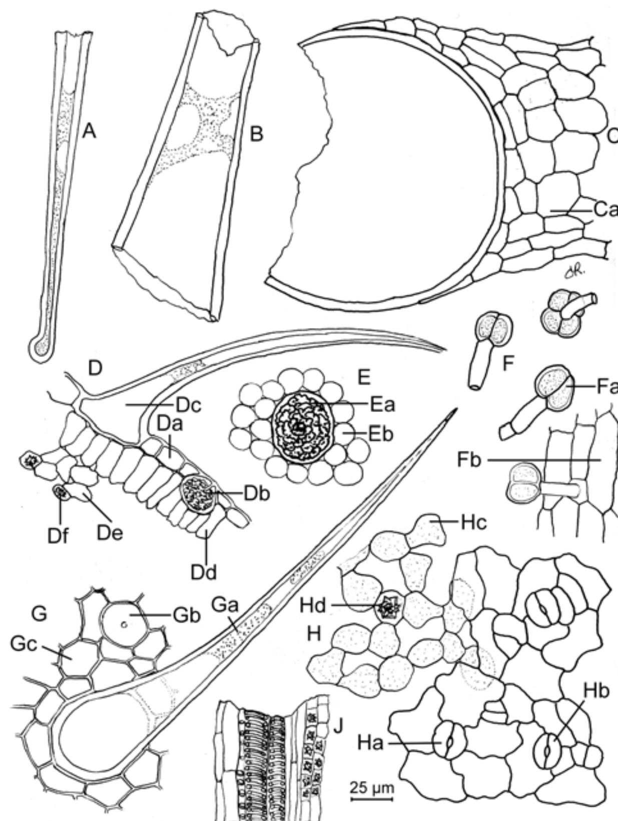



Figure 1897.-1.– *Dessin pour l'identification B de la feuille d'ortie pulvérisée*

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent de tiges et au maximum 5 pour cent d'autres éléments étrangers (incluant les inflorescences).

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de feuille d'ortie pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 20,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 4,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* A 0,200 g de feuille d'ortie pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 25,0 mL d'une solution de *méthanol R* à 40 pour cent *V/V*. Procédez à l'extraction pendant 30 min dans un bain à ultrasons à 40 °C et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 10,0 mg d'*acide chlorogénique SCR* dans 100,0 mL d'une solution de *méthanol R* à 40 pour cent *V/V*. Prélevez 5,0 mL de cette solution et complétez à 25,0 mL avec une solution de *méthanol R* à 40 pour cent *V/V*.

*Précolonne* :

– *dimensions* : $l$ = 4 mm, Ø = 4 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie R* (5 µm).

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,125 m, Ø = 4 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie R* (5 µm),
– *température* : 25 °C.

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : mélangez 15 volumes de *méthanol R* et 85 volumes d'*eau R*, puis ajustez à pH 2,0 avec de l'*acide phosphorique dilué R*,
– *phase mobile B* : *méthanol R*,

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 1 | 100 | 0 |
| 1 - 25 | 100 → 85 | 0 → 15 |
| 25 - 35 | 85 | 15 |
| 35 - 36 | 85 → 0 | 15 → 100 |

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 330 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Rétention relative* par rapport à l'acide chlorogénique (temps de rétention = environ 13 min) : acide caféoylmalique = environ 2,2.

Calculez la teneur pour cent en acide caféoylmalique et en acide chlorogénique, exprimés en acide chlorogénique, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p}{A_2 \times m_1 \times 20}$$

$A_1$ = somme de la surface des pics dû à l'acide caféoylmalique et à l'acide chlorogénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'acide chlorogénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la drogue à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse d'*acide chlorogénique SCR* utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en acide chlorogénique de l'*acide chlorogénique SCR*.

**01/2008:1459**
**corrigé 6.0**

# PASSIFLORE

## Passiflorae herba

DÉFINITION

Parties aériennes séchées, fragmentées ou coupées, de *Passiflora incarnata* L. Des fleurs et/ou des fruits peuvent également être présents.

*Teneur* : au minimum 1,5 pour cent de flavonoïdes totaux, exprimés en vitexine ($C_{21}H_{20}O_{10}$ ; $M_r$ 432,4) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La tige, verte ou gris-vert ou brunâtre, est ligneuse, creuse, striée longitudinalement, glabre ou très légèrement pubescente, d'un diamètre généralement inférieur à 8 mm. Les feuilles, vertes ou brun-vert, sont alternées, finement dentées et pubescentes, profondément divisées en 3 lobes aigus, dont le lobe central est le plus important. La nervure centrale est beaucoup plus saillante à la face inférieure. Le pétiole est pubescent et porte, au voisinage du limbe, 2 glandes nectarifères foncées. Les vrilles sont très nombreuses et prennent naissance à l'aisselle des feuilles ; elles sont fines, lisses, rondes et terminées en tire-bouchons. Si elles sont présentes, les fleurs radiées ont 3 petites bractées et une corolle de 5 pétales blancs allongés, accompagnés de plusieurs rangées d'appendices pétaloïdes filiformes. S'il est présent, le fruit, verdâtre ou brunâtre, est aplati et ovale, il contient de nombreuses graines aplaties, jaune-brun, à surface ponctuée.

B. Réduisez la passiflore en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert clair. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de l'épiderme de la feuille avec des stomates anomocytiques (*2.8.3*) et des parois sinueuses ; de nombreuses macles d'oxalate de calcium isolées ou alignées le long des nervures ; de nombreuses fibres, provenant des tiges, isolées ou groupées, accompagnées de vaisseaux ponctués et de trachéides ; des poils unisériés, avec 1-3 cellules à parois minces, droits ou légèrement arqués, terminés en pointe parfois recourbée en crochet. Si des fleurs sont présentes, la poudre présente également les épidermes à cellules papilleuses des pétales et des appendices ainsi que des grains de pollen avec une exine réticulée ; et si des fruits mûrs sont présents, des cellules disséminées, à tanin brun, et des fragments ponctués, jaune-brun, du tégument.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai des autres espèces de *Passiflora*.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente en dessous de la bande due à la rutine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin une bande d'intense fluorescence jaune et au-dessus une bande de fluorescence verte (diglycosylflavone), au-dessous de la bande due à l'hypéroside dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin une bande de fluorescence jaune (isoorientine) et au-dessus une bande de fluorescence verte (isovitexine), au-dessus de la bande due à l'hypéroside dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin une bande de fluorescence jaune-brun (orientine) surmontée d'une bande de fluorescence verte (vitexine). Ces 2 dernières bandes peuvent être absentes. D'autres bandes peuvent être présentes.

ESSAI

**Autres espèces de *Passiflora*.** Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 1,0 g de passiflore pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 5 mL de *méthanol R*. Chauffez à ébullition à reflux pendant 10 min. Laissez refroidir et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez en chauffant 2,0 mg de *rutine R* et 2,0 mg d'*hypéroside R* dans 10 mL de *méthanol R.*

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, méthyléthylcétone R, acétate d'éthyle R* (10:10:30:50 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R,* puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R.* Laissez sécher à l'air pendant 30 min. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente dans son tiers inférieur une bande de fluorescence brun-jaune due à la rutine et dans son tiers médian une bande de fluorescence brun-jaune due à l'hypéroside. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande intense de fluorescence jaune-vert ou jaune orangé située entre la bande due aux diglycosylflavones et celle due à l'isoorientine (*P. coerulea* et *P. edulis*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 13,0 pour cent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de passiflore pulvérisée (355) (*2.9.12*).

DOSAGE

*Solution mère.* Dans un ballon à fond rond de 100 mL, introduisez 0,200 g de passiflore pulvérisée (250) (*2.9.12*), puis ajoutez 40 mL d'*éthanol à 60 pour cent V/V R.* Chauffez dans un bain-marie à 60 °C à reflux pendant 30 min en agitant régulièrement. Laissez refroidir et filtrez sur un tampon de coton hydrophile dans une fiole jaugée de 100 mL. Transférez le tampon de coton hydrophile avec le résidu dans le ballon à fond rond. Ajoutez 40 mL d'*éthanol à 60 pour cent V/V R* et chauffez de nouveau dans un bain-marie à 60 °C à reflux pendant 10 min. Laissez refroidir et filtrez le mélange ainsi que le premier filtrat de la fiole de 100 mL sur un papier-filtre dans un ballon jaugé de 100 mL. Complétez à 100 mL avec le même solvant en rinçant la fiole et le ballon à fond rond, puis filtrez.

*Solution à examiner.* Dans un ballon, introduisez 5,0 mL de solution mère. Evaporez à siccité sous pression réduite et reprenez le résidu par 10 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique glacial R.* Ajoutez 10 mL d'une solution à 25 g/L d'*acide borique R* et à 20 g/L d'acide oxalique dans l'*acide formique anhydre R* et complétez à 25,0 mL avec de l'*acide acétique anhydre R.*

*Liquide de compensation.* Dans un second ballon, introduisez 5,0 mL de solution mère. Evaporez à siccité sous pression réduite et reprenez le résidu par 10 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique glacial R.* Ajoutez 10 mL d'*acide formique anhydre R* et complétez à 25,0 mL avec de l'*acide acétique anhydre R.*

Après 30 min, mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner à 401 nm, par comparaison au liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en flavonoïdes totaux, exprimés en vitexine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 0,8}{m}$$

en prenant 628 comme valeur de l'absorbance spécifique de la vitexine.

$A$ = absorbance à 401 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2008:1882**

# PASSIFLORE (EXTRAIT SEC DE)

## Passiflorae herbae extractum siccum

DÉFINITION

Extrait sec produit à partir de *Passiflore (1459).*

*Teneur* : au minimum 2,0 pour cent de flavonoïdes, exprimés en vitexine ($C_{21}H_{20}O_{10}$ ; $M_r$ 432,4) (extrait desséché).

PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale et de l'éthanol de 40 pour cent *V/V* à 90 pour cent *V/V,* du méthanol à 60 pour cent *V/V* ou de l'acétone à 40 pour cent *V/V,* par une méthode appropriée.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre amorphe brun-vert.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 0,25 g d'extrait à examiner, ajoutez du *méthanol R.* Agitez, filtrez et complétez à 5 mL avec du *méthanol R.*

*Solution témoin.* Dissolvez 2,0 mg d'*hypéroside R* et 2,0 mg de *rutine R* dans du *méthanol R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, méthyléthylcétone R, acétate d'éthyle R* (10:10:30:50 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 5 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 5 cm].

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R,* puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R.* Laissez sécher la plaque à l'air pendant environ 30 min. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. D'autres bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Hypéroside : une bande de fluorescence orange-jaune | |
| | Une bande de fluorescence verte |
| | Une bande de fluorescence jaune |
| Rutine : une bande de fluorescence orange-jaune | |
| _______ | _______ |
| | Une bande de fluorescence verte |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.8.17*) : au maximum 5,0 pour cent, déterminé sur 0,500 g d'extrait à examiner.

DOSAGE

*Solution mère.* A 50 mg d'extrait à examiner ajoutez de l'*éthanol à 60 pour cent V/V R.* Agitez, filtrez et complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 60 pour cent V/V R.*

*Solution à examiner.* Introduisez 5,0 mL de solution mère dans un ballon à fond rond et évaporez à siccité, sous pression réduite. Reprenez le résidu avec 8 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique glacial R* puis transvasez dans une fiole jaugée de 25 mL. Rincez le ballon à fond rond avec 3 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique glacial R* puis transvasez dans la fiole jaugée de 25 mL. Ajoutez 10,0 mL d'une solution contenant 25,0 g/L d'*acide borique R* et 20,0 g/L d'*acide oxalique R* dans de l'*acide formique anhydre R*, puis complétez à 25,0 mL avec de l'*acide acétique anhydre R.*

*Liquide de compensation.* Introduisez 5,0 mL de solution mère dans un ballon à fond rond et évaporez à siccité, sous pression réduite. Reprenez le résidu dans 8 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique glacial R* puis transvasez dans une fiole jaugée de 25 mL. Rincez le ballon à fond rond avec 3 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique glacial R* puis transvasez dans la fiole jaugée de 25 mL. Ajoutez 10,0 mL d'*acide formique anhydre R*, puis complétez à 25,0 mL avec de l'*acide acétique anhydre R.*

Après 30 min, mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner à 401 nm.

Calculez la teneur pour cent en flavonoïdes totaux, exprimés en vitexine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 0,8}{m}$$

en prenant 628 comme valeur de l'absorbance spécifique de la vitexine.

*A* = absorbance à 401 nm,

*m* = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2008:2264**
**corrigé 6.0**

# PÉLARGONIUM (RACINE DE)

## Pelargonii radix

DÉFINITION

Organes souterrains séchés, généralement fragmentés, de *Pelargonium sidoides* DC et/ou de *Pelargonium reniforme* Curt.

*Teneur* : au minimum 2,0 pour cent de tanins, exprimés en pyrogallol ($C_6H_6O_3$ ; $M_r$ 126,1) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La racine présente une écorce sombre, brun-rouge par endroits, parcourue de fissures longitudinales. La coupe transversale fait apparaître, sous le suber, du bois de couleur jaune ou blanche présentant des rayons médullaires bien visibles, de couleur brunâtre par endroits.

B. Réduisez la racine de pélargonium en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est rouge-brun. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R.* La poudre présente les éléments suivants : des fragments de suber constitué de plusieurs assises de cellules rectangulaires quasi uniformes ; des fragments du parenchyme sous-jacent contenant des cellules scléreuses à large lumen ; de nombreux cristaux d'oxalate de calcium. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V.* La poudre présente des grains d'amidon simples, sans striations ni craquelures.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 0,5 g de racine de pélargonium pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R.* Agitez pendant 15 min et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 1 mg de *scopolétine R* et 2 mg d'*esculine R* dans 20 mL de *méthanol R.*

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R, acétate d'éthyle R* (10:14:76 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 5 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution alcoolique d'hydroxyde de potassium R.* Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence bleue peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence bleue |
| Scopolétine : une bande de fluorescence bleu très vif | Une faible bande de fluorescence bleue (scopolétine) |
| _______ | _______ |
| | Une ou deux bandes de fluorescence bleu vif |
| Esculine : une bande de fluorescence bleu très vif | |
| | Une bande de fluorescence bleue |
| | Une faible bande de fluorescence bleue |
| _______ | _______ |
| | Une bande de fluorescence bleue |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de racine de pélargonium pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 12,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 3,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des tanins dans les drogues végétales (*2.8.14*). Utilisez 0,750 g de racine de pélargonium pulvérisée (180) (*2.9.12*).

**01/2008:1855**
**corrigé 6.0**

# PENSÉE SAUVAGE (PARTIES AÉRIENNES FLEURIES DE)

## Violae herba cum flore

DÉFINITION

Parties aériennes fleuries séchées de *Viola arvensis* Murray et/ou de *Viola tricolor* L.

*Teneur* : au minimum 1,5 pour cent de flavonoïdes exprimés en violanthine ($C_{27}H_{30}O_{14}$ ; $M_r$ 578,5) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Les parties aériennes fleuries de pensée sauvage présentent une tige anguleuse et creuse avec des feuilles pétiolées, ovales et en forme de coeur à la base ou allongées obtuses, avec des stipules en forme de lyre, découpées en leur milieu. Les fleurs, longuement pédonculées, sont zygomorphes, à 5 sépales ovales, lancéolés, avec un appendice tourné vers l'extérieur et 5 pétales dont le pétale inférieur porte un éperon ; chez *Viola arvensis*, les pétales sont plus courts que le calice, l'inférieur de couleur crème, avec des lignes noires, les 4 supérieurs plus ou moins lavés de couleur crème ou bleu-violet ; chez *Viola tricolor*, les pétales, plus longs que le calice, sont violets plus ou moins teintés de jaune. L'androcée formé de 5 étamines est muni au sommet d'un appendice connectif membraneux avec 2 éperons. L'ovaire triloculaire a un style court et des stigmates globuleux. Les fruits, tricoques, sont formés de capsules de forme naviculaire, brun-jaune, mesurant de 5 mm à 10 mm de longueur. Les graines, piriformes, jaune clair, mesurant environ 1 mm de longueur, sont munies d'une caroncule.

B. Réduisez les parties aériennes fleuries de pensée sauvage en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est verdâtre. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les caractères distinctifs suivants : des fragments d'épiderme de feuilles, vus de face, à cellules ondulées et des stomates anomocytiques (*2.8.3*) ; des poils tecteurs unicellulaires à base élargie et à extrémité effilée, à cuticule striée ; des poils sécréteurs, à tête pluricellulaire et à pied court pluricellulaire, situés sur le bord des dents des feuilles ; des macles d'oxalate de calcium parfois incluses dans le parenchyme ; des fragments de corolle à cellules épidermiques à parois ondulées, certains provenant du centre du pétale, portant des excroissances en forme de bouteille ou de flasques, d'autres provenant de la base des pétales, portant des poils tecteurs à paroi bosselée caractéristique d'environ 300 µm de long ; des grains de pollen sphériques ou polyédriques, de 60 µm à 80 µm de diamètre, à exine finement ponctuée, à 5 pores (*Viola arvensis*) ou à 4 pores (*Viola tricolor*) ; parfois des fragments de vaisseaux spiralés ou réticulés et des faisceaux de fibres provenant des tiges.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Chauffez dans un bain-marie à 65 °C, pendant 5 min, en agitant fréquemment, 2,0 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*) dans 10 mL d'*alcool à 70 pour cent V/V R*. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 2,5 mg de *rutine R*, 2,5 mg d'*hypéroside R* et 1,0 mg d'*acide caféique R* dans du *méthanol R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R*, *acide acétique R*, *eau R*, *acétate d'éthyle R* (11:11:27:100 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 12 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez une solution contenant 10 g/L de *diphénylborate d'aminoéthanol R* et 50 g/L de *macrogol 400 R* dans le *méthanol R*. Laissez sécher la plaque à l'air pendant 30 min. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Acide caféique: une bande de fluorescence bleu-gris à bleu clair | Une bande de fluorescence bleue |
| _______ | _______ |
| Hypéroside: une bande de fluorescence brun-jaune | Une bande de fluorescence vert-jaune |
| _______ | _______ |
| Rutine: une bande de fluorescence brun-jaune | Une bande de fluorescence brun-jaune intense (rutine) |
| | Une bande de fluorescence vert-jaune |
| | Une bande de fluorescence vert-jaune |
| | Une bande de fluorescence brun-jaune |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3 pour cent.

**Indice de gonflement** (*2.8.4*) : au minimum 9, déterminé sur la drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 15,0 pour cent.

DOSAGE

*Solution mère*. Dans un flacon de 200 mL, introduisez 0,300 g de drogue pulvérisée (250) (*2.9.12*) et ajoutez 40 mL d'*alcool à 60 pour cent V/V R*. Chauffez dans un bain-marie à 60 °C pendant 10 min, en agitant fréquemment. Laissez refroidir et filtrez sur un tampon de coton hydrophile en recueillant le filtrat dans une fiole jaugée de 100 mL. Transférez le coton hydrophile avec le résidu de la drogue dans le flacon de 200 mL, ajoutez 40 mL d'*alcool à 60 pour cent V/V R* et chauffez à nouveau dans un bain-marie à 60 °C pendant 10 min, en agitant fréquemment. Laissez refroidir et filtrez dans la même fiole jaugée de 100 mL. Rincez le flacon de 200 mL avec de l'*alcool à 60 pour cent V/V R* et filtrez puis transférez dans la même fiole jaugée de 100 mL. Complétez au volume avec de l'*alcool à 60 pour cent V/V R* et filtrez.

*Solution à examiner*. Introduisez 5,0 mL de solution mère dans un ballon à fond rond et évaporez à siccité sous pression réduite. Reprenez le résidu avec 8 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique glacial R*, et transvasez dans une fiole jaugée de 25 mL. Rincez le ballon à fond rond avec 3 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique glacial R* et versez dans la même fiole jaugée de 25 mL que précédemment. Ajoutez 10,0 mL d'une solution contenant 25,0 g/L d'*acide borique R* et 20,0 g/L d'*acide oxalique R* dans de l'*acide formique anhydre R* puis complétez à 25,0 mL avec de l'*acide acétique anhydre R*.

*Liquide de compensation*. Introduisez 5,0 mL de solution mère dans un ballon à fond rond et évaporez à siccité sous pression réduite. Reprenez le résidu dans 8 mL d'un mélange de 10 volumes de *méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique glacial R* et transvasez dans une fiole jaugée de 25 mL. Rincez le ballon à fond rond avec 3 mL d'un mélange de 10 volumes de

*méthanol R* et de 100 volumes d'*acide acétique glacial R* et versez dans la même fiole jaugée de 25 mL que précédemment. Ajoutez 10,0 mL d'*acide formique anhydre R* puis complétez à 25,0 mL avec de l'*acide acétique anhydre R*.

Après 30 min, mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner à 405 nm.

Calculez la teneur pour cent en flavonoïdes totaux, exprimés en violanthine, à l'aide de l'expression :

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

en prenant 400 comme valeur de l'absorbance spécifique de la violanthine.

*A* = absorbance mesurée à 405 nm,

*m* = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2011:1847**

# PETIT HOUX

## Rusci rhizoma

DÉFINITION

Organes souterrains, entiers ou fragmentés, séchés de *Ruscus aculeatus* L.

*Teneur* : au minimum 1,0 pour cent de sapogénines totales, exprimées en ruscogénines [mélange de néoruscogénine ($C_{27}H_{40}O_4$ ; $M_r$ 428,6) et de ruscogénine ($C_{27}H_{42}O_4$ ; $M_r$ 430,6)] (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Le rhizome du petit houx est formé de pièces ramifiées, articulées, quelque peu noueuses, cylindriques ou subconiques, d'environ 5-10 cm de long et d'environ 5 mm d'épaisseur, jaunâtres. La surface est marquée d'anneaux minces, séparés les uns des autres, de 1-3 mm d'épaisseur. Des cicatrices arrondies provenant des tiges aériennes sont présentes sur la surface supérieure. Sur la surface inférieure apparaissent de nombreuses racines ou leurs cicatrices ; les racines ont environ 2 mm de diamètre et une coloration semblable à celle du rhizome. La couche externe se détache facilement, laissant paraître un cylindre central très dur, blanc-jaune.

B. Réduisez le petit houx en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaunâtre. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants (figure 1847.-1) : des amas de sclérenchyme du rhizome, à cellules de formes variées, arrondies, allongées ou rectangulaires, à parois modérément épaissies en chapelet, avec de larges ponctuations arrondies ou ovales [F, G, L, P, Q] ; des fragments de l'endoderme composé d'une couche unique de cellules irrégulièrement épaissies [K] ; des groupes de cellules parenchymateuses arrondies, aux coins épaissis, avec de petits espaces intercellulaires triangulaires [D, E, N] ; un parenchyme à parois fines [J] dont certaines cellules contiennent des raphides d'oxalate de calcium [C] ; des groupes [H] de fibres à parois épaissies [Ha] et de petits vaisseaux allant jusqu'à environ 50 µm de diamètre et dont les parois présentent de nombreuses petites ponctuations en fente [A, Hb] ; de rares fragments du tissu de revêtement des racines [B] ; des raphides d'oxalate de calcium, isolées [M].

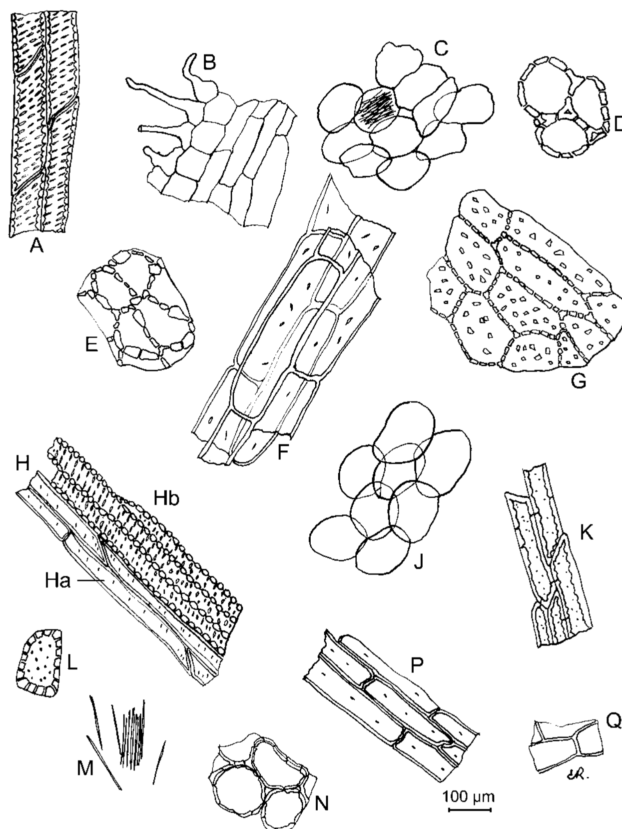



Figure 1847.-1.– *Dessin pour l'identification B du petit houx pulvérisé*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dans un ballon à col rodé de 100 mL, introduisez 1,0 g de petit houx pulvérisé (355) (*2.9.12*) et 50 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 40 min. Laissez refroidir et extrayez le mélange non filtré avec 3 fois 25 mL de *chlorure de méthylène R*. Réunissez les solutions organiques et séchez-les sur du *sulfate de sodium anhydre R*. Filtrez et évaporez à siccité. Dissolvez le résidu dans 5 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 1 mg de *ruscogénines SCR* et 1 mg de *stigmastérol R* dans du *méthanol R* et complétez à 5 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *méthanol R, chlorure de méthylène R* (7:93 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 4 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez du *réactif à la vanilline R* et séchez à l'étuve à 100-105 °C pendant 1 min ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| | Plusieurs bandes de diverses couleurs |
| Stigmastérol : une bande violette | Une bande violette |
| _______ | _______ |
| | Une bande violette |
| Ruscogénines : une bande jaune | Une bande jaune (ruscogénines) |
| | Plusieurs bandes de diverses couleurs |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de petit houx pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 12,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 5,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* A 2,000 g de petit houx pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 60 mL d'*éthanol anhydre R*, 15 mL d'*eau R* et 0,2 g d'*hydroxyde de potassium R*. Procédez à l'extraction en chauffant à reflux au bain-marie pendant 4 h. Laissez refroidir et filtrez dans une fiole jaugée de 100 mL. Rincez la fiole utilisée pour l'extraction et le résidu du filtre avec 3 fois 10 mL d'*éthanol anhydre R*. Ajoutez les eaux de lavage dans la fiole jaugée et complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol anhydre R*. Introduisez 25,0 mL de cette solution dans un ballon à fond rond destiné à un évaporateur rotatif et évaporez à siccité. Dissolvez le résidu dans 10 mL de *butanol R*. Ajoutez 3 mL d'*acide chlorhydrique R1* et 8 mL d'*eau R*. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 1 h. Laissez refroidir puis introduisez le liquide dans une fiole jaugée de 100 mL. Rincez le ballon à fond rond avec 3 fois 20 mL de *méthanol R*. Ajoutez les eaux de lavage dans la fiole jaugée et complétez à 100,0 mL avec du *méthanol R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 5,0 mg de *ruscogénines SCR* dans 100 mL de *méthanol R*.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *eau R*,
– *phase mobile B* : *acétonitrile R1*,

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 25 | 40 | 60 |
| 25 - 27 | 40 → 0 | 60 → 100 |
| 27 - 37 | 0 | 100 |

*Débit* : 1,2 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 203 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Identification des pics* : utilisez le chromatogramme fourni avec les *ruscogénines SCR* et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin pour identifier les pics dus à la néoruscogénine et à la ruscogénine.

*Rétention relative* par rapport à la néoruscogénine (temps de rétention = environ 16 min) : ruscogénine = environ 1,2.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus à la néoruscogénine et à la ruscogénine.

Calculez la teneur pour cent en sapogénines, exprimées en ruscogénines (néoruscogénine et ruscogénine), à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times 4 \times p_1}{A_2 \times m_1} + \frac{A_3 \times m_2 \times 4 \times p_2}{A_4 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à la ruscogénine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à la ruscogénine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$A_3$ = surface du pic dû à la néoruscogénine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_4$ = surface du pic dû à la néoruscogénine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la drogue à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse de *ruscogénines SCR* utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,

$p_1$ = teneur pour cent en ruscogénine des *ruscogénines SCR*,

$p_2$ = teneur pour cent en néoruscogénine des *ruscogénines SCR*.

**01/2011:1859**

# PIMENT DE CAYENNE

## Capsici fructus

DÉFINITION

Fruit mûr desséché de *Capsicum annuum* L. var. *minimum* (Miller) Heiser et des variétés à petits fruits de *Capsicum frutescens* L.

*Teneur* : au minimum 0,4 pour cent de capsaïcinoïdes totaux, exprimés en capsaïcine ($C_{18}H_{27}NO_3$ ; $M_r$ 305,4) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Saveur extrêmement piquante.

IDENTIFICATION

A. Le fruit du piment de Cayenne, de couleur orange-jaune ou brun-rouge, a la forme d'un cône oblong à apex obtus, d'une longueur d'environ 1-3 cm et d'un diamètre atteignant 1 cm dans sa partie la plus large. Il porte parfois, à la base, les restes d'un calice à 5 dents et d'un pédoncule droit. Le péricarpe, glabre, plus ou moins ratatiné et ridé, renferme 10-20 graines réniformes aplaties, d'une longueur de 3-4 mm, qui peuvent être libres ou adhérer à un septum rougeâtre.

B. Réduisez le piment de Cayenne en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est orange. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants (figure 1859.-1) : des fragments d'épicarpe, vu de face, à cellules souvent disposées en files de 5 à 7 [E], à parois épaissies près du pédoncule [B] et à cuticule uniformément striée [A] ; des fragments du péricarpe, vu en section transversale [D], comprenant l'épicarpe recouvert d'une cuticule épaisse [Da] et des cellules parenchymateuses contenant souvent des gouttelettes huileuses rouges et parfois des microcristaux cunéiformes d'oxalate de calcium [Db] ; des fragments d'endocarpe [C] constitué de cellules sclérenchymateuses organisées en îlots caractéristiques [Ca] séparés par des cellules parenchymateuses à paroi mince [Cb] ; des fragments de graines, avec un épisperme constitué

Drogues végétales

de grands sclérites jaune-vert à parois sinueuses, à parois externes minces et parois radiales et internes fortement et irrégulièrement épaissies, très visiblement ponctuées [G] ; un albumen composé de cellules parenchymateuses contenant des gouttes huileuses et des grains d'aleurone d'un diamètre de 3-6 µm [H] ; quelques rares fragments du calice, avec un épiderme externe à stomates de type anisocytique (*2.8.3*) [J], un épiderme interne sans stomates portant de nombreux poils sécréteurs à pied unisérié et tête pluricellulaire [N], et un mésophylle [L] à nombreux idioblastes contenant des prismes d'oxalate de calcium [La] ou des microcristaux cunéiformes d'oxalate de calcium [Lb] ; des prismes [K] ou des macles [M] d'oxalate de calcium, isolés ; des vaisseaux à épaississements spiralés ou annelés [F].

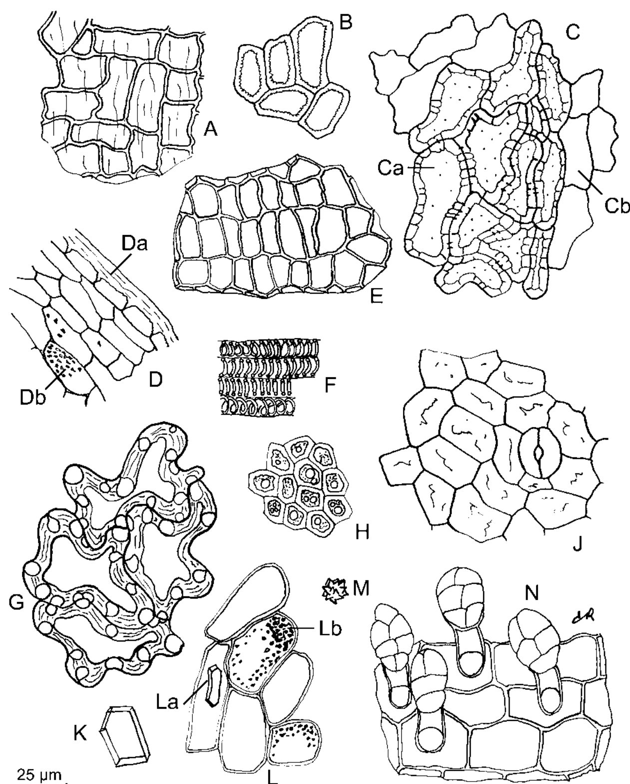



Figure 1859.-1.– *Dessin pour l'identification B du piment de Cayenne pulvérisé*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 0,50 g de piment de Cayenne pulvérisé (500) (*2.9.12*), ajoutez 5,0 mL d'*éther R*, agitez pendant 5 min et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 2 mg de *capsaïcine R* et 2 mg de *dihydrocapsaïcine R* dans 5,0 mL d'*éther R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice octadécylsilylé pour CCM R*.

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R* (20:80 *V/V*).

*Dépôt* : 20 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 12 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution de *dichloroquinonechlorimide R* à 5 g/L dans du *méthanol R*. Exposez aux vapeurs d'ammoniac jusqu'à apparition de bandes bleues. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et la solution témoin. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Capsaïcine : une bande bleue | Une bande bleue (capsaïcine) |
| Dihydrocapsaïcine : une bande bleue | Une bande bleue (dihydrocapsaïcine) |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Nonivamide**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* A 2,5 g de piment de Cayenne pulvérisé (500) (*2.9.12*), ajoutez 100 mL de *méthanol R*. Laissez macérer pendant 30 min. Placez dans un bain à ultrasons pendant 15 min. Filtrez dans une fiole jaugée de 100 mL, rincez le flacon et filtrez avec du *méthanol R* puis complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin.* Dissolvez 20,0 mg de *capsaïcine SCR* et 4,0 mg de *nonivamide SCR* dans du *méthanol R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice phénylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
– *température* : 30 °C.

*Phase mobile* : mélangez 40 volumes d'*acétonitrile R* et 60 volumes d'une solution d'*acide phosphorique R* à 1 g/L.

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 225 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Ordre d'élution* : nordihydrocapsaïcine, nonivamide, capsaïcine, dihydrocapsaïcine.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au nonivamide et à la capsaïcine.

Calculez la teneur pour cent en nonivamide à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{F_1 \times m_2 \times p_1}{F_2 \times m_1}$$

$F_1$ = surface du pic du nonivamide dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_2$ = surface du pic du nonivamide dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai de la drogue, en grammes,

$m_2$ = masse de *nonivamide SCR* utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,

$p_1$ = teneur pour cent en nonivamide du *nonivamide SCR*.

*Limite* :

– *nonivamide* : au maximum 5,0 pour cent de la teneur totale en capsaïcinoïdes.

**Eléments étrangers** (*2.8.2*). Le piment de Cayenne ne contient pas de fruits de *C. annuum* L. var. *longum* (Sendtn.).

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 11,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de piment de Cayenne pulvérisé (500) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai du nonivamide.

Calculez la teneur pour cent en capsaïcinoïdes totaux, exprimés en capsaïcine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{(F_3 + F_5 + F_6) \times m_4 \times p_2}{F_4 \times m_3}$$

$F_3$ = surface du pic de la capsaïcine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_4$ = surface du pic de la capsaïcine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$F_5$ = surface du pic de la dihydrocapsaïcine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_6$ = surface du pic de la nordihydrocapsaïcine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$m_3$ = masse de la prise d'essai de la drogue, en grammes,

$m_4$ = masse de *capsaïcine SCR* utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,

$p_2$ = teneur pour cent en capsaïcine de la *capsaïcine SCR*.

**01/2008:2336**

# PIMENT DE CAYENNE (OLÉORÉSINE RAFFINÉE ET QUANTIFIÉE DE)

## Capsici oleoresina raffinata et quantificata

DÉFINITION

Oléorésine raffinée et quantifiée produite à partir de *Piment de Cayenne (1859)*.

*Teneur* : 6,5 pour cent à 8,0 pour cent *m/m* de capsaïcinoïdes totaux, exprimés en capsaïcine ($C_{18}H_{27}NO_3$ ; $M_r$ 305,4).

PRODUCTION

L'oléorésine raffinée et quantifiée de piment de Cayenne est produite à partir de la drogue végétale et d'éthanol à au minimum 90 pour cent *V/V* ou de méthanol à au minimum 90 pour cent *V/V*, par une méthode appropriée.

CARACTÈRES

*Aspect* : extrait liquide épais rouge ou brun.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 50 mg d'oléorésine à examiner dans 5 mL d'*éther R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 2 mg de *capsaïcine R* et 2 mg de *dihydrocapsaïcine R* dans 5 mL d'*éther R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice octadécylsilylé pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice octadécylsilylé pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R* (20:80 *V/V*).

*Dépôt* : 20 µL [ou 2 µL] en bandes de 15 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 12 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution de *dichloroquinone-chlorimide R* à 0,25 g/L dans de l'*acétate d'éthyle R*. Exposez aux vapeurs d'ammoniac jusqu'à apparition de bandes bleues. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| Capsaïcine : une bande bleue | Une bande bleue (capsaïcine) |
| Dihydrocapsaïcine : une bande bleue | Une faible bande bleue (dihydrocapsaïcine) |
| ——— | ——— |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Nonivamide**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,300 g d'oléorésine à examiner dans 60 mL de *méthanol R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 20,0 mg de *capsaïcine SCR* et 4,0 mg de *nonivamide SCR* dans 100,0 mL de *méthanol R*.

*Colonne* :

- *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice phénylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
- *température* : 30 °C.

*Phase mobile* : *acétonitrile R*, solution d'*acide phosphorique R* à 1 g/L (40:60 *V/V*).

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 225 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Ordre d'élution* : nordihydrocapsaïcine, nonivamide, capsaïcine, dihydrocapsaïcine.

*Conformité du système* : solution témoin :

- *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au nonivamide et à la capsaïcine.

Calculez la teneur pour cent en nonivamide à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{F_1 \times m_2 \times p_1}{F_2 \times m_1}$$

$F_1$ = surface du pic dû au nonivamide dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_2$ = surface du pic dû au nonivamide dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai, en grammes,

$m_2$ = masse de *nonivamide SCR* dans la solution témoin, en grammes,

$p_1$ = teneur pour cent en nonivamide du *nonivamide SCR*.

*Limite* :

- *nonivamide* : au maximum 5,0 pour cent de la teneur totale en capsaïcinoïdes.

**Eau** (*2.5.12*) : au maximum 8,0 pour cent, déterminé sur 5,00 g d'oléorésine à examiner.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai du nonivamide.

Drogues végétales

Calculez la teneur pour cent en capsaïcinoïdes totaux, exprimés en capsaïcine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{(F_3 + F_5 + F_6) \times m_4 \times p_2}{F_4 \times m_3}$$

$F_3$ = surface du pic dû à la capsaïcine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ;

$F_4$ = surface du pic dû à la capsaïcine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin ;

$F_5$ = surface du pic dû à la dihydrocapsaïcine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ;

$F_6$ = surface du pic dû à la nordihydrocapsaïcine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ;

$m_3$ = masse de la prise d'essai, en grammes ;

$m_4$ = masse de *capsaïcine SCR* dans la solution témoin, en grammes,

$p_2$ = teneur pour cent en capsaïcine de la *capsaïcine SCR*.

**01/2008:2337**

# PIMENT DE CAYENNE (TEINTURE TITRÉE DE)

## Capsici tinctura normata

DÉFINITION

Teinture titrée produite à partir de *Piment de Cayenne (1859)* ou d'*Oléorésine raffinée et quantifiée de piment de Cayenne (2336)*.

*Teneur* : 90 pour cent à 110 pour cent de la teneur nominale en capsaïcinoïdes totaux, exprimés en capsaïcine ($C_{18}H_{27}NO_3$ ; $M_r$ 305,4), indiquée sur l'étiquette, teneur qui est comprise entre 0,020 pour cent *m/m* et 0,060 pour cent *m/m*.

PRODUCTION

La teinture titrée de piment de Cayenne est produite à partir de la drogue végétale ou de l'oléorésine, et d'éthanol (70 pour cent *V/V* à 85 pour cent *V/V*), par une méthode appropriée.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide orange-jaune ou orange-rouge.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Agitez 10 mL de teinture à examiner avec 10 mL d'*hexane R*. Laissez les phases se séparer et utilisez la phase inférieure.

*Solution témoin*. Dissolvez 1 mg de *capsaïcine R* et 1 mg de *dihydrocapsaïcine R* dans 5 mL d'*éther R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice octadécylsilylé pour CCM R* (5-40 μm) [ou *plaque au gel de silice octadécylsilylé pour CCM R* (2-10 μm)].

*Phase mobile* : *eau R*, *méthanol R* (20:80 *V/V*).

*Dépôt* : 20 μL [ou 2 μL] en bandes de 15 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 12 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution de *dichloroquinone-chlorimide R* à 0,25 g/L dans l'*acétate d'éthyle R*. Exposez aux vapeurs d'ammoniac jusqu'à apparition de bandes bleues. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Capsaïcine : une bande bleue | Une bande bleue (capsaïcine) |
| Dihydrocapsaïcine : une bande bleue | Une faible bande bleue (dihydrocapsaïcine) |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Nonivamide**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Prélevez 50,0 g de teinture à examiner et complétez à 100,0 mL avec du *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 20,0 mg de *capsaïcine SCR* et 4,0 mg de *nonivamide SCR* dans 100,0 mL de *méthanol R*.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice phénylsilylé pour chromatographie R* (5 μm),
– *température* : 30 °C.

*Phase mobile* : *acétonitrile R*, solution d'*acide phosphorique R* à 1 g/L (40:60 *V/V*).

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 225 nm.

*Injection* : 10 μL.

*Ordre d'élution* : nordihydrocapsaïcine, nonivamide, capsaïcine, dihydrocapsaïcine.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au nonivamide et à la capsaïcine.

Calculez la teneur pour cent en nonivamide à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{F_1 \times m_2 \times p_1}{F_2 \times m_1}$$

$F_1$ = surface du pic dû au nonivamide dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_2$ = surface du pic dû au nonivamide dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai, en grammes,

$m_2$ = masse de *nonivamide SCR* dans la solution témoin, en grammes,

$p_1$ = teneur pour cent en nonivamide du *nonivamide SCR*.

*Limite* :

– *nonivamide* : au maximum 5,0 pour cent de la teneur totale en capsaïcinoïdes.

**Ethanol** (*2.9.10*) : 95 pour cent à 105 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Méthanol et 2-propanol** (*2.9.11*) : au maximum 0,05 pour cent *V/V* de méthanol et au maximum 0,05 pour cent *V/V* de 2-propanol.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai du nonivamide.

Calculez la teneur pour cent en capsaïcinoïdes totaux, exprimés en capsaïcine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{(F_3 + F_5 + F_6) \times m_4 \times p_2}{F_4 \times m_3}$$

$F_3$ = surface du pic dû à la capsaïcine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_4$ = surface du pic dû à la capsaïcine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$F_5$ = surface du pic dû à la dihydrocapsaïcine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$F_6$ = surface du pic dû à la nordihydrocapsaïcine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$m_3$ = masse de la prise d'essai, en grammes,

$m_4$ = masse de *capsaïcine SCR* dans la solution témoin, en grammes,

$p_2$ = teneur pour cent en capsaïcine de la *capsaïcine SCR*.

**01/2008:2377**

# PIN DE MONTAGNE (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Pini pumilionis aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau à partir de feuilles et rameaux frais de *Pinus mugo* Turra. Un antioxydant approprié peut être ajouté.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, incolore ou jaune clair.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Prélevez 1 mL d'huile essentielle à examiner et complétez à 10 mL avec du *toluène R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg de *bornéol R* et 10 µL d'*acétate de bornyle R* dans du *toluène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 2 µL], en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande rose |
| _______ | _______ |
| Acétate de bornyle : une bande brune ou brun-gris | Une bande brune ou brun-gris (acétate de bornyle)<br>Une bande rose |
| _______ | _______ |
| Bornéol : une bande brune ou brun-gris | Un ensemble compact de bandes violettes |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention, à ceux du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,857 à 0,868.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,474 à 1,480.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : – 7° à – 15°.

**Indice d'acide** (*2.5.1*) : au maximum 1,0.

**Indice de peroxyde** (*2.5.5*) : au maximum 20.

**Huiles grasses et huiles essentielles résinifiées** (*2.8.7*). L'huile essentielle à examiner satisfait à l'essai.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. Prélevez 200 µL d'huile essentielle à examiner et complétez à 10,0 mL avec de l'*heptane R*.

*Solution témoin (a)*. Diluez 30 µL d'*α-pinène R*, 5 mg de *camphène R*, 10 µL de *β-pinène R*, 20 µL de *car-3-ène R*, 5 µL de *β-myrcène R*, 10 µL de *limonène R*, 5 µL de *p-cymène R*, 10 µL de *terpinolène R*, 5 µL d'*acétate de bornyle R* et 5 µL de *β-caryophyllène R* dans de l'*heptane R* et complétez à 5 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 5 mg de *camphène R* dans de l'*heptane R* et complétez à 50,0 mL avec le même solvant. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec de l'*heptane R*.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 60 m, Ø = 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur du film 0,25 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Rapport de division* : 1:50.

*Température* :

| | **Intervalle (min)** | **Température (°C)** |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 10 | 65 |
| | 10 - 41 | 65 → 220 |
| | 41 - 50 | 220 |
| Chambre à injection | | 220 |
| Détecteur | | 250 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL.

*Ordre d'élution* : ordre indiqué pour la préparation de la solution témoin (a) ; notez le temps de rétention de ces substances.

Drogues végétales

*Conformité du système* : solution témoin (a) :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au car-3-ène et au β-myrcène.

*Identification des composants* : à l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a), localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les composants de la solution témoin (a). Le pic dû au β-phellandrène élue après le pic dû au limonène, avec une rétention relative d'environ 1,03 par rapport au limonène.

Déterminez la teneur pour cent de chacun de ces composants. Ces teneurs sont comprises dans les limites suivantes :

– *α-pinène* : 10,0 pour cent à 30,0 pour cent,
– *camphène* : au maximum 2,0 pour cent,
– *β-pinène* : 3,0 pour cent à 14,0 pour cent,
– *car-3-ène* : 10,0 pour cent à 20,0 pour cent,
– *β-myrcène* : 3,0 pour cent à 12,0 pour cent,
– *limonène* : 8,0 pour cent à 14,0 pour cent,
– *β-phellandrène* : 10,0 pour cent à 19,0 pour cent,
– *p-cymène* : au maximum 2,5 pour cent,
– *terpinolène* : au maximum 8,0 pour cent,
– *acétate de bornyle* : 0,5 pour cent à 5,0 pour cent,
– *β-caryophyllène* : 0,5 pour cent à 5,0 pour cent,
– *limite d'exclusion* : la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,05 pour cent).

CONSERVATION

En récipient inerte et à une température ne dépassant pas 25 °C.

**01/2008:1842**

# PIN SYLVESTRE (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Pini sylvestris aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entrainement à la vapeur d'eau des feuilles et des rameaux frais de *Pinus sylvestris* L. Un antioxydant approprié peut être ajouté.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, incolore ou jaune pâle.

Odeur caractéristique.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Diluez 1 mL d'huile essentielle à examiner dans du *toluène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg de *bornéol R* et 10 µL d'*acétate de bornyle R* dans du *toluène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 2 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : traitez avec de la *solution d'aldéhyde anisique R*, chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min puis examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande rose (hydrocarbures) |
| _______ | _______ |
| Acétate de bornyle : une bande brune ou brun-gris | Une bande brune ou brun-gris (acétate de bornyle)<br>Une bande rose |
| _______ | _______ |
| Bornéol : une bande brune ou brun-gris | Agglomérat de bandes violettes |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leurs temps de rétention aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,855 à 0,875.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,465 à 1,480.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : – 9° à – 30°.

**Indice d'acide** (*2.5.1*) : au maximum 1,0.

**Indice de peroxyde** (*2.5.5*) : au maximum 20.

**Huiles grasses et huiles essentielles résinifiées dans les huiles essentielles** (*2.8.7*). L'huile essentielle à examiner satisfait à l'essai.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. L'huile essentielle à examiner.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 30 µL d'*α-pinène R*, 10 mg de *camphène R*, 20 µL de *β-pinène R*, 10 µL de *car-3-ène R*, 10 µL de *β-myrcène R*, 20 µL de *limonène R*, 10 µL de *p-cymène R*, 10 µL de *terpinolène R*, 10 µL d'*acétate de bornyle R* et 10 µL de *β-caryophyllène R* dans 1 mL d'*heptane R*.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 10 mg de *camphène R* dans de l'*heptane R* et complétez à 2 mL avec le même solvant. Prélevez 0,1 mL de solution et complétez à 1 mL avec de l'*heptane R*.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 60 m, Ø = 0,22 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (0,2 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Rapport de division* : 1:100.

*Température* :

| | **Intervalle (min)** | **Température (°C)** |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 10 | 65 |
| | 10 - 41 | 65 → 220 |
| | 41 - 50 | 220 |
| Chambre à injection | | 220 |
| Détecteur | | 250 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 0,2 µL.

Drogues végétales

*Ordre d'élution* : ordre indiqué pour la préparation de la solution témoin (a). Notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin (a) :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au car-3-ène et au β-myrcène.

*Identification des composants* : à l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a), localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les composants de la solution témoin (a). Le pic dû au β-phellandrène est élué après le pic dû au limonène avec une rétention relative d'environ 1,03 par rapport au limonène.

Déterminez la teneur pour cent de chacun de ces composants. Ces teneurs sont comprises dans les valeurs suivantes :

– *α-pinène* : 32,0 pour cent à 60,0 pour cent,
– *camphène* : 0,5 pour cent à 2,0 pour cent,
– *β-pinène* : 5,0 pour cent à 22,0 pour cent,
– *car-3-ène* : 6,0 pour cent à 18,0 pour cent,
– *β-myrcène* : 1,5 pour cent à 10,0 pour cent,
– *limonène* : 7,0 pour cent à 12,0 pour cent,
– *β-phellandrène* : au maximum 2,5 pour cent,
– *p-cymène* : au maximum 2,0 pour cent,
– *terpinolène* : au maximum 4,0 pour cent,
– *acétate de bornyle* : 1,0 pour cent à 4,0 pour cent,
– *β-caryophyllène* : 1,0 pour cent à 6,0 pour cent,
– *limite d'exclusion* : la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b).

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

**01/2010:1851**

# PISSENLIT (PARTIE AÉRIENNE ET RACINE DE)

## Taraxaci officinalis herba cum radice

DÉFINITION

Mélange de parties aériennes et souterraines séchées, entières ou fragmentées, de *Taraxacum officinale* F.H. Wigg.

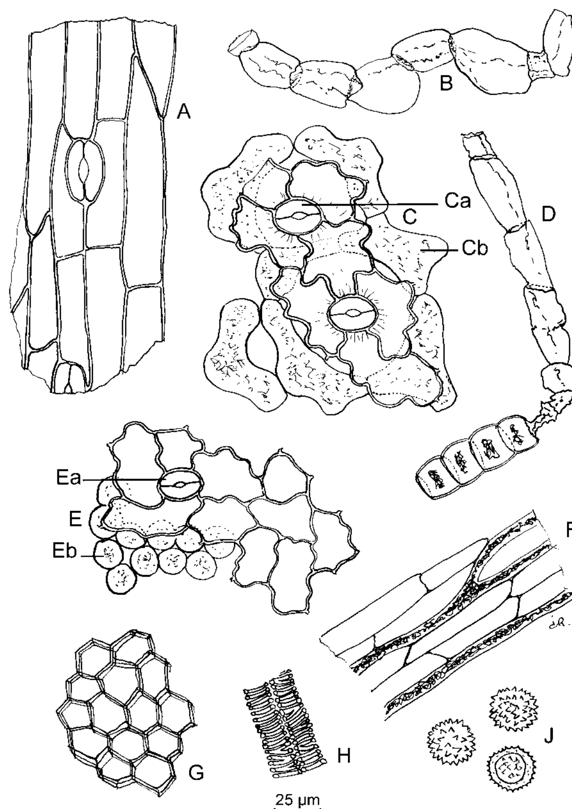
CARACTÈRES

Saveur amère.

IDENTIFICATION

A. La partie souterraine de pissenlit se présente sous forme de fragments de 2-3 cm de long, brun foncé ou noirâtres, grossièrement ridés longitudinalement sur la surface externe. Le collet épaissi montre de nombreuses cicatrices laissées par les feuilles en rosette. La cassure est nette. La section transversale montre une zone corticale blanc-gris ou brunâtre dans laquelle se situent des zones concentriques de laticifères brunâtres et du bois jaune pâle, poreux et non radié. Les fragments de feuilles sont verts, glabres ou à forte pilosité. Ils sont froissés et présentent généralement une nervure centrale nettement apparente sur la face inférieure. Le limbe, à bords largement dentés, est froissé. Les capitules floraux, solitaires, portés par une hampe florale creuse, sont composés d'un involucre de bractées foliacées vertes entourant les fleurs jaunes, toutes ligulées ; quelques akènes surmontés d'un pappus blanc, soyeux et étalé, peuvent être présents.

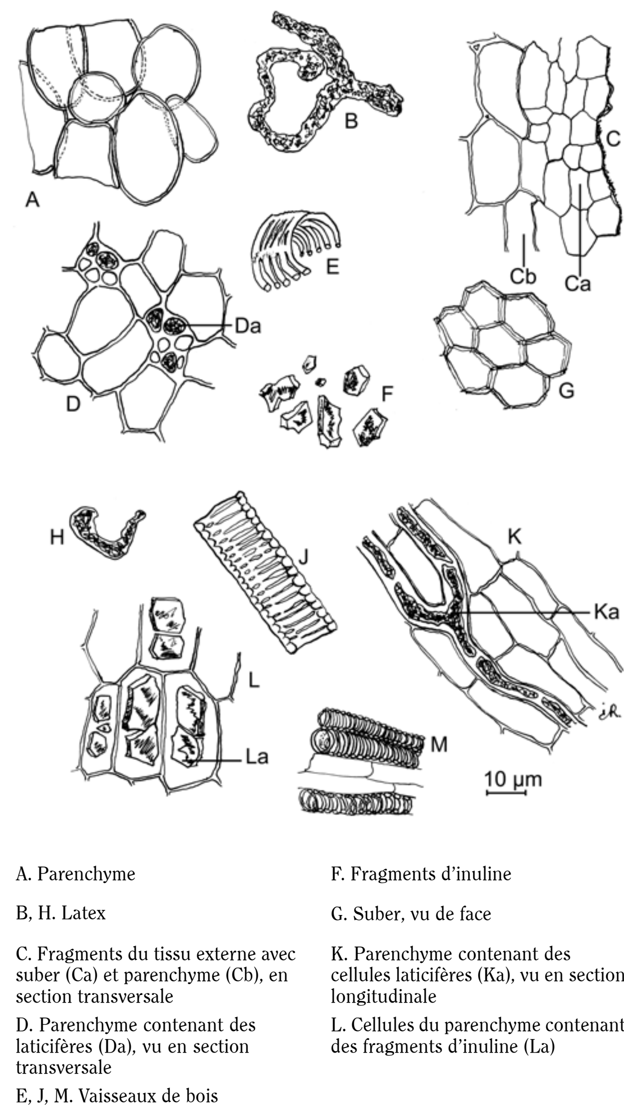
B. Réduisez le pissenlit en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de suber à cellules aplaties et à parois minces ; des vaisseaux de bois provenant des racines, à ornementation réticulée ; des fragments de parenchyme contenant des laticifères ramifiés ; des fragments de feuilles aux épidermes composés de cellules lobées en puzzle, des stomates de type anomocytique (*2.8.3*) et des poils tecteurs allongés, pluricellulaires, à étranglements, plus ou moins abondants selon les variétés ou sous-variétés ; des fragments de l'épiderme supérieur de la feuille généralement accompagnés de parenchyme palissadique et des fragments de l'épiderme inférieur accompagnés de parenchyme lacuneux ; des vaisseaux des bois à épaississement annelé ou spiralé ; des fragments de la hampe florale à épiderme stomatifère à cellules allongées aux parois rigides ; des grains de pollen à exine ponctuée. Examinez au microscope en utilisant du *glycérol R*. La poudre présente des morceaux d'inuline, anguleux et irréguliers, libres ou inclus dans des cellules de parenchyme.




A. Epiderme de la hampe florale, vu de face
B, D. Poils tecteurs pluricellulaires
C. Epiderme inférieur de la feuille, vu de face, avec stomates anisocytiques (Ca), et partie du mésophylle lacuneux sous-jacent (Cb)
E. Epiderme supérieur de la feuille, vu de face, avec stomates anisocytiques (Ea), et partie du parenchyme palissadique sous-jacent (Eb)
F. Parenchyme contenant des laticifères ramifiés
G. Suber vu de face
H. Vaisseaux à ornementation réticulée de la nervure foliaire
J. Grains de pollen

Figure 1851.-1. – *Dessin pour l'identification de la partie aérienne de pissenlit (voir Identification B)*

Drogues végétales




A. Parenchyme
B, H. Latex
C. Fragments du tissu externe avec suber (Ca) et parenchyme (Cb), en section transversale
D. Parenchyme contenant des laticifères (Da), vu en section transversale
E, J, M. Vaisseaux de bois
F. Fragments d'inuline
G. Suber, vu de face
K. Parenchyme contenant des cellules laticifères (Ka), vu en section longitudinale
L. Cellules du parenchyme contenant des fragments d'inuline (La)

Figure 1851.-2. – *Dessin pour l'identification de la racine de pissenlit (voir Identification B)*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 2,0 g de drogue végétale pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Chauffez au bain-marie à 60 °C ou traitez aux ultrasons pendant 10 min. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 2 mg d'*acide chlorogénique R* et 2 mg de *rutine R* dans du *méthanol R* et complétez à 20 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, acétate d'éthyle R* (10:10:80 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL [ou 5 µL] en bandes de 10 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 12 cm [ou 7 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : chauffez à 100 °C pendant 5 min, pulvérisez avec (ou plongez brièvement dans) une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R* ; chauffez ensuite à 100 °C pendant 5 min, pulvérisez avec (ou plongez brièvement dans) une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R*, chauffez à 100 °C pendant 5 min et examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande rouge de faible intensité |
| | Une bande jaune de faible intensité |
| _______ | _______ |
| Acide chlorogénique : une bande bleue | 2 bandes bleu clair |
| _______ | _______ |
| Rutine : une bande brun-jaune | |
| | Une bande bleu clair |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 17,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 5,0 pour cent.

**Matières extractibles** : au minimum 30,0 pour cent.

A 2,000 g de drogue végétale pulvérisée (250) (*2.9.12*), ajoutez 40 g d'*eau R*. Agitez pendant 1 h et filtrez. Evaporez 10 g de filtrat à siccité au bain-marie, puis desséchez à l'étuve à 100-105 °C pendant 2 h. La masse du résidu est au minimum de 0,15 g.

**Indice d'amertume** (*2.8.15*) : au minimum 100.

**01/2011:1852**

# PISSENLIT (RACINE DE)

## Taraxaci officinalis radix

DÉFINITION

Parties souterraines entières ou fragmentées, séchées, de *Taraxacum officinale* F.H.Wigg.

CARACTÈRES

Saveur amère.

IDENTIFICATION

A. La racine de pissenlit est pivotante, peu ramifiée, brun foncé ou noirâtre et grossièrement ridée longitudinalement sur sa surface externe. Le collet épaissi montre de nombreuses cicatrices laissées par les feuilles en rosette. La cassure est nette. La section transversale montre une zone corticale blanc-gris ou brunâtre dans laquelle se situent des zones concentriques de laticifères brûnatres et une zone centrale jaune pâle, poreuse, non radiée.

B. Réduisez la racine de pissenlit en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants (figure 1852.-1) : des fragments de suber brun ou brun-rouge, vus de face [G] ou en section transversale [C], à cellules aplaties et à parois minces [Ca], parfois accompagnés de parenchyme [Cb] ; des vaisseaux de bois à ornementation réticulée [E, J, M] ; des fragments

de parenchyme [A, D, K, L] dont certains contiennent des laticifères ramifiés, vus en section longitudinale [Ka] et en section transversale [Da] ; du contenu granuleux des laticifères [B, H]. Examinez au microscope en utilisant du *glycérol R*. La poudre présente de très nombreux morceaux d'inuline, anguleux et irréguliers, isolés [F] ou inclus dans des cellules de parenchyme [La].

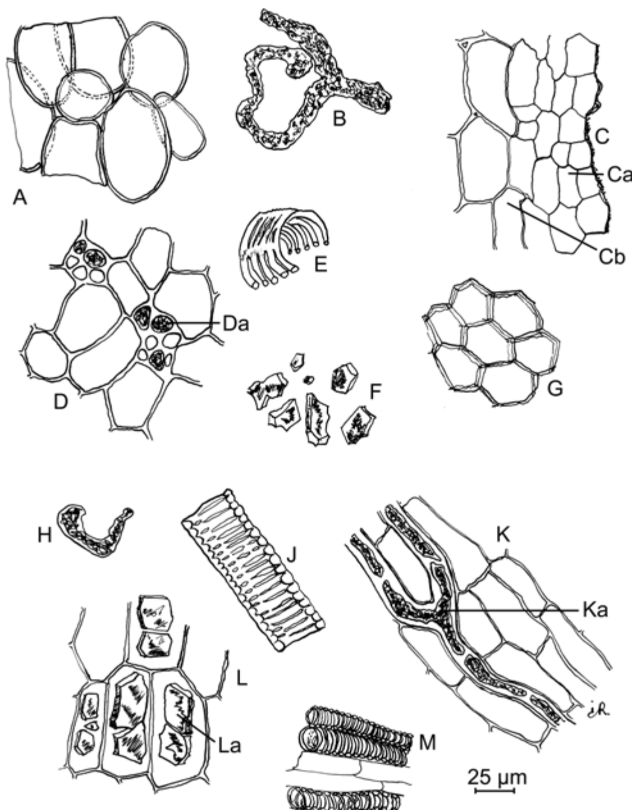



Figure 1852.-1.– *Dessin pour l'identification B de la racine de pissenlit pulvérisée*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 2,0 g de racine de pissenlit pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Chauffez au bain-marie à 60 °C ou traitez aux ultrasons pendant 10 min. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 2 mg d'*acide chlorogénique R* et 2 mg de *rutine R* dans du *méthanol R* et complétez à 20 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, acétate d'éthyle R* (10:10:80 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL [ou 5 µL] en bandes de 10 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 12 cm [ou 7 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : chauffez à 100 °C pendant 5 min, pulvérisez avec (ou plongez brièvement dans) une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R* ; chauffez ensuite à 100 °C pendant 5 min, pulvérisez avec (ou plongez brièvement dans) une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R*, chauffez à 100 °C pendant 5 min et examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande bleu clair |
| _______ | _______ |
| Acide chlorogénique : une bande bleue | Une bande bleue (acide chlorogénique) |
| _______ | _______ |
| Rutine : une bande brun-jaune | |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de racine de pissenlit pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 3,0 pour cent.

**Matières extractibles** : au minimum 20,0 pour cent.

A 2,000 g de racine de pissenlit pulvérisée (250) (*2.9.12*), ajoutez 40 g d'*eau R*. Agitez pendant 1 h et filtrez. Evaporez 10 g de filtrat à siccité au bain-marie, puis desséchez à l'étuve à 100-105 °C pendant 2 h. La masse du résidu est au minimum de 0,10 g.

**Indice d'amertume** (*2.8.15*) : au minimum 100.

**01/2008:1884**

# PLANTAIN LANCÉOLÉ

## Plantaginis lanceolatae folium

DÉFINITION

Feuille séchée, entière ou fragmentée et hampe florale, de *Plantago lanceolata* L. *s.l.*

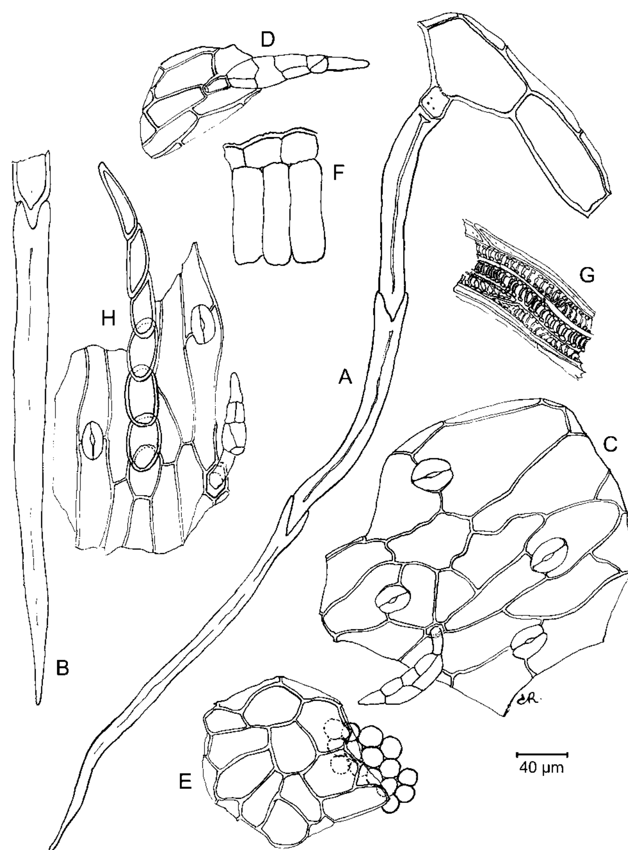
*Teneur* : au minimum 1,5 pour cent en dérivés totaux de l'acide *ortho*-dihydroxycinnamique, exprimés en actéoside ($C_{29}H_{36}O_{15}$ ; $M_r$ 624,6) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La feuille, de couleur vert-jaune à vert-brun, peut atteindre 30 cm de longueur et 4 cm de largeur. Elle présente à la face abaxiale des nervures nettement saillantes, presque parallèles, de couleur vert-blanc. Le limbe est lancéolé et atténué à la base en un pétiole en forme de gouttière. Le bord de la feuille est faiblement denté, souvent ondulé. La feuille présente 3, 5 ou 7 nervures principales, presque égales en longueur et sensiblement parallèles. Les poils peuvent être soit presque inexistants soit rares et disséminés ou parfois abondants, surtout à la face inférieure et sur les nervures. La hampe florale, d'un diamètre de 3-4 mm, est plus longue que les feuilles et de couleur vert-brun ; elle est parcourue de profonds sillons longitudinaux, avec 5-7 côtes bien marquées, et généralement couverte de poils fins.

B. Réduisez le plantain lancéolé en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments d'épiderme composés de cellules à parois anticlinales irrégulièrement sinueuses ou, pour les fragments de la hampe, à parois externes épaissies et à cuticule grossièrement ridée ; des stomates de type le plus souvent diacytique (*2.8.3*) et parfois anomocytique ; des poils tecteurs coniques, multicellulaires et unisériés, très caractéristiques, avec une cellule basale, plus large que les autres cellules épidermiques, surmontée d'une cellule courte suivie d'au moins 2 cellules allongées, à lumen étroit et irrégulier présentant des occlusions qui correspondent à des zones de léger renflement du poil et confèrent à celui-ci une apparence articulée, puis d'une cellule terminale à apex pointu et lumen filiforme ; des poils glanduleux à pédicelle

unicellulaire cylindrique et à tête pluricellulaire, conique et allongée, composée de plusieurs rangées de petites cellules et d'une cellule terminale unique ; des amas denses de tissu fibrovasculaire lignifié contenant d'étroits vaisseaux à épaississement spiralé et annelé et des fibres minces modérément épaissies.




A. Poil tecteur de la feuille (fragments seulement observés en général)
B. Poil tecteur sectionné de la feuille
C. Epiderme inférieur du limbe avec poil glanduleux
D. Poil glanduleux
E. Epiderme supérieur du limbe accompagné de parenchyme palissadique, vu de face
F. Epiderme supérieur et parenchyme palissadique, vu en section transversale
G. Vaisseaux de bois
H. Epiderme de la hampe florale

Figure 1884.-1. – *Dessin pour l'identification du plantain lancéolé (voir Identification B)*

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai des feuilles de *Digitalis lanata*.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Actéoside : une bande jaune | Une bande jaune (actéoside) |
| _______ | _______ |
| Aucubine : une bande bleue | Une bande bleue (aucubine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Feuilles de *Digitalis lanata*.** Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Mélange de solvants* : *eau R, méthanol R* (30:70 *V/V*).

*Solution à examiner.* Utilisez une solution récemment préparée. Dans un flacon de 25 mL, introduisez 1 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL du mélange de solvants et agitez pendant 30 min. Filtrez, puis rincez le flacon et le filtre avec 2 fois 5 mL du mélange de solvants. Complétez à 25 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin.* Dissolvez 1 mg d'*actéoside R* et 1 mg d'*aucubine R* dans 1 mL du mélange de solvants.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acide acétique R, acide formique anhydre R, eau R, acétate d'éthyle R* (11:11:27:100 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 8 cm ; après développement chauffez immédiatement à environ 120 °C pendant 5-10 min.

*Détection A* : examinez à la lumière du jour.

*Détection B* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats B* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande de fluorescence bleu brillant juste en-dessous de la bande de fluorescence brun-rouge correspondant à l'aucubine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent de feuilles de couleur différente et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 14,0 pour cent.

DOSAGE

*Solution mère.* Dans un flacon, introduisez 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*) et ajoutez 90 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R*. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Laissez refroidir et filtrez dans une fiole jaugée de 100 mL. Rincez le flacon et le filtre avec 10 mL d'*éthanol à 50 pour cent V/V R*. Réunissez le filtrat et la solution de rinçage et complétez à 100,0 mL avec de l'*éthanol à 50 pour cent V/V R*.

*Solution à examiner.* Dans une fiole jaugée de 10 mL, ajoutez successivement et en mélangeant après chaque addition, 1,0 mL de solution mère, 2 mL d'*acide chlorhydrique 0,5 M*, 2 mL d'une solution préparée en dissolvant 10 g de *nitrite de sodium R* et 10 g de *molybdate de sodium R* dans 100 mL d'*eau R*, puis 2 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* et complétez à 10,0 mL avec de l'*eau R*.

Mesurez immédiatement l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner à 525 nm en utilisant comme liquide de compensation, une solution preparée comme suit : dans une fiole jaugée de 10 mL, ajoutez 1,0 mL de solution mère, 2 mL d'*acide chlorhydrique 0,5 M*, 2 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* et complétez à 10,0 mL avec de l'*eau R*.

Calculez la teneur pour cent en dérivés totaux de l'acide *ortho*-dihydroxycinnamique, exprimés en actéoside, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 1000}{185 \times m}$$

en prenant 185 comme valeur de l'absorbance spécifique de l'actéoside à 525 nm.

$A$ = absorbance de la solution à examiner à 525 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

Drogues végétales

**01/2008:0202**

# POLYGALA (RACINE DE)

## Polygalae radix

DÉFINITION

Racine et souche séchée et généralement fragmentée de *Polygala senega* L. ou de certaines autres espèces apparentées ou d'un mélange de ces espèces de *Polygala*.

CARACTÈRES

Odeur faible et douceâtre, légèrement rance ou rappelant le salicylate de méthyle.

Pulvérisée, la racine de polygala est irritante et sternutatoire. Agitée avec de l'eau, la poudre donne une mousse abondante.

IDENTIFICATION

A. La souche est brun-gris et plus large que la racine ; elle forme une tête irrégulière constituée de nombreux restes de tiges et de bourgeons brun-pourpre serrés. La racine jaune ou brune peut être simple ou multiple, parfois flexueuse, généralement tortueuse et sans racines secondaires sauf dans les variétés et espèces japonaises qui comportent de nombreuses radicelles fibreuses. Le diamètre, généralement de 1-8 mm au niveau du collet, diminue progressivement vers l'extrémité ; la surface, ridée longitudinalement et transversalement, présente souvent une crête plus ou moins distincte, décurrente en hélice étirée. La cassure est nette et fait apparaître une écorce jaunâtre d'épaisseur souvent inégale, entourant une plage centrale ligneuse plus claire, de forme tantôt circulaire tantôt irrégulière selon les espèces.

B. Examinez la racine de polygala au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La coupe transversale de la racine présente les éléments suivants : un liège formé de plusieurs assises de cellules à parois minces et un phelloderme à cellules légèrement collenchymateuses contenant des gouttelettes d'huile ; le liber et le bois présentent habituellement une structure normale, surtout près du collet, mais dans la région d'une crête, celle-ci est formée par un développement plus important du liber ; d'autres structures secondaires anormales apparaissent parfois, formant 1-2 grands rayons cunéiformes dans le liber et le bois, dont les cellules parenchymateuses contiennent des gouttelettes d'huile. Le bois, habituellement central, comprend des vaisseaux dont le diamètre atteint 60 µm et qui sont associés à de nombreuses trachéides à parois minces et à quelques petites cellules de parenchyme ligneux.

C. Réduisez la racine de polygala en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun clair. Examinez la poudre au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments longitudinaux de tissu lignifié, composé de nombreuses trachéides ponctuées et de vaisseaux un peu plus larges, avec de nombreuses ponctuations en partie aréolées, des cellules du parenchyme et du collenchyme, jaunâtres, contenant des gouttelettes d'huile, quelques lambeaux de liège, ainsi que des fragments de tissu épidermique, avec des stomates et des poils unicellulaires, provenant des bourgeons de la souche. La poudre ne contient ni cristaux ni cellules scléreuses.

D. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Chauffez à reflux pendant 15 min, filtrez et laissez refroidir.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg d'*aescine R* dans de l'*éthanol à 70 pour cent V/V R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : plaque au *gel de silice G pour CCM R*.

*Phase mobile* : la phase supérieure d'un mélange de 10 volumes d'*acide acétique glacial R*, de 40 volumes d'*eau R* et de 50 volumes de *butanol R*.

*Dépôt* : 10 µL de solution à examiner, 10 µL et 40 µL de solution témoin, en bandes de 20 mm sur 3 mm.

*Développement* : sur un parcours de 12 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection A* : pulvérisez environ 10 mL de *solution d'aldéhyde anisique R* pour une plaque de 200 mm de côté et chauffez de nouveau à 100-105 °C jusqu'à apparition de bandes rouges dues aux saponosides dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

*Résultats A* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente dans ses parties inférieure et médiane 3-5 bandes rouges semblables quant à leur position aux bandes violet-gris dues à l'aescine dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin.

*Détection B* : pulvérisez environ 10 mL d'une solution d'*acide phosphomolybdique R* à 200 g/L dans de l'*éthanol anhydre R*. Chauffez à 100-105 °C jusqu'à ce que la coloration des bandes dues aux saponosides vire au bleu.

*Résultats B* : l'intensité et la dimension des bandes du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont comprises entre celles des 2 bandes dues à l'aescine dans les chromatogrammes obtenus avec 10 µL et 40 µL de solution témoin.

ESSAI

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 6,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 3,0 pour cent.

CONSERVATION

A l'abri de l'humidité.

**01/2008:1825**
**corrigé 6.0**

# PRÊLE (TIGE DE)

## Equiseti herba

DÉFINITION

Parties aériennes stériles séchées, entières ou coupées, de *Equisetum arvense* L.

*Teneur* : au minimum 0,3 pour cent de flavonoïdes totaux exprimés en isoquercitroside ($C_{21}H_{20}O_{12}$ ; $M_r$ 464,4 ) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La tige de prêle est constituée par des fragments de tiges cannelées et de feuilles linéaires, vert clair à gris-vert. Ils sont rudes au toucher, cassants et crissent quand ils sont écrasés entre les doigts. Les tiges principales ont un diamètre d'environ 0,8 mm à 4,5 mm, elles sont creuses, articulées aux noeuds, à intervalles d'environ 1,5 cm à 4,5 cm. Des cannelures verticales distinctes, regroupées en nombre de 4 à 14 ou plus, sont présentes sur les entre-noeuds. Des verticilles de rameaux largement espacés et dressés, généralement simples, chacun d'environ 1 mm d'épaisseur, avec 2 à 4 cannelures longitudinales, se rejoignent au niveau des noeuds. Les feuilles sont petites, linéaires, disposées en verticille à chaque noeud ; concrescentes à la base, elles forment une gaine dentée embrassant la tige et comportant un nombre de dents égal au nombre de cannelures de la tige. Chaque dent, souvent de couleur brune, est triangulaire-lancéolée. L'entre-noeud inférieur de chaque branche est plus long que la gaine de la tige à laquelle il appartient.

B. Réduisez les tiges de prêle en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est gris-vert. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments d'épiderme vus de face, composés de cellules rectangulaires à parois ondulées et de

Drogues végétales

stomates paracytiques (*2.8.3*) dont les 2 cellules annexes couvrent les cellules de garde et présentent des stries radiales ; vu en section transversale, l'épiderme est crénelé, avec des protubérances formées par les parois contiguës de 2 cellules adjacentes, en forme de U ; des fragments de parenchyme à grandes cellules et des groupes de longues fibres non lignifiées à lumen étroit ; des petits vaisseaux lignifiés à épaississements en spirales ou en anneaux sont dispersés.

C. Examinez les chromatogrammes obtenu dans l'essai des autres espèces de prêle et hybrides.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | 2 bandes de fluorescence rouge |
| Acide caféique : une bande de fluorescence bleu-vert | |
| | 2 bandes de fluorescence bleu-vert |
| ——— | ——— |
| | Une bande de fluorescence orange |
| Hypéroside : une bande de fluorescence orange | |
| | 2 bandes de fluorescence bleu-vert |
| ——— | ——— |
| Rutine : une bande de fluorescence orange | |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent de tiges d'autres espèces de prêle et hybrides et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Autres espèces de prêle et hybrides**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 1,0 g de tige de prêle pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Chauffez dans un bain-marie à 60 °C pendant 10 min en agitant de temps en temps. Laissez refroidir. Filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 1,0 mg d'*acide caféique R*, 2,5 mg d'*hypéroside R* et 2,5 mg de *rutine R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, acide acétique glacial R, eau R, acétate d'éthyle R* (7,5:7,5:18:67 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez sur la plaque encore chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R*, puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R*. Laissez sécher la plaque à l'air pendant 30 min. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande de fluorescence jaune ou jaune-vert juste au-dessus de la ligne de base.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de tige de prêle pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au minimum 3,0 pour cent et au maximum 15,0 pour cent.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au minimum 12,0 pour cent et au maximum 27,0 pour cent.

DOSAGE

*Solution mère.* Dans un ballon à fond rond de 100 mL, introduisez 0,800 g de tige de prêle pulvérisée (355) (*2.9.12*), puis ajoutez 1 mL d'une solution d'*hexaméthylènetétramine R* à 5 g/L, 20 mL d'*acétone R* et 2 mL d'*acide chlorhydrique R1*. Chauffez à reflux pendant 30 min. Filtrez le liquide à travers un tampon de coton hydrophile en recueillant le filtrat dans une fiole. Ajoutez le coton hydrophile au résidu contenu dans le ballon à fond rond et extrayez avec 2 fois 20 mL d'*acétone R*, en chauffant chaque fois à reflux pendant 10 min. Laissez refroidir, puis filtrez à travers un tampon de coton hydrophile en recueillant le filtrat dans la fiole. Après refroidissement, filtrez les extraits à l'acétone réunis à travers un filtre en papier dans une fiole jaugée, puis complétez à 100,0 mL avec de l'*acétone R* en rinçant la fiole et le filtre en papier. Placez 20,0 mL de cette solution dans une ampoule à décantation, ajoutez 20 mL d'*eau R* et agitez le mélange avec 1 fois 15 mL, puis 3 fois 10 mL d'*acétate d'éthyle R*. Réunissez les extraits à l'acétate d'éthyle dans une ampoule à décantation, lavez avec 2 fois 50 mL d'*eau R*, puis filtrez les extraits sur 10 g de *sulfate de sodium anhydre R* en recueillant le filtrat dans une fiole jaugée. Complétez à 50,0 mL avec de l'*acétate d'éthyle R*.

*Solution à examiner.* A 10,0 mL de solution mère, ajoutez 1 mL de *réactif au chlorure d'aluminium R* et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide acétique glacial R* à 5 pour cent *V/V* dans du *méthanol R*.

*Solution de compensation.* Prélevez 10,0 mL de solution mère et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide acétique glacial R* à 5 pour cent *V/V* dans du *méthanol R*.

Après 30 min, mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner à 425 nm, par comparaison à la solution de compensation. Calculez la teneur pour cent en flavonoïdes, exprimés en isoquercitroside, à l'aide de l'expression :

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

en prenant 500 comme valeur de l'absorbance spécifique de l'isoquercitroside,

$A$ = absorbance à 425 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2008:1364**
**corrigé 6.0**

# PRIMEVÈRE (RACINE DE)

## Primulae radix

DÉFINITION

Racine et rhizome séchés, entiers ou fragmentés, de *Primula veris* L. ou de *Primula elatior* (L.) Hill.

CARACTÈRES

Saveur âcre.

IDENTIFICATION

A. Le rhizome, brun-gris et grossièrement noueux, est rectiligne ou légèrement arqué, d'une longueur d'environ 1-5 cm et d'une épaisseur d'environ 2-4 mm. Il porte souvent, au niveau de la souche, des restes de tiges et de feuilles. De nombreuses racines cassantes, d'une épaisseur d'environ 1 mm et d'une longueur de 6-8 cm en général sont attachées au rhizome. La racine de *P. elatior* est brun clair ou brun-rouge, celle de *P. veris* jaune clair ou blanc-jaune. La cassure est lisse.

B. Réduisez la racine de primevère en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-gris. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments du parenchyme cortical de la racine ainsi que du parenchyme médullaire et

du parenchyme cortical du rhizome, constitués de cellules arrondies à paroi épaissie et ponctuée ; des fragments brunâtres de tissus de revêtement portant des poils absorbants ; des vaisseaux réticulés. La présence de groupes de cellules scléreuses fortement ponctuées, vert-jaune, est caractéristique de *P. elatior*. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente des grains d'amidon isolés ou composés de forme et de dimension variées.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications de l'essai de la racine de *Vincetoxicum hirundinaria medicus* avec les modifications suivantes.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R*. Chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande principale violet-bleu (aescine), près de la limite des tiers inférieur et médian du chromatogramme. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente 1-2 bandes violet sombre intense situées un peu au-dessous de la bande due à l'aescine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. D'autres bandes violet pâle, jaunâtres ou vert-brun peuvent être visibles.

ESSAI

**Racine de *Vincetoxicum hirundinaria medicus*.** Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de racine de primevère pulvérisée (500) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R* et chauffez à reflux pendant 15 min. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg d'*aescine R* dans 1,0 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R*.

*Phase mobile* : la phase supérieure d'un mélange de 10 volumes d'*acide acétique glacial R*, de 40 volumes d'*eau R* et de 50 volumes de *butanol R*.

*Dépôt* : 20 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 12 cm.

*Séchage* : à l'étuve à 100-105 °C.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner présentent une bande d'atténuation de fluorescence (aescine) près de la limite des tiers inférieur et médian des chromatogrammes. Repérez cette bande.

*Détection B* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats B* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bandes de fluorescence bleu clair ou verdâtre au-dessous de la bande principale due à l'aescine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de racine de primevère pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 9,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 3,0 pour cent.

**01/2008:1886**
**corrigé 6.0**

# PRUNIER D'AFRIQUE (ÉCORCE DE)

## Pruni africanae cortex

DÉFINITION

Ecorce séchée, entière ou fragmentée, des tiges et des branches de *Prunus africana* (Hook f.) Kalkm. (syn. *Pygeum africanum* Hook f.).

IDENTIFICATION

A. L'écorce, de couleur brun foncé à brun-rouge, se présente en morceaux irréguliers, durs, courbés. La face externe présente un suber brun-rouge foncé ridé, auquel adhèrent des plages de lichen. La face interne, brun-rouge à brun foncé, présente des stries longitudinales. L'écorce peut également se présenter en fragments enroulés présentant une cassure fibreuse.

B. Réduisez l'écorce de prunier d'Afrique en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-rouge. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente : des sclérites à paroi épaisse, isolées ou groupées ; des macles d'oxalate de calcium de différentes tailles ; de nombreuses fibres lignifiées à paroi épaisse et lumen étroit, parfois isolées, mais le plus souvent en groupes à extrémités dentées ; des fragments de cellules polygonales pigmentées de couleur brun-rouge ; des fragments de suber. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente quelques grains d'amidon isolés de petite taille qui se colorent en noir-bleu en présence de *solution d'iode R1*.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Procédez à une extraction de 15,0 g de drogue pulvérisée (250) (*2.9.12*) par le *chlorure de méthylène R* pendant 30 min dans un appareil à extraction continue, type Soxhlet. Filtrez. Evaporez le solvant à siccité sous pression réduite. Reprenez le résidu dans 1 mL de *chlorure de méthylène R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 20 mg de *β-sitostérol R* et 20 mg d'*acide ursolique R* dans 10 mL d'un mélange à volumes égaux de *méthanol R* et de *chlorure de méthylène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *méthanol R, chlorure de méthylène R* (10:90 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes de 1 cm.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez le *réactif à la vanilline R*. Chauffez la plaque à 100-105 °C pendant 10 min, puis laissez refroidir ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande violette<br>Plusieurs faibles bandes grises, bleues ou violettes |
| _______ | _______ |
| β-Sitostérol : une bande violette | Une bande violette (β-sitostérol) |
| Acide ursolique : une bande bleue | Une bande bleue (acide ursolique)<br>Plusieurs faibles bandes grises, bleues ou violettes |
| _______ | _______ |
| | Une bande violette (glucoside de β-sitostérol) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3,0 pour cent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

Drogues végétales

**Matières extractibles** : au minimum 0,5 pour cent.

Sur 20,0 g de drogue pulvérisée (250) (*2.9.12*), procédez à une extraction par le *chlorure de méthylène R* pendant 4 h dans un appareil à extraction continue, type Soxhlet. Evaporez à siccité au bain-marie sous vide, puis desséchez le résidu à 80 °C pendant 2 h. La masse du résidu est au minimum de 0,10 g.

**01/2008:0858**
**corrigé 6.0**

# PSYLLIUM (GRAINE DE)

## Psyllii semen

DÉFINITION

Graines mûres, entières et sèches de *Plantago afra* L. (*Plantago psyllium* L.) ou de *Plantago indica* L. (*Plantago arenaria* Waldstein et Kitaibel).

CARACTÈRES

Saveur douceâtre.

IDENTIFICATION

Les graines de *P. afra,* dont la couleur va du brun clair au brun-noir sans être jamais franchement noire, sont lisses, luisantes, de forme elliptique oblongue. Elles ont une longueur de 2-3 mm et une largeur de 0,8-1,0 mm et sont élargies à une extrémité. Vers le milieu de la face dorsale, elles présentent un léger renflement longitudinal plus clair. Sur la face ventrale, elles sont creusées d'un sillon linéaire présentant en son milieu une tache plus claire correspondant au hile, et limitées par des bords relevés en forme de bourrelet.

Les graines de *P. indica* sont sensiblement identiques à celles de *P. afra,* un peu moins luisantes ; elles ont une longueur de 2-3 mm et un diamètre d'au maximum 1,5 mm.

ESSAI

**Indice de gonflement** (*2.8.4*) : au minimum 10.

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 1,0 pour cent, déterminé sur 10,0 g de graines de psyllium, y compris les graines non mûres, verdâtres. La graine de psyllium ne contient pas de graines présentant une tache centrale sombre sur le sillon (*Plantago lanceolata* L. et *P. major* L.) ni de graines présentant extérieurement des surfaces gris-brun ou rosâtres (*P. ovata* Forssk. et *P. sempervirens* Crantz).

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 14,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de graines de psyllium.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 4,0 pour cent.

CONSERVATION

A l'abri de l'humidité.

**01/2011:0174**

# QUINQUINA

## Cinchonae cortex

DÉFINITION

Ecorce séchée, entière ou fragmentée, de *Cinchona pubescens* Vahl (*Cinchona succirubra* Pav.), de *Cinchona calisaya* Wedd. ou de *Cinchona ledgeriana* Moens ex Trimen ou de leurs variétés ou de leurs hybrides.

*Teneur* : au minimum 6,5 pour cent d'alcaloïdes totaux dont 30 pour cent à 60 pour cent sont constitués par des alcaloïdes du type de la quinine (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Saveur extrêmement amère et quelque peu astringente.

IDENTIFICATION

A. L'écorce de tige et des branches se présente en fragments tuyautés ou courbés d'une épaisseur de 2-6 mm ; la surface externe est terne, gris-brun ou grise et fréquemment garnie de lichens ; elle est habituellement rugueuse et fissurée transversalement, sillonnée ou ridée longitudinalement ; certaines variétés présentent une exfoliation de l'écorce externe ; la surface interne qui est striée, est brun-rouge foncé ; la cassure est courte dans les couches extérieures et fibreuse dans les couches intérieures.

B. Réduisez le quinquina en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-rouge. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants (figure 0174.-1) : des cellules de suber à parois minces, remplies de masses brun-rouge, vues de face [K] ou en section transversale [H] ; des fibres libériennes striées, jaunes, fusiformes, à parois très épaisses, à lumen irrégulier, pouvant atteindre un diamètre de 90 µm et une longueur de 1300 µm, avec des canalicules très visibles et infundibuliformes, entières [A] ou sectionnées [F, J] ; des idioblastes parenchymateux, remplis de microprismes d'oxalate de calcium [E, G] ; des amas de parenchyme libérien à cellules à parois fines [L], accompagnées de rayons médullaires, vus en section tangentielle [D]. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente un petit nombre de grains d'amidon d'un diamètre de 6-10 µm, le plus souvent simples mais occasionnellement à 2 ou 3 éléments, libres [B] ou contenus dans des cellules parenchymateuses [C].

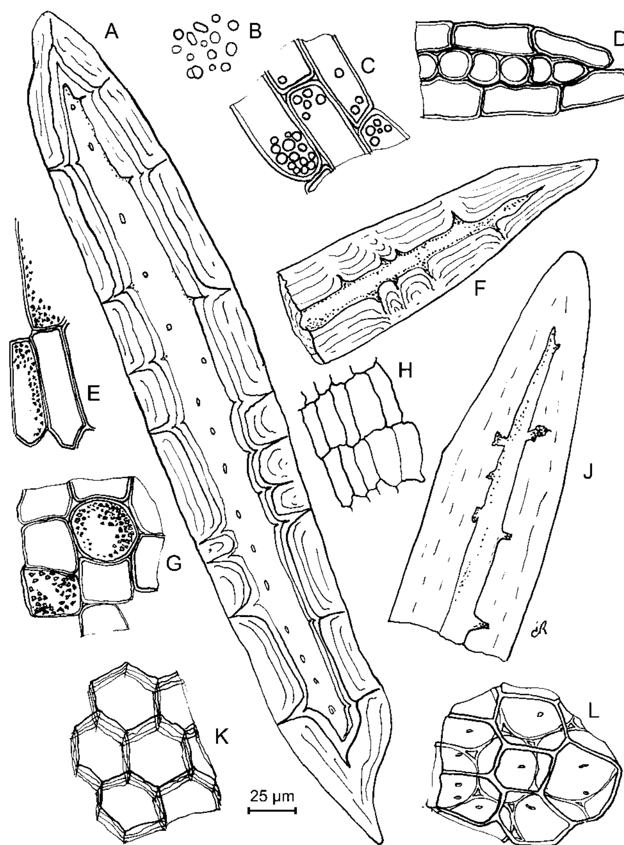



Figure 0174.-1.– *Dessin pour l'identification B du quinquina pulvérisé*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dans un tube à essai contenant 0,10 g de quinquina pulvérisé (180) (*2.9.12*), ajoutez 0,1 mL d'*ammoniaque concentrée R* et 5 mL de *chlorure de méhylène R*. Agitez énergiquement à plusieurs reprises pendant 30 min et filtrez. Evaporez le filtrat au bain-marie à siccité et dissolvez le résidu dans 1 mL d'*éthanol anhydre R*.

Drogues végétales

*Solution témoin.* Dissolvez 17,5 mg de *quinine R,* 2,5 mg de *quinidine R,* 10 mg de *cinchonine R* et 10 mg de *cinchonidine R* dans 5 mL d'*éthanol anhydre R.*

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *diéthylamine R, acétate d'éthyle R, toluène R* (10:20:70 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : 2 fois sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C puis laissez refroidir.

*Détection A* : pulvérisez de l'*acide formique anhydre R* et laissez sécher à l'air. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| Quinidine : une bande de nette fluorescence bleue | Une bande de nette fluorescence bleue (quinidine) |
| ——— | ——— |
| Quinine : une bande de nette fluorescence bleue | Une bande de nette fluorescence bleue (quinine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez du *réactif à l'iodoplatinate R.*

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| Cinchonine : une bande violette virant au gris-violet | Une bande violette virant au gris-violet (cinchonine) |
| Quinidine : une bande violette virant au gris-violet | Une bande violette virant au gris-violet (quinidine) |
| Cinchonidine : une bande bleu foncé intense | Une bande bleu foncé intense (cinchonidine) |
| ——— | ——— |
| Quinine : une bande violette virant au gris-violet | Une bande violette virant au gris-violet (quinine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 6,0 pour cent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

DOSAGE

*Solution à examiner.* Dans une fiole conique de 250 mL, ajoutez à 1,000 g de quinquina pulvérisé (180) (*2.9.12*), 10 mL d'*eau R* et 7 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et mélangez. Chauffez dans un bain-marie pendant 30 min, laissez refroidir et ajoutez 25 mL de *chlorure de méthylène R,* 50 mL d'*éther R* et 5 mL d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 200 g/L. Agitez le mélange fréquemment pendant 30 min, ajoutez 3 g de *gomme adragante R* pulvérisée et agitez jusqu'à ce que le mélange soit limpide. Filtrez sur un tampon de coton absorbant, puis rincez la fiole et le coton avec 5 fois 20 mL d'un mélange de 1 volume de *chlorure de méthylène R* et de 2 volumes d'*éther R.* Réunissez le filtrat et les liquides de rinçage, évaporez à siccité et dissolvez le résidu dans 10,0 mL d'*éthanol anhydre R.* Prélevez 5,0 mL de solution, évaporez à siccité et reprenez le résidu par l'*acide chlorhydrique 0,1 M.* Complétez à 1000,0 mL avec de l'*acide chlorhydrique 0,1 M.*

*Solutions témoins.* Dissolvez séparément 30,0 mg de *quinine R* et 30,0 mg de *cinchonine R* dans de l'*acide chlorhydrique 0,1 M* et complétez à 1000,0 mL avec le même acide.

Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) des 3 solutions à 316 nm et à 348 nm en utilisant l'*acide chlorhydrique 0,1 M* comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en alcaloïdes à l'aide des équations suivantes :

$$x = \frac{[A_{316} \times A_{348c}] - [A_{316c} \times A_{348}]}{[A_{316q} \times A_{348c}] - [A_{316c} \times A_{348q}]} \times \frac{100}{m} \times \frac{2}{1000}$$

$$y = \frac{[A_{316} \times A_{348q}] - [A_{316q} \times A_{348}]}{[A_{316c} \times A_{348q}] - [A_{316q} \times A_{348c}]} \times \frac{100}{m} \times \frac{2}{1000}$$

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes,

$x$ = teneur pour cent en alcaloïdes du type quinine,

$y$ = teneur pour cent en alcaloïdes du type cinchonine,

$A_{316}$ = absorbance mesurée à 316 nm de la solution à examiner,

$A_{348}$ = absorbance mesurée à 348 nm de la solution à examiner,

$A_{316c}$ = absorbance mesurée à 316 nm de la solution témoin renfermant la cinchonine, rapportée à la concentration de 1 mg/1000 mL,

$A_{316q}$ = absorbance mesurée à 316 nm de la solution témoin renfermant la quinine, rapportée à la concentration de 1 mg/1000 mL,

$A_{348c}$ = absorbance mesurée à 348 nm de la solution témoin renfermant la cinchonine, rapportée à la concentration de 1 mg/1000 mL,

$A_{348q}$ = absorbance mesurée à 348 nm de la solution témoin renfermant la quinine, rapportée à la concentration de 1 mg/1000 mL.

Calculez la teneur en alcaloïdes totaux ($x + y$) et la teneur relative en alcaloïdes du type quinine à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{100x}{x + y}$$

**01/2008:1818**

# QUINQUINA (EXTRAIT FLUIDE TITRÉ DE)

## Cinchonae extractum fluidum normatum

DÉFINITION

Extrait fluide produit à partir de *Quinquina (0174).*

*Teneur* : au minimum 4,0 pour cent et au maximum 5,0 pour cent d'alcaloïdes totaux dont 30 pour cent à 60 pour cent d'alcaloïdes du type de la quinine ($C_{20}H_{24}N_2O_2$ ; $M_r$ 324,4).

PRODUCTION

L'extrait fluide titré de quinquina est produit à partir de la drogue végétale par une méthode appropriée en utilisant :

– l'éthanol de 30 pour cent *V/V* à 90 pour cent *V/V* ou,
– le mélange acide chlorhydrique dilué, éthanol à 96 pour cent *V/V*, glycérol, eau (1:2:5:20 *V/V*).

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide rouge-brun.

L'extrait à examiner présente une saveur amère et astringente.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Diluez 1 mL d'extrait à examiner dans 1 mL d'*éthanol anhydre R.*

*Solution témoin.* Dissolvez 2,5 mg de *quinidine R,* 10 mg de *cinchonidine R,* 10 mg de *cinchonine R* et 17,5 mg de *quinine R* dans 5 mL d'*éthanol anhydre R.*

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *diéthylamine, acétate d'éthyle R, toluène R* (10:20:70 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 2 µL] en bandes.

*Développement* : 2 fois, sur un parcours de 15 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à 100-105 °C, puis laissez refroidir.

*Détection A* : pulvérisez avec une solution d'*acide formique anhydre R* à 50 g/L et laissez sécher à l'air ; examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| Quinidine : une bande de nette fluorescence bleue | Une bande de nette fluorescence bleue (quinidine) |
| ——— | ——— |
| Quinine : une bande de nette fluorescence bleue | Une bande de nette fluorescence bleue (quinine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez du *réactif à l'iodoplatinate R.*

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| Cinchonine : une bande grise-violette | Une bande grise-violette (cinchonine) |
| Quinidine : une bande grise-violette | Une bande grise-violette (quinidine) |
| Cinchonidine : une bande bleu foncé intense | Une bande bleu foncé intense (cinchonidine) |
| ——— | ——— |
| Quinine : une bande grise-violette | Une bande grise-violette (quinine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Ethanol** (*2.9.10*) : 95 pour cent à 105 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

**Méthanol et 2-propanol** (*2.9.11*) : au maximum 0,05 pour cent *V/V* de méthanol et au maximum 0,05 pour cent *V/V* de 2-propanol.

**Résidu sec** (*2.8.16*) : au minimum 12,0 pour cent pour l'extrait fluide titré de quinquina exempte de glycérol et au minimum 30,0 pour cent pour l'extrait fluide titré de quinquina contenant du glycérol, déterminé sur 2,0 g d'extrait à examiner.

DOSAGE

*Solution à examiner.* Dans une fiole conique de 250 mL, ajoutez à 1,000 g d'extrait à examiner 10 mL d'*eau R* et 7 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* puis mélangez. Chauffez dans un bain-marie pendant 30 min, laissez refroidir et ajoutez 25 mL de *chlorure de méthylène R,* 50 mL d'*éther R* et 5 mL d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 200 g/L. Agitez le mélange fréquemment pendant 30 min. Ajoutez 3 g de *gomme adragante R* pulvérisée et agitez jusqu'à ce que le mélange soit limpide. Filtrez sur un tampon de coton absorbant, puis rincez la fiole et le coton avec 5 fois 20 mL d'un mélange de 1 volume de *chlorure de méthylène R* et 2 volumes d'*éther R.* Réunissez le filtrat et les liquides de rinçage, évaporez à siccité et dissolvez le résidu dans 10,0 mL d'*éthanol à 96 pour cent R.* Prélevez 5,0 mL de cette solution, évaporez à siccité et reprenez le résidu par l'*acide chlorhydrique 0,1 M.* Complétez à 1000,0 mL avec le même acide.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 30,0 mg de *cinchonine R* dans de l'*acide chlorhydrique 0,1 M* et complétez à 1000,0 mL avec le même acide.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 30,0 mg de *quinine R* dans de l'*acide chlorhydrique 0,1 M* et complétez à 1000,0 mL avec le même acide.

Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) des 3 solutions à 316 nm et à 348 nm, en utilisant l'*acide chlorhydrique 0.1 M* comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en alcaloïdes à l'aide des équations suivantes :

$$n_1 = \frac{[A_1 \times A_{2a}] - [A_{1a} \times A_2]}{[A_{1b} \times A_{2a}] - [A_{1a} \times A_{2b}]} \times \frac{100}{m} \times \frac{2}{1000}$$

$$n_2 = \frac{[A_1 \times A_{2b}] - [A_{1b} \times A_2]}{[A_{1a} \times A_{2b}] - [A_{1b} \times A_{2a}]} \times \frac{100}{m} \times \frac{2}{1000}$$

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes,

$n_1$ = teneur pour cent en alcaloïdes du type quinine,

$n_2$ = teneur pour cent en alcaloïdes du type cinchonine,

$A_1$ = absorbance mesurée à 316 nm de la solution à examiner,

$A_2$ = absorbance mesurée à 348 nm de la solution à examiner,

$A_{1a}$ = absorbance mesurée à 316 nm de la solution témoin (a), rapportée à la concentration de 1 mg/1000 mL,

$A_{1b}$ = absorbance mesurée à 316 nm de la solution témoin (b), rapportée à la concentration de 1 mg/1000 mL,

$A_{2a}$ = absorbance mesurée à 348 nm de la solution témoin (a), rapportée à la concentration de 1 mg/1000 mL,

$A_{2b}$ = absorbance mesurée à 348 nm de la solution témoin (b), rapportée à la concentration de 1 mg/1000 mL.

Calculez la teneur en alcaloïdes totaux ($n_1 + n_2$) et la teneur relative en alcaloïdes du type quinine à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{n_1 \times 100}{n_1 + n_2}$$

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique la composition en solvants utilisés pour la production.

Drogues végétales

**01/2008:0289**
**corrigé 6.0**

# RATANHIA (RACINE DE)

## Ratanhiae radix

DÉFINITION

Organes souterrains séchés, généralement fragmentés, de *Krameria triandra* Ruiz et Pavon, connue sous le nom de Ratanhia du Pérou.

*Teneur* : au minimum 5,0 pour cent de tanins exprimés en pyrogallol ($C_6H_6O_3$ ; $M_r$ 126,1) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La racine principale, brun-rouge foncé, est épaisse et noueuse à son extrémité supérieure (collet). Les racines secondaires, de la même couleur, sont presque droites ou un peu sinueuses. L'écorce est rugueuse ou écailleuse sur les parties âgées, lisse avec de nettes fissures transversales sur les parties jeunes ; elle se sépare facilement du bois. La cassure de l'écorce est fibreuse et celle du bois esquilleuse. La surface lisse d'une coupe transversale présente une écorce rouge-brun foncé dont l'épaisseur atteint environ le tiers du rayon. Le bois est dense, d'un brun-rouge pâle, finement poreux, avec de nombreux rayons médullaires fins. Au centre, le coeur du bois est souvent plus foncé.

B. Réduisez la racine de ratanhia en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est rouge-brun. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des cellules du suber contenant des phlobaphènes brun foncé ; des fragments de fibres libériennes, non lignifiées, généralement d'un diamètre de 12-30 µm, avec des parois modérément épaissies ; des cellules de parenchyme libérien en files, contenant des prismes ou des microcristaux d'oxalate de calcium ; des fragments de vaisseaux généralement d'un diamètre de 20-60 µm à ponctuations aréolées ; des fragments de trachéides atteignant une largeur de 20 µm avec des ponctuations en fente. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente des grains d'amidon arrondis, simples ou composés de 2-4 éléments, le diamètre d'un grain élémentaire pouvant atteindre jusqu'à 30 µm. Quelques-uns de ces grains se trouvent dans les cellules des rayons médullaires et dans les cellules du parenchyme.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de racine de ratanhia pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL d'un mélange de 3 volumes d'*eau R* et de 7 volumes d'*éthanol à 96 pour cent R* (*2.9.12*), puis agitez pendant 10 min et filtrez. Ajoutez au filtrat 10 mL d'*éther de pétrole R* et agitez. Séparez la phase éthérée, ajoutez 2 g de *sulfate de sodium anhydre R*, agitez et filtrez. Evaporez le filtrat à siccité. Reprenez le résidu avec 0,5 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 5,0 mg de *rouge Soudan G R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (2:98 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution de *sel de bleu solide B R* à 5 g/L. Laissez sécher à l'air. Pulvérisez de la *solution éthanolique d'hydroxyde de sodium 0,1 M*. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente une bande rouge dans son tiers inférieur due au rouge Soudan G. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande violette due au phénol I du ratanhia semblable quant à sa position à la bande due au rouge Soudan G dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin et au-dessous, successivement, une bande brunâtre due au phénol II du ratanhia, puis une bande gris-bleu due au phénol III du ratanhia. D'autres bandes peuvent également être présentes.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 2 pour cent d'éléments étrangers et au maximum 5 pour cent de fragments du collet et de racines d'un diamètre supérieur à 25 mm. Les racines privées d'écorce peuvent être présentes en très faible quantité.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de racine de ratanhia pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 5,5 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des tanins dans les drogues végétales (*2.8.14*). Utilisez 0,750 g de racine de ratanhia pulvérisée (180) (*2.9.12*).

**01/2008:1888**

# RATANHIA (TEINTURE DE)

## Ratanhiae tinctura

DÉFINITION

Teinture produite à partir de *Racine de ratanhia (0289)*.

*Teneur* : au minimum 1,0 pour cent *m/m* de tanins, exprimés en pyrogallol ($C_6H_6O_3$ ; $M_r$ 126,1).

PRODUCTION

La teinture de ratanhia est produite à partir de 1 partie de drogue et de 5 parties d'éthanol à 70 pour cent *V/V* par une méthode appropriée.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide brun-rouge.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 5 mL de teinture de ratanhia, ajoutez 10 mL d'*éther de pétrole R* et mélangez. Séparez la phase éthérée, ajoutez 2 g de *sulfate de sodium anhydre R*, agitez et filtrez. Evaporez le filtrat à siccité et reprenez le résidu par 0,5 mL de *chlorure de méthylène R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *thymol R* et 10 mg de *sel sodique de dichlorophénolindophénol R* dans 10 mL d'*alcool à 60 pour cent V/V R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *chlorure de méthylène R*.

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution de *sel de bleu solide B R* à 5 g/L et laissez sécher la plaque à l'air ; pulvérisez de la *solution éthanolique d'hydroxyde de sodium 0,1 M* ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| Thymol : une bande jaune-brun orangé | Une bande violette |
| ——— | ——— |
| | Une bande gris-vert |
| | Une bande gris-bleu |
| | Une bande brun-jaune |
| Dichlorophénolindophénol : une bande bleu-gris | Une bande violette |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Ethanol** (*2.9.10*) : 63 pour cent *V/V* à 67 pour cent *V/V*.

**Méthanol et 2-propanol** (*2.9.11*) : au maximum 0,05 pour cent *V/V* de méthanol et au maximum 0,05 pour cent *V/V* de 2-propanol.

DOSAGE

Effectuez la détermination des tanins dans les drogues végétales (*2.8.14*). Utilisez 2,500 g de teinture de ratanhia.

**01/2011:1536**

# RÉGLISSE (EXTRAIT FLUIDE ÉTHANOLIQUE TITRÉ DE)

## Liquiritiae extractum fluidum ethanolicum normatum

DÉFINITION

Extrait fluide éthanolique titré produit à partir de *Racine de réglisse (0277)*.

*Teneur* : 3,0 pour cent à 5,0 pour cent d'acide glycyrrhizique ($C_{42}H_{62}O_{16}$ ; $M_r$ 823).

PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée à la préparation des extraits fluides, avec de l'éthanol à 70 pour cent *V/V*.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, brun foncé.

Faible odeur caractéristique et saveur sucrée.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dans un ballon à fond rond de 50 mL, introduisez 1,0 g d'extrait à examiner, ajoutez 16,0 mL d'*eau R* et 4,0 mL d'*acide chlorhydrique R1*, puis chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Laissez refroidir et filtrez. Faites sécher le filtre et le ballon à 105 °C pendant 60 min. Placez le filtre dans le ballon, ajoutez 20 mL d'*éther R* et chauffez à reflux au bain-marie à 40 °C pendant 5 min. Laissez refroidir, puis filtrez et évaporez le filtrat à siccité. Dissolvez le résidu dans 5,0 mL d'*éther R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 5,0 mg d'*acide glycyrrhétique R* et 5,0 mg de *thymol R* dans 5 mL d'*éther R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R*.

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, eau R, éthanol à 96 pour cent R, acétate d'éthyle R* (1:9:25:65 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air pendant 5 min.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et la solution témoin présentent, dans leur moitié inférieure, une bande d'atténuation de fluorescence due à l'acide glycyrrhétique.

*Détection B* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* ; chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min et examinez à la lumière du jour.

*Résultats B* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente, dans sa moitié inférieure, une bande violette due à l'acide glycyrrhétique et, dans son tiers supérieur, une bande rouge due au thymol. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente, dans sa moitié inférieure, une bande violette correspondant à l'acide glycyrrhétique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin et, dans son tiers supérieur, sous la bande du thymol dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, une bande jaune due à l'isoliquiritigénine. D'autres bandes sont également présentes.

ESSAI

**Ethanol** (*2.9.10*) : 52 pour cent *V/V* à 65 pour cent *V/V*.

**Méthanol et 2-propanol** (*2.9.11*) : au maximum 0,05 pour cent *V/V* de méthanol et au maximum 0,05 pour cent *V/V* de 2-propanol.

**Ochratoxine A** (*2.8.22*) : au maximum 80 µg par kilogramme d'extrait.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Mélange de solvants* : *ammoniaque diluée R1, eau R* (8:92 *V/V*).

*Solution à examiner*. Prélevez 1,000 g d'extrait à examiner et complétez à 100 mL avec le mélange de solvants. Centrifugez, puis prélevez 2,0 mL du surnageant et complétez à 10,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution mère*. Dissolvez 0,130 g de *glycyrrhizate de monoammonium SCR* dans le mélange de solvants et complétez à 100,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (a)*. Prélevez 5,0 mL de solution mère et complétez à 100,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (b)*. Prélevez 10,0 mL de solution mère et complétez à 100,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (c)*. Prélevez 15,0 mL de solution mère et complétez à 100,0 mL avec le mélange de solvants.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,10 m, Ø = 4 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, acétonitrile R, eau R* (6:30:64 *V/V/V*).

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 254 nm.

*Injection* : 10 µL.

Tracez une courbe d'étalonnage en portant en abscisse la concentration des solutions témoins (en g/100 mL) et en ordonnée la surface des pics correspondants.

A l'aide des temps de rétention et de la surface des pics déterminés à partir des chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins, localisez et intégrez le pic dû à l'acide glycyrrhizique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Calculez la teneur pour cent en acide glycyrrhizique à l'aide de l'expression suivante :

$$A \times \frac{5}{m} \times B \times \frac{823}{840}$$

*A* = teneur en glycyrrhizate de monoammonium dans la solution à examiner, déterminée à partir de la courbe d'étalonnage, en g/100 mL,

*B* = teneur pour cent déclarée du *glycyrrhizate de monoammonium SCR,*

*m* = masse d'extrait à examiner, en grammes,

823 = masse moléculaire de l'acide glycyrrhizique,

840 = masse moléculaire du glycyrrhizate de monoammonium (sans eau de cristallisation).

**04/2008:2378**

# RÉGLISSE (EXTRAIT SEC DE) POUR AROMATISATION

## Liquiritiae extractum siccum ad saporandum

DÉFINITION

Extrait sec produit à partir de *Racine de réglisse (0277).*

*Teneur* : 5,0 pour cent à 7,0 pour cent d'acide 18β-glycyrrhizique ($C_{42}H_{62}O_{16}$ ; $M_r$ 823) (extrait desséché).

PRODUCTION

L'extrait est préparé à partir de la drogue végétale coupée par une méthode appropriée, avec de l'eau.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre brun-jaune ou brune.

Saveur très sucrée.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Mélange de solvants* : *acétate d'éthyle R, méthanol R* (50:50 *V/V*).

*Solution à examiner.* A 0,30 g d'extrait à examiner ajoutez 30 mL d'*acide chlorhydrique R1* et chauffez à reflux au bain-marie pendant 60 min. Après refroidissement, extrayez avec 2 fois 20 mL d'*acétate d'éthyle R*. Réunissez les phases organiques et filtrez à travers un filtre recouvert de *sulfate de sodium anhydre R*. Evaporez le filtrat à siccité sous vide et dissolvez le résidu dans 2,0 mL de mélange de solvants.

*Solution témoin.* Dissolvez 5,0 mg d'*acide glycyrrhétique R* et 5,0 mg de *thymol R* dans 5,0 mL de mélange de solvants.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, eau R, éthanol à 96 pour cent R, acétate d'éthyle R* (1:9:25:65 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL [ou 10 µL], en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 7 cm].

*Séchage* : à l'air pendant 5 min.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Thymol : une bande rouge | |
| | Une bande jaune |
| _______ | _______ |
| _______ | _______ |
| Acide glycyrrhétique : une bande violette | Une bande violette (acide glycyrrhétique) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.8.17*) : au maximum 7,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Mélange de solvants* : *eau R, méthanol R* (20:80 *V/V*).

*Solution à examiner.* Dans une fiole conique à col rodé de 150 mL, introduisez 0,200 g d'extrait à examiner. Ajoutez 100,0 mL de mélange de solvants, puis traitez aux ultrasons pendant 2 min. Filtrez sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm).

*Solution témoin.* Dissolvez 50,0 mg de *glycyrrhizate de monoammonium SCR* dans le mélange de solvants et complétez à 50,0 mL avec le mélange de solvants. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec le mélange de solvants.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,10 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, acétonitrile R, eau R* (6:30:64 *V/V/V*).

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 254 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Enregistrement* : 3 fois le temps de rétention de l'acide 18β-glycyrrhizique.

*Temps de rétention* : acide 18β-glycyrrhizique = environ 9 min.

*Identification des pics* : utilisez le chromatogramme fourni avec le *glycyrrhizate de monoammonium SCR* et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin pour identifier les pics dus aux acides 18β- et 18α-glycyrrhizique.

*Conformité du système* : solution témoin :

– le chromatogramme obtenu avec la solution témoin est semblable au chromatogramme fourni avec le *glycyrrhizate de monoammonium SCR,*
– *résolution* : au minimum 2,0 entre les pics dus aux acides 18β- et 18α-glycyrrhizique.

Drogues végétales

Calculez la teneur pour cent en acide 18β-glycyrrhizique, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 0,979}{A_2 \times m_1 \times 5}$$

| | | |
|---|---|---|
| $A_1$ | = | surface du pic dû à l'acide 18β-glycyrrhizique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, |
| $A_2$ | = | surface du pic dû à l'acide 18β-glycyrrhizique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, |
| $m_1$ | = | masse d'extrait à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes, |
| $m_2$ | = | masse de *glycyrrhizate de monoammonium SCR* utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes, |
| $p$ | = | teneur pour cent en acide 18β-glycyrrhizique du *glycyrrhizate de monoammonium SCR*, |
| 0,979 | = | facteur de corrélation entre l'acide glycyrrhizique et le glycyrrhizate de monoammonium. |

**01/2010:0277**
**corrigé 7.0**

# RÉGLISSE (RACINE DE)

## Liquiritiae radix

### DÉFINITION

Racine et stolons séchés, entiers ou coupés, mondés ou non, de *Glycyrrhiza glabra* L. et/ou de *Glycyrrhiza inflata* Bat. et/ou *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

*Teneur* : au minimum 4,0 pour cent d'acide glycyrrhizique ($C_{42}H_{62}O_{16}$ ; $M_r$ 823) (drogue desséchée).

### IDENTIFICATION

A. La racine est peu ramifiée. L'écorce, brune ou gris-brun, striée longitudinalement, porte des traces de racines latérales ; les stolons cylindriques ont un diamètre de 1-2 cm et présentent le même aspect extérieur que les racines, mais peuvent occasionnellement comporter des petits bourgeons. La cassure de la racine et des stolons est grenue et fibreuse. Le suber est mince, l'écorce interne est épaisse, jaune clair et striée radialement. Le cylindre ligneux jaune est compact, à structure rayonnée. La moelle centrale, présente dans le stolon, est absente dans la racine. La partie externe de l'écorce est absente de la racine mondée.

B. Réduisez la racine de réglisse en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune clair ou faiblement grisâtre. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de fibres, jaunes, aux parois épaisses, d'une longueur de 700-1200 µm et d'une largeur de 10-20 µm, à lumen punctiforme, souvent accompagnées de files de cellules cristallifères contenant des prismes d'oxalate de calcium, d'une longueur de 10-35 µm et d'une largeur de 2-5 µm ; les parois de vaisseaux sont jaunes, d'une épaisseur de 5-10 µm, lignifiées avec de nombreuses ponctuations aréolées avec fente ; des fragments de suber composé de cellules à parois minces et de prismes isolés d'oxalate de calcium ainsi que des fragments de parenchyme ; les fragments de suber sont absents de la racine mondée. Examinez au microscope en utilisant un mélange à volumes égaux de *glycérol R* et d'*eau R*. La poudre présente les éléments suivants : de nombreux grains d'amidon simples, arrondis ou ovales, d'un diamètre de 2-20 µm.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dans un ballon à fond rond de 50 mL, introduisez 0,50 g de racine de réglisse pulvérisée (180) (*2.9.12*), ajoutez 16,0 mL d'*eau R* et 4,0 mL d'*acide chlorhydrique R1*, puis chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Refroidissez et filtrez. Faites sécher le filtre et le ballon à 105 °C pendant 60 min. Placez le filtre dans le ballon, ajoutez 20,0 mL d'*éther R* et chauffez à reflux dans un bain-marie à 40 °C pendant 5 min. Refroidissez, puis filtrez et évaporez le filtrat à siccité. Dissolvez le résidu dans 5,0 mL d'*éther R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 5,0 mg d'*acide glycyrrhétique R* et 5,0 mg de *thymol R* dans 5,0 mL d'*éther R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R.*

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, eau R, éthanol à 96 pour cent R, acétate d'éthyle R* (1:9:25:65 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air pendant 5 min.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et la solution témoin présentent dans leur moitié inférieure une bande d'atténuation de fluorescence due à l'acide glycyrrhétique.

*Détection B* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R*, puis chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats B* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente, dans sa moitié inférieure, une bande violette due à l'acide glycyrrhétique et, dans son tiers supérieur, une bande rouge due au thymol. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente dans sa moitié inférieure une bande violette correspondant à la bande de l'acide glycyrrhétique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin et dans le tiers supérieur, sous la bande du thymol dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, une bande jaune due à l'isoliquiridigénine. D'autres bandes peuvent être présentes.

### ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de racine de réglisse pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent pour la drogue non mondée et au maximum 6,0 pour cent pour la drogue mondée.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 2,0 pour cent pour la drogue non mondée et au maximum 0,5 pour cent pour la drogue mondée.

**Ochratoxine A** (*2.8.22*) : au maximum 20 µg par kilogramme de racine de réglisse.

### DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Dans une fiole conique à col rodé de 150 mL, introduisez 1,000 g de racine de réglisse pulvérisée (180) (*2.9.12*), puis ajoutez 100,0 mL d'une solution d'*ammoniaque R* à 8 g/L et placez dans un bain à ultrasons pendant 30 min. Prélevez une partie de la solution, centrifugez, puis prélevez 1,0 mL du surnageant et complétez à 5,0 mL avec une solution d'*ammoniaque R* à 8 g/L. Filtrez à travers une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm) ; utilisez le filtrat comme solution à examiner.

*Solution A*. Dissolvez 0,130 g de *glycyrrhizate de monoammonium SCR* dans une solution d'*ammoniaque R* à 8 g/L et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (a)*. Prélevez 5,0 mL de solution A et complétez à 100,0 mL avec une solution d'*ammoniaque R* à 8 g/L.

*Solution témoin (b).* Prélevez 10,0 mL de solution A et complétez à 100,0 mL avec une solution d'*ammoniaque R* à 8 g/L.

*Solution témoin (c).* Prélevez 15,0 mL de solution A et complétez à 100,0 mL avec une solution d'*ammoniaque R* à 8 g/L.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,10 m, Ø = 4 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, acétonitrile R, eau R* (6:30:64 *V/V/V*).

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 254 nm.

*Injection* : 10 µL.

Tracez une courbe d'étalonnage en portant en abscisse la concentration des solutions témoins (en g/100 mL) et en ordonnée les surfaces de pics correspondantes.

A l'aide des temps de rétention et des surfaces des pics déterminés à partir des chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins, localisez et intégrez le pic dû à l'acide glycyrrhizique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Calculez la teneur pour cent en acide glycyrrhizique à l'aide de l'expression suivante :

$$A \times \frac{5}{m} \times B \times \frac{823}{840}$$

$A$ = teneur en glycyrrhizate de monoammonium de la solution à examiner, déterminée à partir de la courbe d'étalonnage, en g/100 mL,

$B$ = teneur pour cent déclarée du *glycyrrhizate de monoammonium SCR,*

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes,

823 = masse moléculaire de l'acide glycyrrhizique,

840 = masse moléculaire du glycyrrhizate de monoammonium (sans eau de cristallisation).

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique si la drogue est mondée ou non.

**01/2008:1868**
**corrigé 6.0**

# REINE DES PRÉS (SOMMITÉ FLEURIE DE)

## Filipendulae ulmariae herba

DÉFINITION

Sommité fleurie séchée, entière ou coupée, de *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. (= *Spiraea ulmaria* L.).

*Teneur* : au minimum 1 mL/kg de substances entraînables à la vapeur d'eau (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Odeur aromatique de salicylate de méthyle, après froissement.

IDENTIFICATION

A. La tige, atteignant jusqu'à 5 mm de diamètre, brun-vert, raide, anguleuse, creuse sauf vers le sommet, est striée de sillons longitudinaux, réguliers et rectilignes. La feuille pétiolée, composée imparipennée, possède 2 stipules angulaires, brun-rouge. Elle comprend 3 à 9 paires de folioles, inégalement dentées, dont certaines sont réduites à de petites lames étalées en éventail. Les folioles sont vert foncé et glabres à la face supérieure, tomenteuses et plus claires, quelquefois argentées à la face inférieure. La foliole terminale, la plus grande, est divisée en 3 segments. Les nervures sont saillantes et brunes à la face inférieure. L'inflorescence, complexe, est composée de très nombreuses fleurs disposées en panicules cymeuses irrégulières. Les fleurs, blanc crème, ont un diamètre d'environ 3 mm à 6 mm ; le calice comprend 5 sépales vert foncé velus, réfléchis et soudés à la base à un réceptacle concave ; les 5 pétales libres, se détachant facilement, sont de couleur jaune pâle et de forme obovale se rétrécissant nettement à la base ; les étamines sont nombreuses, à anthère arrondie, plus longues que les pétales ; le gynécée comprend environ 4 à 6 carpelles à style court terminé par un stigmate globuleux ; les carpelles s'enroulent ensemble en spirale pour former des fruits brun-jaune présentant une torsion hélicoïdale. Des bourgeons floraux non ouverts sont souvent présents. Si le fruit est présent, il a une torsion hélicoïdale et contient des graines brunâtres.

B. Réduisez la drogue à examiner en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente : des poils tecteurs unicellulaires, certains très longs et flexueux à paroi mince, effilés à l'extrémité, d'autres plus courts, à paroi épaisse, de forme conique et épaissis à la base ; quelques poils glanduleux claviformes à pédicelle unisérié comportant 1 à 3 cellules et à tête multicellulaire à contenu brun et dense ; des fragments de feuilles et de sépales comprenant des cellules épidermiques à paroi sinueuse à onduleuse, des stomates anomocytiques (*2.8.3*) présents seulement sur la face inférieure, et du mésophylle contenant des macles d'oxalate de calcium ; des cellules épidermiques à paroi fine provenant des pétales, dont certaines présentent des papilles arrondies ; de nombreux grains de pollen sphériques à 3 pores germinatifs et à exine légèrement ponctuée ; des fragments de l'assise fibreuse des anthères à épaississements étoilés ; des amas de parenchyme des ovaires, à petites cellules contenant des cristaux prismatiques d'oxalate de calcium ; des fragments de tissu vasculaire provenant des feuilles et des tiges, à vaisseaux spiralés ou annelés.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Solution xylénique obtenue lors du dosage.

*Solution témoin.* Dissolvez 0,1 mL de *salicylate de méthyle R* et 0,1 mL d'*aldéhyde salicylique R* dans du *xylène R* et complétez à 5 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *hexane R, toluène R* (50:50 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez sur la plaque 3 mL de *solution de chlorure ferrique R3* et examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Salicylate de méthyle : une bande brun-violet | Une bande brun-violet (salicylate de méthyle) |
| Aldéhyde salicylique : une bande brun-violet | Une bande brun-violet (aldéhyde salicylique) |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

Drogues végétales

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5,0 pour cent de tiges d'un diamètre supérieur à 5 mm et au maximum 2,0 pour cent d'éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*) pendant 2 h.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 7,0 pour cent.

DOSAGE

Opérez selon la méthode décrite pour le dosage des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez 50,0 g de drogue à examiner, un ballon de 1000 mL, 300 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* comme liquide d'entraînement et 0,5 mL de *xylène R* dans le tube gradué latéral. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 2 h.

**01/2008:1885**
**corrigé 6.0**

# RENOUÉE DES OISEAUX

## Polygoni avicularis herba

DÉFINITION

Parties aériennes fleuries séchées, entières ou fragmentées, de *Polygonum aviculare* L. *s.l.*

*Teneur* : au minimum 0,30 pour cent de flavonoïdes, exprimés en hypéroside ($C_{21}H_{20}O_{12}$ ; $M_r$ 464,4) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La tige ramifiée et noueuse, cylindrique ou légèrement anguleuse, striée longitudinalement, a une épaisseur de 0,5 mm à 2 mm. Elle porte des feuilles glabres, entières, sessiles ou brièvement pétiolées, de forme et de taille très variables, avec des stipules argentées et nervurées formant une gaine à la base (ochrea). Les fleurs, axillaires, de petite taille, ont un périanthe à 5 pièces blanc-vert dont les pointes sont souvent colorées en rouge. Les fruits sont des akènes bruns à noirs, triangulaires, de 2 mm à 4 mm, généralement ponctués ou striés.

B. Réduisez la renouée des oiseaux en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-vert. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de l'épiderme des feuilles, possédant des cellules à parois polygonales à sinueuses et de nombreux stomates anisocytiques (*2.8.3*), avec une cuticule striée ; des fragments de feuilles et de tiges contenant de nombreuses macles d'oxalate de calcium, dont certaines sont de très grande taille ; des groupes de fibres à paroi épaisse provenant de l'hypoderme de la tige ; des grains de pollen globuleux à exine lisse et à 3 pores germinatifs ; quelques fragments bruns de l'exocarpe composé de cellules à paroi sinueuse et épaisse. Examinez au microscope en utilisant de la solution d'*hydroxyde de potassium R* à 675 g/L et chauffez doucement. L'épiderme des feuilles et quelques cellules du mésophylle prennent une coloration rouge à violet-rouge. Examinez au microscope en utilisant une solution de *chlorure ferrique R* à 0,1 g/L. Les fragments de feuilles deviennent presque noirs.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 1,0 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Chauffez à reflux dans un bain-marie pendant 10 min. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 1 mg d'*acide caféique R*, 2,5 mg d'*hypéroside R* et 1 mg d'*acide chlorogénique R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, acide acétique glacial R, eau R, acétate d'éthyle R* (7:7:14:72 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R*, pulvérisez ensuite une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R*. Laisser sécher la plaque à l'air pendant 30 min, puis examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes de fluorescence présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. De plus, d'autres bandes de fluorescence sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Acide caféique : une bande de fluorescence bleu clair | 1 ou 2 bandes de fluorescence bleue (acide caféique) |
| ——— | ——— |
| | 1 ou 2 bandes de fluorescence vert-jaune |
| | Une bande de fluorescence jaune |
| Hypéroside : une bande de fluorescence brun-jaune | |
| | Une bande de fluorescence brun-jaune |
| Acide chlorogénique : une bande de fluorescence bleu clair | Une bande de fluorescence bleu clair (acide chlorogénique) |
| ——— | ——— |
| | Une bande de fluorescence brun-jaune |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 2 pour cent de racines et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (710) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

DOSAGE

*Solution mère.* Placez 0,800 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*) dans un ballon à fond rond de 100 mL. Ajoutez 1 mL d'une solution d'*hexaméthylènetétramine R* à 5 g/L, 20 mL d'*acétone R* et 2 mL d'*acide chlorhydrique R1*. Chauffez à reflux pendant 30 min. Filtrez le liquide sur un peu de coton hydrophile dans une fiole. Ajoutez le coton hydrophile au résidu dans le ballon à fond rond et procédez à une extraction avec 2 fois 20 mL d'*acétone R* en chauffant chaque fois à reflux pendant 10 min. Laissez refroidir, filtrez chaque extrait sur le coton hydrophile dans la fiole. Filtrez les extraits d'acétone combinés sur un papier filtre dans une fiole jaugée et complétez à 100,0 mL avec de l'*acétone R* en rinçant la fiole et le papier filtre. Transvasez 20,0 mL de solution dans une ampoule à décantation, ajoutez 20 mL d'*eau R* et agitez avec 1 fois 15 mL et ensuite avec 3 fois 10 mL d'*acétate d'éthyle R*. Réunissez les extraits d'acétate d'éthyle dans une ampoule à décantation et lavez-les avec 2 fois 50 mL d'*eau R*. Filtrez les extraits sur 10 g de *sulfate de sodium anhydre R* dans une fiole jaugée de 50 mL et complétez au volume avec de l'*acétate d'éthyle R*.

*Solution à examiner.* A 10,0 mL de solution mère, ajoutez 1 mL de *réactif au chlorure d'aluminium R* et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide acétique glacial R* à 5 pour cent *V/V* dans du *méthanol R*.

*Liquide de compensation.* Prélevez 10,0 mL de solution mère et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide acétique glacial R* à 5 pour cent *V/V* dans du *méthanol R*.

Après 30 min, mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner à 425 nm par rapport au liquide de compensation. Calculez la teneur pour cent en flavonoïdes, exprimés en hypéroside, à l'aide de l'expression :

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

en prenant 500 comme valeur de l'absorbance spécifique de l'hypéroside.

*A* = absorbance à 425 nm,

*m* = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2008:0291**
**corrigé 6.0**

# RHUBARBE

## Rhei radix

DÉFINITION

La rhubarbe est constituée par les organes souterrains entiers ou coupés, séchés de *Rheum palmatum* L. ou de *Rheum officinale* Baillon ou des hybrides des 2 espèces ou d'un mélange. Les organes souterrains sont souvent divisés ; ils sont dépourvus des éléments de tige et de la presque totalité de la partie corticale comportant de petites racines.

La rhubarbe contient au minimum 2,2 pour cent de dérivés hydroxyanthracéniques, exprimés en rhéine ($C_{15}H_8O_6$, $M_r$ 284,2), calculé par rapport à la drogue desséchée.

CARACTÈRES

Odeur caractéristique, aromatique.

IDENTIFICATION

A. La rhubarbe a un aspect variable : morceaux discoïdes dont le diamètre peut atteindre jusqu'à 10 cm et l'épaisseur 1 cm à 5 cm ; morceaux cylindriques, ovales ou morceaux plan-convexes. La surface de teinte rosâtre, est généralement recouverte d'une couche de poudre jaune-brun. Elle présente, surtout après avoir été humectée, des lignes plus foncées qui s'entrecroisent. Ces structures confèrent à la drogue un aspect marbré. La cassure est granuleuse. La section transversale du rhizome comporte, à l'extérieur, une zone étroite de lignes radiales rouge-brun. Ces rayons médullaires sont croisés perpendiculairement par un anneau cambial foncé. L'intérieur de cette zone présente un anneau de petites formations étoilées de faisceaux vasculaires anormaux. La racine présente une structure plus radiale.

B. Réduisez la rhubarbe en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est orange à jaune-brun. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : de grosses macles d'oxalate de calcium pouvant mesurer plus de 100 µm et leurs fragments ; des vaisseaux réticulés non lignifiés pouvant atteindre jusqu'à 175 µm ; de nombreux groupes de cellules arrondies ou polygonales, à parois minces, du parenchyme. La poudre ne présente aucune fibre ni cellules scléreuses.

   Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente des grains d'amidon arrondis, simples et des grains composés de 2 à 4 éléments avec un hile étoilé.

C. Opérez par chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) en utilisant une plaque recouverte de gel de silice approprié.

   *Solution à examiner*. Chauffez dans un bain-marie pendant 15 min 50 mg de rhubarbe pulvérisée (180) (*2.9.12*) avec un mélange de 1 mL d'*acide chlorhydrique R* et de 30 mL d'*eau R*. Laissez refroidir, agitez le liquide avec 25 mL d'*éther R*. Séchez la solution éthérée sur du *sulfate de sodium anhydre R*, puis filtrez. Evaporez la solution éthérée à siccité, puis dissolvez le résidu dans 0,5 mL d'*éther R*.

   *Solution témoin*. Dissolvez 5 mg d'*émodine R* dans 5 mL d'*éther R*.

   Déposez séparément sur la plaque, en bandes, 20 µL de chaque solution. Développez sur un parcours de 10 cm avec un mélange de 1 volume d'*acide formique anhydre R*, de 25 volumes d'*acétate d'éthyle R* et de 75 volumes d'*éther de pétrole R*. Laissez sécher la plaque à l'air. Examinez les chromatogrammes en lumière ultraviolette à 365 nm. Le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente en son milieu une bande de fluorescence orange (émodine). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente : une bande due à l'émodine ; au-dessus de la bande due à l'émodine, 2 bandes de même fluorescence (physcione et chrysophanol par ordre de $R_F$ croissant) et en-dessous de la bande due à l'émodine, également 2 bandes de même fluorescence (rhéine et aloe-émodine par ordre de $R_F$ décroissant). Pulvérisez une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 100 g/L dans le *méthanol R*. Toutes les bandes se colorent en rouge à violet.

D. A 50 mg environ de rhubarbe pulvérisée (180) (*2.9.12*), ajoutez 25 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et chauffez au bain-marie pendant 15 min. Laissez refroidir, agitez la solution avec 20 mL d'*éther R* et rejetez la phase aqueuse. Agitez l'éther avec 10 mL d'*ammoniaque diluée R1*. Il se développe une coloration rouge à violet dans la phase aqueuse.

ESSAI

**Rheum rhaponticum**. Opérez par chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) en utilisant une plaque recouverte de *gel de silice G R*.

*Solution à examiner*. Chauffez à reflux à ébullition pendant 5 min 0,2 g de rhubarbe pulvérisée (180) (*2.9.12*) avec 2 mL de *méthanol R*. Laissez refroidir et filtrez. Utilisez le filtrat comme solution à examiner.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg de *rhaponticoside R* dans 10 mL de *méthanol R*.

Déposez séparément sur la plaque, en bandes de 20 mm sur 3 mm au maximum, 20 µL de chaque solution. Développez sur un parcours de 12 cm avec un mélange de 20 volumes de *méthanol R* et de 80 volumes de *chlorure de méthylène R*. Laissez sécher la plaque à l'air. Pulvérisez de la *solution d'acide phosphomolybdique R*. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande bleue correspondant à celle du rhaponticoside qui se trouve dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, près du point de dépôt.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*). Déterminée à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de rhubarbe pulvérisée (180) (*2.9.12*), la perte à la dessiccation n'est pas supérieure à 12,0 pour cent.

**Cendres totales** (*2.4.16*). Le taux des cendres totales n'est pas supérieur à 12,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*). Le taux des cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique n'est pas supérieur à 2,0 pour cent.

DOSAGE

*Effectuez le dosage à l'abri d'une lumière vive.*

Dans un ballon de 100 mL, introduisez 0,100 g de rhubarbe pulvérisée (180) (*2.9.12*). Ajoutez 30,0 mL d'*eau R*, mélangez et pesez. Placez le ballon dans un bain-marie et chauffez à reflux pendant 15 min. Laissez refroidir, ajoutez 50 mg de *bicarbonate de sodium R*, pesez et rétablissez la masse avec de l'*eau R*. Centrifugez et introduisez 10,0 mL du liquide dans un ballon de 100 mL à col rodé. Ajoutez 20 mL de *solution de chlorure ferrique R1* et mélangez. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 20 min. Ajoutez 1 mL d'*acide chlorhydrique R* et continuez à chauffer pendant 20 min en agitant fréquemment. Refroidissez, transvasez le mélange dans une ampoule à décantation et agitez avec 3 fois 25 mL d'*éther R* précédemment utilisé pour rincer le ballon. Réunissez les

Drogues végétales

phases éthérées et lavez avec 2 fois 15 mL d'*eau R*. Filtrez les solutions éthérées sur un tampon de coton hydrophile dans une fiole jaugée et complétez à 100,0 mL avec de l'*éther R*. Prélevez 10,0 mL et évaporez-les avec précaution au bain-marie à siccité et dissolvez le résidu dans 10,0 mL d'une solution d'*acétate de magnésium R* à 5 g/L dans le *méthanol R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 515 nm, en utilisant du *méthanol R* comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en dérivés hydroxyanthracéniques exprimés en rhéine à l'aide de l'expression :

$$\frac{A \times 0,64}{m}$$

en prenant 468 comme valeur de l'absorbance spécifique due à la rhéine, calculée par rapport à l'absorbance spécifique de la barbaloïne.

$A$ = absorbance à 515 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2008:1560**

# ROMARIN

## Rosmarini folium

DÉFINITION

Feuille entière séchée de *Rosmarinus officinalis* L.

*Teneur* :

- au minimum 12 mL/kg d'huile essentielle (drogue anhydre),
- au minimum 3 pour cent de dérivés hydroxycinnamiques totaux, exprimés en acide rosmarinique ($C_{18}H_{16}O_8$ ; $M_r$ 360) (drogue anhydre).

CARACTÈRES

Odeur fortement aromatique.

IDENTIFICATION

A. La feuille est sessile, coriace, linéaire à linéaire-lancéolée, avec des bords incurvés ; elle possède une longueur de 1 cm à 4 cm et une largeur de 2 mm à 4 mm. Sa face supérieure est vert sombre, glabre, chagrinée ; sa face inférieure vert-gris et fortement tomenteuse, avec une nervure médiane saillante.

B. Réduisez le romarin en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-gris à vert-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente des fragments de l'épiderme inférieur à cellules à paroi droite à sinueuse, accompagnées de nombreux stomates diacytiques (*2.8.3*) ; des fragments de l'épiderme supérieur à cellules à paroi droite, légèrement épaissie et ponctuée, avec un hypoderme sous-jacent composé de grandes cellules irrégulières à paroi anticlinale épaissie en chapelet ; des fragments, vus en coupe, de cellules hypodermiques qui s'étendent par endroits, à travers le limbe, en séparant 1 ou 2 assises de cellules palissadiques en larges zones en forme de croissant ; de nombreux poils tecteurs pluricellulaires, pour la plupart ramifiés de l'épiderme inférieur et de rares poils tecteurs coniques de l'épiderme supérieur ; des poils glanduleux de 2 types, la majorité à court pied unicellulaire et tête composée de 8 cellules en rosace, d'autres, moins nombreux, à pied unicellulaire et tête sphérique monocellulaire ou bicellulaire.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 20 µL d'huile essentielle obtenue au cours du dosage dans 1 mL d'*hexane R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *bornéol R*, 5 mg d'*acétate de bornyle R* et 10 µL de *cinéole R* dans 1 mL d'*hexane R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'anisaldéhyde R*. Chauffez à 100-105 °C pendant 10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande rouge |
| Acétate de bornyle : une bande brun-jaune | Une bande brun-jaune de faible intensité |
| | Une bande colorée de faible intensité |
| Cinéole : une bande violette | Une bande violette |
| | Des bandes colorées de faible intensité |
| Bornéol : une bande brun-violet | Une bande brun-violet |
| | Une bande colorée de faible intensité |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

D. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Broyez 1,0 g de romarin dans 10 mL de *méthanol R* et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 5,0 mg d'*acide rosmarinique R* et 1,0 mg d'*acide caféique R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, acétone R, chlorure de méthylène R* (8,5:25:85 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL de solution à examiner et 20 µL de solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 8 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence rose |
| Acide caféique : une bande de fluorescence bleu clair | Une bande de fluorescence bleue de faible intensité |
| Acide rosmarinique : une bande de fluorescence bleu clair | Une bande de fluorescence bleu clair intense |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent de tiges et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Eau** (*2.2.13*) : au maximum 100 mL/kg, déterminé sur 20,0 g de romarin pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 9,0 pour cent.

DOSAGE

**Dérivés hydroxycinnamiques totaux**

*Solution mère*. A 0,200 g de romarin pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 80 mL d'*alcool à 50 pour cent V/V R*. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Laissez refroidir et filtrez. Rincez le filtre avec 10 mL d'*alcool à 50 pour cent V/V R*. Réunissez le filtrat et la solution de rinçage dans un ballon jaugé et complétez à 100,0 mL avec de l'*alcool à 50 pour cent V/V R*.

*Solution à examiner*. A 1,0 mL de solution mère, ajoutez 2 mL d'*acide chlorhydrique 0,5 M*, 2 mL d'une solution préparée en dissolvant 10 g de *nitrite de sodium R* et 10 g de *molybdate*

*de sodium R* dans 100 mL d'*eau R*, puis 2 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* et complétez à 10,0 mL avec de l'*eau R* ; mélangez.

*Solution de compensation*. Prélevez 1,0 mL de solution mère et complétez à 10,0 mL avec de l'*eau R*.

Mesurez immédiatement l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner à 505 nm.

Calculez la teneur pour cent en dérivés hydroxycinnamiques totaux, exprimés en acide rosmarinique, à l'aide de l'expression :

$$\frac{A \times 2,5}{m}$$

en prenant 400 comme valeur de l'absorbance spécifique de l'acide rosmarinique.

$A$ = absorbance de la solution à examiner à 505 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**Huile essentielle** (*2.8.12*). Utilisez 25,0 g de romarin contusé, un ballon de 1000 mL et 300 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 3 h.

**01/2008:1846**

# ROMARIN (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Rosmarini aetheroleum

### DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau des parties aériennes fleuries de *Rosmarinus officinalis* L.

### CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, mobile, incolore ou jaune pâle.

Odeur caractéristique.

### IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,5 mL d'huile essentielle de romarin dans du *toluène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 50 mg de *bornéol R*, 50 mg d'*acétate de bornyle R* et 100 µL de *cinéole R* dans du *toluène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez du *réactif à la vanilline R* et chauffez la plaque à 100-105 °C pendant 10 min. Examinez immédiatement à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, plusieurs bandes bleu-violet à gris-violet d'intensité moyenne (alcools terpéniques) sont présentes dans le tiers inférieur du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| | Une bande violette intense<br>Une bande gris-violet |
| ——— | ——— |
| Acétate de bornyle : une bande gris-bleu de faible intensité | Une bande gris-bleu de faible intensité (acétate de bornyle)<br>Une bande rose-violet |
| ——— | ——— |
| Cinéole : une bande bleue intense | Une bande bleue intense (cinéole) |
| Bornéol : une bande bleu-violet d'intensité moyenne | Une bande bleu-violet d'intensité moyenne (bornéol) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables, quant à leur temps de rétention, aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

### ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,895 à 0,920.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,464 à 1,473.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : – 5° à + 8°.

**Indice d'acide** (*2.5.1*) : au maximum 1,0.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,20 mL d'huile essentielle de romarin dans de l'*hexane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 20 µL d'*α-pinène R*, 10 mg de *camphène R*, 20 µL de *β-pinène R*, 10 µL de *β-myrcène R*, 20 µL de *limonène R*, 50 µL de *cinéole R*, 10 µL de *p-cymène R*, 50 mg de *camphre R*, 30 mg d'*acétate de bornyle R*, 10 mg d'*α-terpinéol R*, 10 mg de *bornéol R* et 10 µL de *verbénone R* dans de l'*hexane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : $l$ = 30 m (une épaisseur du film de 1 µm peut être utilisée) à 60 m (une épaisseur du film de 0,2 µm peut être utilisée), Ø = 0,25-0,53 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R.*

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R.*

*Débit* : 1 mL/min.

*Rapport de division* : 1:50.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 10 | 50 |
| | 10 - 85 | 50 → 200 |
| | 85 - 110 | 200 |
| Chambre à injection | | 200 |
| Détecteur | | 250 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL.

*Ordre d'élution* : ordre donné pour la préparation de la solution témoin. Notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au limonène et au cinéole et au minimum 1,5 entre les pics dus à l'α-terpinéol et au bornéol.

Drogues végétales

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez les composants de la solution témoin sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Déterminez la teneur pour cent de ces composants.

Pour l'huile essentielle de romarin type Espagne, ces pourcentages sont compris entre les valeurs suivantes :

– *α-pinène* : 18 pour cent à 26 pour cent,
– *camphène* : 8,0 pour cent à 12,0 pour cent,
– *β-pinène* : 2,0 pour cent à 6,0 pour cent,
– *β-myrcène* : 1,5 pour cent à 5,0 pour cent,
– *limonène* : 2,5 pour cent à 5,0 pour cent,
– *cinéole* : 16,0 pour cent à 25,0 pour cent,
– *p-cymène* : 1,0 pour cent à 2,2 pour cent,
– *camphre* : 13,0 pour cent à 21,0 pour cent,
– *acétate de bornyle* : 0,5 pour cent à 2,5 pour cent,
– *α-terpinéol* : 1,0 pour cent à 3,5 pour cent,
– *bornéol* : 2,0 pour cent à 4,5 pour cent,
– *verbénone* : 0,7 pour cent à 2,5 pour cent.

Pour l'huile essentielle de romarin type Maroc et Tunisie, ces pourcentages sont compris entre les valeurs suivantes :

– *α-pinène* : 9,0 pour cent à 14,0 pour cent,
– *camphène* : 2,5 pour cent à 6,0 pour cent,
– *β-pinène* : 4,0 pour cent à 9,0 pour cent,
– *β-myrcène* : 1,0 pour cent à 2,0 pour cent,
– *limonène* : 1,5 pour cent à 4,0 pour cent,
– *cinéole* : 38,0 pour cent à 55,0 pour cent,
– *p-cymène* : 0,8 pour cent à 2,5 pour cent,
– *camphre* : 5,0 pour cent à 15,0 pour cent,
– *acétate de bornyle* : 0,1 pour cent à 1,5 pour cent,
– *α-terpinéol* : 1,0 pour cent à 2,6 pour cent,
– *bornéol* : 1,5 pour cent à 5,0 pour cent,
– *verbénone* : au maximum 0,4 pour cent.

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique s'il s'agit d'huile essentielle de romarin de type Espagne ou du type Maroc et Tunisie.

**01/2008:1848**
**corrigé 6.0**

# SABAL (FRUIT DE)

## Sabalis serrulatae fructus

DÉFINITION

Fruit mûr séché de *Serenoa repens* (Bartram) Small. (*Sabal serrulata* (Michaux) Nichols).

*Teneur* : au minimum 11,0 pour cent d'acides gras totaux (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Odeur caractéristique, forte, désagréable mais pas rance.

IDENTIFICATION

*Première identification : A, B, D.*

*Seconde identification : A, B, C.*

A. Le fruit de sabal est une drupe ovoïde ou sub-sphérique avec une surface brun foncé ou noirâtre, grossièrement ridée et à reflets plus au moins cuivrés, pouvant atteindre 2,5 cm de long et 1,5 cm de diamètre. L'apex porte parfois les restes du style et du calice tubuleux à 3 dents ; la base porte une petite dépression avec la cicatrice du pédoncule. L'épicarpe et le mésocarpe sous-jacent forment une couche mince et fragile, qui se détache partiellement, révélant l'endocarpe de couleur brun pâle, mince, dur, fibreux et facilement détachable. La graine est irrégulièrement sphérique ou ovoïde, pouvant atteindre 12 mm de long et 8 mm de diamètre ; sa surface est dure, lisse, finement ponctuée, brun-rouge, avec une plage plus pâle, saillante et membraneuse autour du raphé et du micropyle ; coupée transversalement, la graine a un tégument fin, un périsperme étroit et un albumen épais, dense, corné, blanc-gris ; l'embryon est placé d'un côté.

B. Réduisez le fruit de sabal en poudre (710) (*2.9.12*). La poudre est rougeâtre ou brun-noir et huileuse. Examinez au microscope en utilisant de la solution d'*hydrate de chloral R*. La poudre présente des fragments d'épicarpe composés de plusieurs couches de cellules polyédriques (10-40 µm), à parois minces, brun-rouge, pigmentées et fortement cutinisées ; les cellules des couches externes sont plus petites que celles des couches internes. Les cellules parenchymateuses du mésocarpe peuvent être larges et remplies de gouttelettes huileuses, ou plus petites et contenant des nodules de silice ; des faisceaux de xylème du mésocarpe présentant de petits vaisseaux lignifiés, à épaississements annelés ou spiralés ; des cellules scléreuses du mésocarpe (20-200 µm) souvent dispersées, habituellement isolées mais parfois en petits groupes ; les parois sont modérement épaissies, distinctement striées et finement ponctuées ; des fragments d'endocarpe contenant des groupes d'éléments scléreux allongés d'environ 300 µm de long, à parois fortement épaissies et présentant de nombreuses ponctuations ; le tégument de la graine est composé de petites cellules à parois minces à contenu brun et éléments scléreux sous-jacents ; des cellules de l'albumen à parois épaissies à ponctuations larges et bien visibles, contenant des grains d'aleurone et de l'huile.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 1,5 g de fruit de sabal pulvérisé (710) (*2.9.12*), ajoutez 20 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et agitez pendant 15 min. Filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 4 mg de *β-amyrine R* et 10 mg de *β-sitostérol R* dans 10 mL d'*éthanol à 96 pour cent R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm).

*Phase mobile* : *acide acétique R, acétate d'éthyle R, toluène R* (1:30:70 *V/V/V*).

*Dépôt* : 8 µL de solution à examiner et 2 µL de solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* ; séchez à 100-105 °C pendant 5-10 min ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, particulièrement dans le tiers inférieur.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| | Une forte bande bleue |
| _______ | _______ |
| | Une bande bleue peu intense |
| β-Amyrine : une bande bleue | Une bande bleue peu intense |
| | Une forte bande violet-bleu |
| β-Sitostérol : une bande bleue | |
| | Une faible bande bleue |
| _______ | _______ |
| | Une faible bande bleue |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

D. Examinez les chromatogrammes obtenus dans le dosage des acides gras totaux.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Le pic principal est dû à l'acide laurique.

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de fruit de sabal pulvérisé (710) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 5,0 pour cent.

DOSAGE

**Acides gras totaux**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*).

*Solution d'étalon interne.* Dissolvez 0,47 g de *margarate de méthyle R* et 0,47 g de *pélargonate de méthyle R* dans 20,0 mL de *diméthylformamide R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Solution à examiner.* Réduisez 50 g de fruit de sabal en poudre (200) (*2.9.12*). Introduisez 4,0 g de fruit de sabal pulvérisé dans une fiole jaugée de 100 mL. Ajoutez 60,0 mL de *diméthylformamide R*. Mélangez par traitement aux ultrasons pendant 15 min et agitez ensuite pendant 30 min. Complétez à 100,0 mL avec du *diméthylformamide R*. Laissez reposer pendant quelques minutes et filtrez. A 20,0 mL de cette solution, ajoutez 4,0 mL de solution d'étalon interne et complétez à 25,0 mL avec du *diméthylformamide R*. A 0,4 mL de cette solution, ajoutez 0,6 mL d'une solution d'*hydroxyde de triméthylsulfonium R* à 18,84 g/L dans du *méthanol R* et mélangez.

*Solution témoin.* Dissolvez 32,0 mg d'*acide caproïque R*, 62,0 mg d'*acide caprylique R*, 68,0 mg d'*acide caprique R*, 0,699 g d'*acide laurique R*, 0,267 g d'*acide myristique R*, 10,0 mg d'*acide palmitoléique R*, 0,217 g d'*acide palmitique R*, 0,115 g d'*acide linoléique R*, 18,0 mg d'*acide linolénique R*, 0,870 g d'*acide oléique R* et 49,0 mg d'*acide stéarique R* dans du *diméthylformamide R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant. A 1,0 mL de la solution, ajoutez 4,0 mL de solution d'étalon interne et complétez à 25,0 mL avec du *diméthylformamide R*. A 0,4 mL de cette solution, ajoutez 0,6 mL d'une solution d'*hydroxyde de triméthylsulfonium R* à 18,84 g/L dans du *méthanol R* et mélangez.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : $l$ = 25 m (une épaisseur de film de 1 µm peut être utilisée) à 60 m (une épaisseur de film de 0,2 µm peut être utilisée), Ø = 0,20-0,53 mm,
– *phase stationnaire* : *poly(diméthyl)siloxane R*.

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 0,5 mL/min.

*Rapport de division* : 1:40.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 2 | 150 |
| | 2 - 7 | 150 → 190 |
| | 7 - 22 | 190 → 220 |
| Chambre à injection | | 300 |
| Détecteur | | 300 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1,0 µL.

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez les composants de la solution témoin sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Utilisez l'expression suivante pour déterminer la teneur pour cent des différents acides gras. Calculez la teneur en acide caproïque, acide caprylique, acide caprique et acide laurique en utilisant le pélargonate de méthyle comme étalon interne. Calculez la teneur en acide myristique, acide palmitoléique, acide palmitique, acide linoléique, acide linolénique, acide oléique et acide stéarique en utilisant le margarate de méthyle comme étalon interne. La surface du pic de l'acide laurique représente au moins 20 pour cent de la surface totale des pics.

$$\frac{A_1}{A_3} \times \frac{A_2}{A_4} \times \frac{m_2}{m_1} \times p \times 0,5$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'acide gras dérivatisé considéré, dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû au pélargonate de méthyle ou au margarate de méthyle, dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$A_3$ = surface du pic dû au pélargonate de méthyle ou au margarate de méthyle, dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_4$ = surface du pic dû à l'acide gras dérivatisé considéré, dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai, en grammes,

$m_2$ = masse de l'acide gras considéré, dans la solution témoin, en grammes,

$p$ = pureté de l'acide gras considéré, dans la solution témoin, en pour cent.

**01/2008:1537**
**corrigé 6.0**

# SALICAIRE

## Lythri herba

DÉFINITION

Sommité fleurie séchée, entière ou coupée, de *Lythrum salicaria* L.

*Teneur* : au minimum 5,0 pour cent de tanins, exprimés en pyrogallol ($C_6H_6O_3$ ; $M_r$ 126,1) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La salicaire présente des tiges rigides, quadrangulaires, ramifiées vers le haut, vert-brun, pubescentes, ridées longitudinalement. Les feuilles sont opposées, décussées, rarement verticillées par 3 et parfois alternes au niveau de l'inflorescence qui forme un long épi terminal. La feuille est sessile, lancéolée et cordiforme à la base, d'environ 5-15 cm de long sur 1-2,5 cm de large, pubescente à la face inférieure ;

Drogues végétales

les nervures secondaires s'anastomosent en feston au bord du limbe. Les fleurs ont un calice, gamosépale, persistant, pubescent, tubuleux, de 4-8 mm de long, formé de 6 sépales surmontés de 6 petites dents triangulaires alternant avec 6 grandes dents aiguës au moins aussi longues que la moitié du tube ; une corolle, dialypétale, formée de 6 pétales rose violacé, chacun élargi au sommet, avec un bord onduleux et se rétrécissant à la base. L'androcée est constitué de 2 verticilles de 6 étamines (un verticille à étamines courtes et à peine exertes, et un verticille à étamines longues dépassant largement la corolle). Le fruit, s'il est formé, est une petite capsule incluse dans le calice persistant.

B. Réduisez la salicaire en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune-vert. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des poils tecteurs, unicellulaires ou bicellulaires, unisériés, à paroi épaisse, finement ponctuée, provenant de l'épiderme inférieur de la feuille et de la tige, de nombreux poils tecteurs du calice, unisériés, unicellulaires ou bicellulaires, à paroi mince et finement ponctuée ; des fragments de pétales, rose violacé, transparents ; de nombreuses macles d'oxalate de calcium ; des grains de pollen à 3 pores, à exine peu épaisse et légèrement granuleuse ; des fragments d'épiderme supérieur à grandes cellules polygonales et à parois sinueuses ; des fragments d'épiderme inférieur à cellules polygonales plus petites et des stomates anomocytiques (*2.8.3*).

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de salicaire pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R* et chauffez dans un bain-marie à 65 °C pendant 5 min en agitant fréquemment. Refroidissez et filtrez. Complétez le filtrat à 10 mL avec du *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 0,5 mg d'*acide chlorogénique R*, 1 mg d'*hypéroside R*, 1 mg de *rutine R* et 1 mg de *vitexine R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide acétique anhydre R, acide formique anhydre R, eau R, acétate d'éthyle R* (7,5:7,5:18:67 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez sur la plaque encore chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R*. Pulvérisez ensuite une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R*. Laissez sécher à l'air pendant 30 min. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente, dans le tiers inférieur, une bande de fluorescence brun-jaune due à la rutine et, dans le tiers médian, une bande de fluorescence bleu clair due à l'acide chlorogénique, au-dessus de laquelle sont présentes une bande de fluorescence brun-jaune due à l'hypéroside et une bande de fluorescence verte due à la vitexine. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande de fluorescence vert vif située légèrement au-dessus de la bande due à la rutine du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, une bande de fluorescence jaune semblable, quant à sa position, à la bande due à l'acide chlorogénique du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, une bande de fluorescence jaune semblable, quant à sa position, à la bande due à l'hypéroside du chromatogramme obtenu avec la solution témoin et une bande de fluorescence vert vif correspondant à la bande due à la vitexine du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de salicaire pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 7,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des tanins dans les drogues végétales (*2.8.14*). Utilisez 0,750 g de salicaire pulvérisée (180) (*2.9.12*).

**04/2008:2385**

# SANGUISORBE (RACINE DE)

## Sanguisorbae radix

DÉFINITION

Organe souterrain, débarrassé des radicelles, entier ou fragmenté, séché, de *Sanguisorba officinalis* L.

*Teneur* : au minimum 5,0 pour cent de tanins, exprimés en pyrogallol ($C_6H_6O_3$ ; $M_r$ 126,1) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Les racines adventives mesurent environ 5-25 cm de long et ont un diamètre pouvant atteindre 2 cm.

IDENTIFICATION

A. La racine de sanguisorbe entière est constituée par le rhizome souvent ramifié, épais, court, fusiforme ou cylindrique et les racines adventives dont la surface est brun-rouge ou brun-noir, striée longitudinalement, parfois fissurée transversalement et marquée par les cicatrices des radicelles.

La racine de sanguisorbe peut également se présenter en fragments pouvant atteindre 2 cm de long, plus ou moins cylindriques, ou en rouelles elliptiques ou irrégulières. La cassure est claire et très fibreuse.

B. Réduisez la racine de sanguisorbe en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-jaune clair. Examinez au microscope en utilisant la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : de très nombreuses fibres libériennes, entières ou fragmentées, généralement isolées, étroites, pouvant atteindre parfois plus de 500 µm de long et dont les parois présentent souvent des aspérités ; des macles d'oxalate de calcium libres ou incluses dans des cellules du parenchyme ; quelques vaisseaux lignifiés réticulés ; de rares fragments de suber. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente des grains d'amidon arrondis ou ovoïdes, simples ou composés de 2-4 éléments ; le diamètre d'un grain élémentaire peut atteindre 30 µm. Certains grains d'amidon se trouvent dans des cellules de parenchyme ou dans des cellules des rayons médullaires.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 2,0 g de racine de sanguisorbe pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 50 mL d'*eau R*, et chauffez à reflux pendant 30 min. Refroidissez la solution et centrifugez pendant 10 min. Agitez le surnageant avec 2 fois 15 mL d'*éther isopropylique R* saturé avec l'*acide chlorhydrique R*. Réunissez les phases éthérées. Evaporez à siccité et dissolvez le résidu dans 1,0 mL de *méthanol R*. Filtrez sur un filtre-seringue en polypropylène (diamètre nominal des pores 0,45 µm).

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg d'*acide gallique R* et 20 mg de *résorcinol R* dans 20 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice* $F_{254}$ *pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice* $F_{254}$ *pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, acétate d'éthyle R, toluène R* (10:30:60 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 4 µL] en bandes.

Drogues végétales

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes d'atténuation de fluorescence présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes d'atténuation de fluorescence de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande d'atténuation de fluorescence |
| _______ | _______ |
| Résorcinol : une bande d'atténuation de fluorescence | |
| | Une bande d'atténuation de fluorescence |
| _______ | _______ |
| Acide gallique : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence (acide gallique) |
| | Une bande d'atténuation de fluorescence |
| | Une bande d'atténuation de fluorescence |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez une solution de *chlorure ferrique R* à 10 g/L dans l'*éthanol anhydre R* et chauffez à 100-105 °C pendant 15 min ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Résorcinol : une bande brune | |
| | Une bande bleu-noir |
| _______ | _______ |
| Acide gallique : une bande bleu-noir | Une bande bleu-noir (acide gallique) |
| | Une bande bleu-noir |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

## ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de racine de sanguisorbe pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 2,0 pour cent.

## DOSAGE

Effectuez la détermination des tanins dans les drogues végétales (*2.8.14*). Utilisez 0,500 g de racine de sanguisorbe pulvérisée (180) (*2.9.12*).

**01/2008:2184**
**corrigé 6.0**

# SARRASIN

# Fagopyri herba

## DÉFINITION

Parties aériennes entières ou fragmentées de *Fagopyrum esculentum* Moench, récoltées en début de floraison, avant la formation des fruits, et immédiatement séchées.

*Teneur* : au minimum 4,0 pour cent de rutine ($C_{27}H_{30}O_{16},3H_2O$ ; $M_r$ 665) (drogue desséchée).

## IDENTIFICATION

A. La tige est cylindrique, creuse, parcourue de fines côtes longitudinales, d'un diamètre d'environ 2-6 mm, de couleur vert-brun ou rougeâtre, peu ramifiée et épaissie aux entre-noeuds. Les feuilles, disposées en spirales, comportent des stipules membraneuses formant une gaine ; leur surface est glabre sauf dans la région des stipules, où sont parfois visibles de courts poils blancs. Les feuilles sont de couleur vert foncé, plus claires sur la face inférieure, et peuvent atteindre 7 cm de largeur et 11 cm de longueur ; elles sont sensiblement pentagonales, avec une base sagittée à cordée à 2 lobes largement arrondis. Les feuilles inférieures sont pétiolées, les feuilles supérieures sessiles ou amplexicaules. Le limbe est glabre avec un bord finement sinueux et frangé de minuscules excroissances brun-rouge ; des excroissances similaires apparaissent sur les nervures de la face supérieure. L'inflorescence est une panicule cymeuse composée de fleurs de 1-2 mm de longueur et de 6 mm de diamètre, à 5 pétales libres de couleur blanche ou rougeâtre.

B. Réduisez le sarrasin en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert foncé avec quelques particules brunes, roses ou blanchâtres. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de l'épiderme de la tige et du limbe foliaire vus de face, composés, pour ceux de la tige, de cellules allongées à paroi externe striée et, pour ceux du limbe, de cellules polygonales accompagnées de nombreux stomates anomocytiques (*2.8.3*) ; quelques fragments du bord de la feuille et de l'épiderme recouvrant les nervures, présentant des excroissances ovoïdes à arrondies semblables à des papilles, souvent rougeâtres, à parois épaissies et striées ; de nombreuses macles d'oxalate de calcium, d'un diamètre de 25-100 µm, et des cristaux prismatiques plus petits qui apparaissent dispersés dans le mésophylle de la feuille et en files longitudinales dans le parenchyme de la tige ; des fragments de tissu lignifié à vaisseaux ponctués ou réticulés et à fibres ponctuées à paroi mince ; quelques fragments de la corolle à épiderme papilleux ; des grains de pollen sphériques d'environ 50 µm de diamètre, à exine ponctuée, présentant 3 sillons.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 0,5 g de sarrasin pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 5,0 mL de *méthanol R*. Chauffez à reflux dans un bain-marie à 60 °C pendant 10 min, puis refroidissez et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg d'*hypéroside R* et 10 mg de *rutine R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, acétate d'éthyle R* (1:1:8 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL [ou 5 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à 100-105 °C.

Drogues végétales

*Détection* : pulvérisez une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R*, puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R* ; laissez sécher à l'air pendant environ 30 min, puis examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | 2 bandes rouges |
| | 1-2 bandes bleu clair |
| _______ | _______ |
| | une bande orangée |
| | une bande orangée |
| Hypéroside : une bande orangée | 2 bandes bleues |
| _______ | _______ |
| Rutine : une bande jaune-orangé | une bande jaune-orangé (rutine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de sarrasin pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 15,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* A 0,500 g de sarrasin pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 30 mL d'une solution de *méthanol R* à 80 pour cent *V/V*. Chauffez à reflux dans un bain-marie à 60 °C pendant 30 min, puis procédez à l'extraction en traitant aux ultrasons pendant 15 min. Laissez refroidir et complétez à 50,0 mL avec une solution de *méthanol R* à 80 pour cent *V/V*, puis filtrez.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 25,0 mg de *rutoside trihydraté SCR* dans du *méthanol R* à 80 pour cent *V/V*, puis complétez à 50,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 20,0 mg de *troxérutine R* et 5,0 mg de *quercitroside R* dans une solution de *méthanol R* à 80 pour cent *V/V*, puis complétez à 50,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :
- *dimensions* : *l* = 0,125 m, Ø = 4 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 μm),
- *température* : 30 °C.

*Phase mobile* :
- *phase mobile A* : mélangez 50 volumes d'*acétonitrile R* et 950 volumes d'*eau R* préalablement ajusté à pH 2 avec de l'*acide phosphorique R* ;
- *phase mobile B* : mélangez 95 volumes d'*eau R* ajustée à pH 2 avec de l'*acide phosphorique R* et 905 volumes d'*acétonitrile R* ;

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 6 | 94 | 6 |
| 6 - 16,5 | 94 → 85 | 6 → 15 |
| 16,5 - 22 | 85 → 76 | 15 → 24 |
| 22 - 25 | 76 → 59 | 24 → 41 |
| 25 - 27 | 59 → 94 | 41 → 6 |

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 350 nm.

*Injection* : 10 μL.

*Conformité du système* : solution témoin (b) :
- *ordre d'élution* : lorsque le chromatogramme est enregistré dans les conditions prescrites, les composants sont élués dans l'ordre indiqué pour la préparation de la solution témoin (b),
- *résolution* : au minimum 3 entre les pics dus à la troxérutine et au quercitroside.

A l'aide des temps de rétention du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a), localisez le pic de la rutine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Calculez la teneur pour cent en rutine à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p}{A_2 \times m_1} \times \frac{100}{100 - d}$$

$A_1$ = surface du pic dû à la rutine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû au rutoside trihydraté dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),

$m_1$ = masse de la prise d'essai, en grammes,

$m_2$ = masse de *rutoside trihydraté SCR*, en grammes,

$p$ = pureté du *rutoside trihydraté SCR*, en pour cent,

$d$ = perte à la dessiccation, en pour cent.

**07/2008:1849**
**corrigé 7.0**

# SAUGE D'ESPAGNE (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Salviae lavandulifoliae aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau des parties aériennes de *Salvia lavandulifolia* Vahl, récoltées pendant la floraison.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide mobile, limpide, incolore ou jaune pâle.

Odeur rappelant celle du camphre.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Dissolvez 0,1 mL d'huile essentielle à examiner dans 10 mL de *toluène R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 20 μL de *thuyone R* et 30 μL de *cinéole R* dans 10 mL de *toluène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 μm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 μm)].

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 10 μL [ou 3 μL] en bandes de 10 mm [ou 6 mm].

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution récemment préparée d'*acide phosphomolybdique R* à 200 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R* et chauffez à 105 °C pendant 10 min ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| | Une bande bleue |
| _______ | _______ |
| Thuyone : 2 bandes violet-rose | |
| Cinéole : une bande bleue | Une bande bleue (cinéole) |
| _______ | _______ |
| | 3 bandes bleues |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention à ceux du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,907 à 0,932.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,465 à 1,473.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : + 7° à + 17°.

**Indice d'acide** (*2.5.1*) : au maximum 2,0, déterminé sur 5,00 g d'huile essentielle à examiner.

**Solubilité dans l'alcool** (*2.8.10*) : 1 volume d'huile essentielle à examiner est soluble dans 2 volumes et plus d'*éthanol à 80 pour cent V/V R*.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,200 g d'huile essentielle à examiner dans de l'*heptane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 0,200 g d'*huile essentielle de sauge d'Espagne pour identification des pics SCR* dans de l'*heptane R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 5 µL de *limonène R* dans de l'*heptane R* et complétez à 50,0 ml avec le même solvant. Prélevez 0,5 mL de cette solution et complétez à 5,0 mL avec de l'*heptane R*.

*Colonne* :
- *matériau* : silice fondue,
- *dimensions* : *l* = 60 m, Ø = 0,25 mm,
- *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur du film 0,25 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Rapport de division* : 1:50.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 43 | 60 → 232 |
| Chambre à injection | | 250 |
| Détecteur | | 250 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 1 µL.

*Conformité du système* : solution témoin (a) :
- le chromatogramme obtenu est semblable au chromatogramme fourni avec l'*huile essentielle de sauge d'Espagne pour identification des pics SCR*,
- *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au limonène et au 1,8-cinéole et au minimum 1,5 entre les pics dus à l'acétate d'α-terpinyle et au bornéol.

Utilisez le chromatogramme fourni avec l'*huile essentielle de sauge d'Espagne pour identification des pics SCR* et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) pour localiser les pics dus à l'α-pinène, au sabinène, au limonène, au 1,8-cinéole, à la thuyone, au camphre, au linalol, à l'acétate de linalyle, au terpinén-4-ol, à l'acétate de sabinyle, à l'acétate d'α-terpinyle et au bornéol.

Déterminez la teneur pour cent de chacun de ces composants. Ces teneurs sont comprises entre les valeurs suivantes :
- *α-pinène* : 4,0 pour cent à 11,0 pour cent,
- *sabinène* : 0,1 pour cent à 3,5 pour cent,
- *limonène* : 2,0 pour cent à 6,5 pour cent,
- *1,8-cinéole* : 10,0 pour cent à 30,5 pour cent,
- *thuyone* : au maximum 0,5 pour cent,
- *camphre* : 11,0 pour cent à 36,0 pour cent,
- *linalol* : 0,3 pour cent à 4,0 pour cent,
- *acétate de linalyle* : au maximum 5,0 pour cent,
- *terpinén-4-ol* : au maximum 2,0 pour cent,
- *acétate de sabinyle* : 0,5 pour cent à 9,0 pour cent,
- *acétate d'α-terpinyle* : 0,5 pour cent à 9,0 pour cent,
- *bornéol* : 1,0 pour cent à 7,0 pour cent,
- *limite d'exclusion* : la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,05 pour cent).

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

**01/2008:1370**

# SAUGE OFFICINALE (FEUILLE DE)

## Salviae officinalis folium

DÉFINITION

Feuilles séchées, entières ou fragmentées de *Salvia officinalis* L.

*Teneur* : au minimum 15 mL/kg d'huile essentielle pour la drogue entière et au minimum 10 mL/kg d'huile essentielle pour la drogue fragmentée (drogue anhydre).

CARACTÈRES

L'huile essentielle de feuille de sauge officinale est riche en thuyone.

IDENTIFICATION

A. Le limbe de la feuille de sauge officinale entière a une longueur d'environ 2 cm à 10 cm et une largeur d'environ 1 cm à 2 cm. Il est oblongue-ovale, elliptique. Le bord est finement crénelé à lisse, l'extrémité arrondie ou subaiguë et la base, rétrécie au niveau du pétiole, arrondie ou cordée. La face supérieure est gris-vert et finement granuleuse, la face inférieure est blanche, pubescente et présente un réseau dense de petites nervures proéminentes.

B. Réduisez la feuille de sauge officinale en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est gris clair à vert-brun. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente de très nombreux poils articulés et recourbés, constitués de cellules étroites et allongées et d'une cellule de base très épaisse, ainsi que des fragments de ces poils ; des fragments d'épiderme supérieur à cellules ponctuées, plus ou moins polygonales ; des fragments d'épiderme inférieur à cellules sinueuses et nombreux stomates diacytiques (*2.8.3*) ; quelques rares poils sécréteurs isolés à tête unicellulaire ou bicellulaire et à pédicelle composé de 1 à 4 cellules ; des poils glandulaires abondants à pédicelle unicellulaire et à tête composée de 8 cellules rayonnantes, avec une cuticule commune saillante.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Agitez 0,5 g de feuille de sauge officinale récemment pulvérisée (355) (*2.9.12*) dans 5 mL d'*éthanol R* pendant 5 min.

*Solution témoin*. Dissolvez 20 µL de *thuyone R* et 25 µL de *cinéole R* dans 20 mL d'*éthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 20 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution d'*acide phosphomolybdique R* à 200 g/L dans l'*éthanol R* et chauffez à 100-105 °C pendant 10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande bleue (près du front de solvant) |
| _______ | _______ |
| α-Thuyone et β-thuyone : 2 bandes violet-rose | 2 bandes violet-rose (α-thuyone et β-thuyone) |
| Cinéole : une bande bleue | Une bande bleue (cinéole) |
| _______ | _______ |
| | Bandes bleues |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3 pour cent de tiges et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Eau** (*2.2.13*) : au maximum 100 mL/kg, déterminé sur 20,0 g de feuille de sauge officinale.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez 20,0 g de feuille de sauge officinale, si nécessaire fragmentée juste avant la détermination, un ballon de 500 mL et 250 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Ajoutez 0,5 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 2 h.

**01/2008:1850**
**corrigé 7.0**

# SAUGE SCLARÉE (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Salviae sclareae aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau des tiges fleuries, fraîches ou séchées, de *Salvia sclarea* L.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide incolore ou jaune-brun, le plus souvent jaune pâle.

Odeur caractéristique.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 1 mL d'huile essentielle de sauge sclarée dans du *toluène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 60 µL de *linalol R*, 200 µL d'*acétate de linalyle R* et 60 µL d'*α-terpinéol R* dans du *toluène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*),

*Dépôt* : 5 µL de la solution à examiner et 10 µL de la solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez du *réactif à la vanilline R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min ; examinez à la lumière du jour dans les 5 min qui suivent.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes, de faible intensité, sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| α-Terpinéol : une bande violet sombre | Une bande violet sombre |
| _______ | _______ |
| Acétate de linalyle : une bande violet sombre | Une bande violet sombre |
| _______ | _______ |
| Linalol : une bande violet sombre | Une bande violet sombre |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente 5 pics semblables, quant à leur position, aux 5 pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Les 2 pics correspondants à l'α- et la β-thuyone peuvent être absents.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,890 à 0,908.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,456 à 1,466.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : – 26° à – 10°.

**Indice d'acide** (*2.5.1*) : au maximum 1,0.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. Huile essentielle de sauge sclarée.

*Solution témoin*. A 1 g d'*hexane R*, ajoutez 5 µL de *thuyone R*, 5 µL de *linalol R*, 100 µL d'*acétate de linalyle R*, 10 µL d'*α-terpinéol R* et 25 mg (± 20 pour cent) de *scIaréol R*. Mélangez soigneusement par agitation.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 30 m (une épaisseur de film de 1 µm peut-être utilisée) à 60 m (une épaisseur de film de 0,2 µm peut-être utilisée), Ø = 0,25-0,53 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R*.

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Rapport de division* : 1:100.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 10 | 60 |
| | 10 - 75 | 60 → 190 |
| | 75 - 120 | 190 |
| Chambre à injection | | 220 |
| Détecteur | | 240 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 0,2 μL.

*Ordre d'élution* : ordre indiqué pour la préparation de la solution témoin. Notez les temps de rétention de ces substances.

Conformité du système : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au linalol et à l'acétate de linalyle.

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les composants de la solution témoin (ne tenez pas compte du pic de l'hexane). La *thuyone R* est un mélange d'α- et de β-thuyone. L'α-thuyone élue avant la β-thuyone dans les conditions décrites.

Déterminez la teneur pour cent de chacun de ces constituants.

Déterminez également la teneur pour cent en germacrène-D. Le pic du germacrène-D est identifié dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner par sa rétention relative qui est de 1,23 par rapport au linalol dans les conditions opératoires décrites.

Ces teneurs sont comprises entre les valeurs suivantes :

– *α- et β-thuyone* : au maximum 0,2 pour cent,
– *linalol* : 6,5 pour cent à 24 pour cent,
– *acétate de linalyle* : 56 pour cent à 78 pour cent,
– *α-terpinéol* : au maximum 5,0 pour cent,
– *germacrène-D* : 1,0 pour cent à 12 pour cent,
– *scIaréol* : 0,4 pour cent à 2,6 pour cent.

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

**01/2008:1889**

# SAUGE (TEINTURE DE)

## Salviae tinctura

DÉFINITION

Teinture produite à partir de *Feuille de sauge officinale (1370)*.

*Teneur* : au minimum 0,1 pour cent *m/m* d'huile essentielle.

PRODUCTION

La teinture de sauge est produite à partir de 1 partie de drogue fragmentée et de 10 parties d'éthanol à 70 pour cent *V/V* par une méthode appropriée.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide brunâtre à odeur caractéristique.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Teinture de sauge.

*Solution témoin*. Dissolvez 20 μL de *thuyone R* et 25 μL de *cinéole R* dans 20 mL d'*éthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 20 μL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution d'*acide phosphomolybdique R* à 200 g/L dans l'*éthanol R* et chauffez à 100-105 °C pendant 10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| | Une bande bleue (près du front de solvant) |
| _______ | _______ |
| α-Thuyone et β-thuyone : 2 bandes violet-rose | 2 bandes violet-rose (α-thuyone et β-thuyone) |
| Cinéole : une bande bleue | Une bande bleue (cinéole) |
| _______ | _______ |
| | Bandes bleues |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Ethanol** (*2.9.10*) : 64 pour cent *V/V* à 69 pour cent *V/V*.

**Méthanol et 2-propanol** (*2.9.11*) : au maximum 0,05 pour cent *V/V* de méthanol et au maximum 0,05 pour cent de 2-propanol.

**Résidu sec** (*2.8.16*) : au minimum 2,0 pour cent *m/m*, déterminé sur 3,00 g.

DOSAGE

Dans un ballon à fond rond de 500 mL, versez 30,0 g de teinture de sauge et 100 mL d'*eau R*. A l'aide d'un appareil muni d'un réfrigérant descendant, distillez dans une ampoule à décantation préalablement marquée à 50 mL. Arrêtez la distillation dès que le distillat atteint la marque de 50 mL. Rincez le réfrigérant avec 10 mL de *pentane R*. Dissolvez du *chlorure de sodium R* à saturation dans le distillat et agitez-le avec 3 fois 20 mL de *pentane R*. Séchez les phases combinées de pentane, y compris le pentane utilisé pour le rinçage du réfrigérant, sur du *sulfate de sodium anhydre R* et filtrez sur du coton hydrophile dans un ballon à fond rond de 100 mL préalablement taré. Rincez le sulfate de sodium à plusieurs reprises avec de petites quantités de *pentane R*. Eliminez avec précaution le pentane à une température ne dépassant pas 40 °C. Séchez le résidu dans un dessiccateur sur du *pentoxyde de diphosphore R* et de la paraffine solide à pression atmosphérique et à température ambiante pendant 2 h. Pesez le résidu (huile essentielle).

**01/2008:1561**

# SAUGE TRILOBÉE (FEUILLE DE)

## Salviae trilobae folium

DÉFINITION

Feuille séchée, entière ou fragmentée, de *Salvia fructicosa* Mill. (*S. triloba* L. fil).

*Teneur* : au minimum 18 mL/kg d'huile essentielle dans la drogue entière (drogue anhydre) et au minimum 12 mL/kg d'huile essentielle dans la drogue fragmentée (drogue anhydre).

CARACTÈRES

Odeur épicée rappelant celle de l'huile d'eucalyptus, lorsque la feuille de sauge trilobée est broyée.

IDENTIFICATION

A. Le limbe de la feuille de sauge trilobée entière a une longueur d'environ 8-50 mm et une largeur d'environ 4-20 mm. Sa forme est oblongue-ovale ou lancéolée. Le bord est finement crénelé et ondulé, mais indistinct en raison

de la forte pubescence des 2 faces. La base est obtuse et présente parfois 1 ou 2 lobes plus ou moins développés. Les 2 faces sont tomenteuses, avec une pubescence grise sur la face supérieure et une forte pubescence blanche sur la face inférieure. La nervation est indistincte. Le pétiole tomenteux, à forte pubescence blanche, a un diamètre d'environ 1 mm.

B. Réduisez la feuille de sauge trilobée en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-gris et tomenteuse. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : de très nombreux poils tecteurs ou glanduleux, entiers ou fragmentés, disséminés et fixés à des fragments de l'épiderme. Les poils tecteurs sont articulés, unisériés, à paroi épaisse et pointe émoussée ; ceux de l'épiderme supérieur sont droits, ceux de l'épiderme inférieur sont tortueux, plus longs et plus denses. Certains des poils glanduleux comportent une tête unicellulaire ou bicellulaire et un pédicelle composé de 1-4 cellules, mais la majorité possède un court pédicelle unicellulaire et une tête constituée de 8 cellules rayonnantes à cuticule commune saillante. L'épiderme supérieur présente des cellules ponctuées à épaississement en chapelet, plus ou moins polygonales, avec quelques stomates de type diacytique (*2.8.3*) ; l'épiderme inférieur présente des cellules à paroi sinueuse ou onduleuse et de nombreux stomates de type diacytique.

C. Examinez le chromatogramme obtenu dans l'essai de la thuyone.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande bleue due au cinéole, de dimensions et d'intensité au moins égales à celle de la bande du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. D'autres bandes sont présentes.

ESSAI

**Thuyone**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Agitez 0,3 g de drogue fraîchement pulvérisée (355) (*2.9.12*) avec 5,0 mL d'*éthanol anhydre R* pendant 5 min.

*Solution témoin.* Dissolvez 20 µL de *thuyone R* et 25 µL de *cinéole R* dans 20 mL d'*éthanol anhydre R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 20 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution d'*acide phosphomolybdique R* à 200 g/L dans de l'*éthanol anhydre R* et chauffez à 100-105 °C pendant 10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente une bande bleue (cinéole) dans sa partie médiane et une bande bleu-rose (thuyone) dans sa partie supérieure. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas, ou seulement très faiblement, de bande bleu-rose due à la thuyone.

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 8 pour cent de tiges et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Eau** (*2.2.13*) : au maximum 100 mL/kg, déterminé sur 20,0 g de feuille de sauge trilobée.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez 20,0 g de drogue, si nécessaire fragmentée juste avant la détermination, un ballon de 500 mL et 250 mL *d'eau R* comme liquide d'entraînement. Ajoutez 0,50 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 2 h.

**07/2010:1583**

# SAULE (ÉCORCE DE)

## Salicis cortex

DÉFINITION

Ecorce séchée entière ou fragmentée des jeunes rameaux, ou morceaux entiers séchés des ramules de l'année de diverses espèces du genre *Salix* dont *S. purpurea* L., *S. daphnoides* Vill. et *S. fragilis* L.

*Teneur* : au minimum 1,5 pour cent de dérivés salicylés totaux, exprimés en salicine ($C_{13}H_{18}O_7$ ; $M_r$ 286,3) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. L'écorce de saule se présente sous la forme de pièces flexibles, allongées, tuyautées ou courbées, d'une épaisseur de 1-2 mm. La face externe, jaune-vert ou gris-brun, est lisse ou légèrement ridée longitudinalement. La face interne est lisse ou finement striée longitudinalement et, selon les espèces, blanche, jaune pâle ou brun-rouge. La cassure est courte dans la partie externe et grossièrement fibreuse à l'intérieur. Le diamètre des ramules de l'année n'est pas supérieur à 10 mm. Le bois est blanc ou jaune pâle.

B. Réduisez l'écorce de saule en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune pâle, jaune-vert ou brun clair. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des faisceaux de fibres étroites à paroi très épaisse, d'une longueur pouvant atteindre 600 µm, entourées de files de cellules cristallifères contenant des prismes d'oxalate de calcium ; des cellules parenchymateuses de l'écorce, à paroi épaissie et ponctuée en chapelet bien marqué, contenant de grandes macles d'oxalate de calcium ; des rayons médullaires unisériés ; des cellules de suber épaissies. Des fragments de collenchyme brunâtre provenant des bourgeons peuvent également être présents. Les ramules présentent en outre des fragments de fibres et de vaisseaux lignifiés.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner (a).* A 1,0 g d'écorce de saule pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Chauffez dans un bain-marie à environ 50 °C pendant 10 min, en agitant fréquemment. Refroidissez et filtrez.

*Solution à examiner (b).* A 5,0 mL de solution à examiner (a), ajoutez 1,0 mL d'une solution de *carbonate de sodium anhydre R* à 50 g/L. Chauffez dans un bain-marie à environ 60 °C pendant 10 min. Refroidissez et filtrez si nécessaire.

*Solution témoin.* Dissolvez 2 mg de *salicine R* et 2 mg d'*acide chlorogénique R* dans 1,0 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R, acétate d'éthyle R* (8:15:77 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 2 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : dans un courant d'air chaud.

*Détection* : pulvérisez un mélange de 5 volumes d'*acide sulfurique R* et de 95 volumes de *méthanol R*. Chauffez à 100-105 °C pendant 5 min et examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et les solutions à examiner (a) et (b). Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans les chromatogrammes obtenus avec les solutions à examiner (a) et (b).

| Haut de la plaque | | |
|---|---|---|
| _______ | | _______ |
| | Plusieurs bandes violet-rouge peuvent être présentes | |
| Salicine : une bande violet-rouge | Une faible bande violet-rouge (salicine) | Une bande violet-rouge (salicine) |
| _______ | | _______ |
| Acide chlorogénique : une bande brune | | |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner (a)** | **Solution à examiner (b)** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3 pour cent de ramules d'un diamètre supérieur à 10 mm et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Cadmium** (*2.4.27*) : au maximum 2,0 ppm.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 11 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* A 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*) à examiner, ajoutez 40 mL de *méthanol R* et 40,0 mL d'une solution d'*hydroxyde de sodium R* à 4,2 g/L. Chauffez à reflux dans un bain-marie à environ 60 °C, en agitant fréquemment, pendant environ 1 h. Après refroidissement, ajoutez 4,0 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 103,0 g/L. Filtrez la suspension en recueillant le filtrat dans une fiole jaugée de 100 mL, lavez et complétez à 100,0 mL avec un mélange de 50 volumes de *méthanol R* et de 50 volumes d'*eau R*. Filtrez sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm).

*Solution témoin.* Dissolvez 5,0 mg de *picéine R* dans 25,0 mL d'un mélange de 20 volumes d'*eau R* et de 80 volumes de *méthanol R* (solution A). Dissolvez 15,0 mg de *salicine SCR* dans 25 mL d'un mélange de 20 volumes d'*eau R* et de 80 volumes de *méthanol R* ; ajoutez 5,0 mL de solution A puis complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R*.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,10 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (3 µm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *tétrahydrofurane R*, solution d'*acide phosphorique R* à 0,5 pour cent *V/V* (1,8:98,2 *V/V*),
– *phase mobile B* : *tétrahydrofurane R*,

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 15 | 100 | 0 |
| 15 - 17 | 100 → 90 | 0 → 10 |
| 17 - 23 | 90 | 10 |
| 23 - 25 | 90 → 100 | 10 → 0 |
| 25 - 40 | 100 | 0 |

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 270 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Temps de rétention* : salicine = environ 6,4 min ; picéine = environ 7,7 min.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus à la salicine et à la picéine.

Calculez la teneur pour cent en dérivés salicylés totaux, exprimés en salicine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 2}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à la salicine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à la salicine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse de *salicine SCR* utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en salicine de la *salicine SCR*.

**04/2008:2312**

# SAULE (ÉCORCE DE), EXTRAIT SEC D'

## Salicis corticis extractum siccum

DÉFINITION

Extrait sec produit à partir d'*Ecorce de saule (1583)*.

*Teneur* : au minimum 5,0 pour cent de dérivés salicylés totaux, exprimés en salicine ($C_{13}H_{18}O_7$ ; $M_r$ 286,3) (extrait desséché).

PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale par une méthode appropriée, avec de l'eau ou un solvant hydroalcoolique au maximum équivalent en concentration à l'éthanol à 80 pour cent *V/V*.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre amorphe brun-jaune.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner (a).* A 0,200 g d'extrait à examiner, ajoutez 5 mL de *méthanol R*. Traitez aux ultrasons pendant 5 min, filtrez et complétez à 10 mL avec du *méthanol R*.

*Solution à examiner (b).* A 5,0 mL de solution à examiner (a), ajoutez 1,0 mL d'une solution de *carbonate de sodium anhydre R* à 50 g/L. Chauffez dans un bain-marie à environ 60 °C pendant 10 min. Refroidissez et filtrez si nécessaire.

*Solution témoin.* Dissolvez 2,0 mg de *salicine R* et 2,0 mg d'*acide chlorogénique R* dans 1,0 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *eau R, méthanol R, acétate d'éthyle R* (8:15:77 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 2 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : dans un courant d'air chaud.

*Détection* : pulvérisez un mélange de 5 volumes d'*acide sulfurique R* et de 95 volumes de *méthanol R*. Chauffez à 100-105 °C pendant 5 min et examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et les solutions à examiner (a) et (b). Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec les solutions à examiner (a) et (b).

| Haut de la plaque | | |
|---|---|---|
| _______ | | _______ |
| | Plusieurs bandes violet-rouge peuvent être présentes | |
| Salicine : une bande violet-rouge | Une faible bande violet-rouge (salicine) | Une bande violet-rouge (salicine) |
| _______ | | _______ |
| Acide chlorogénique : une bande brune | | |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner (a)** | **Solution à examiner (b)** |

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* A 0,300 g d'extrait à examiner, ajoutez 40 mL de *méthanol R* et 40,0 mL d'*hydroxyde de sodium 0,1 M*. Chauffez à reflux dans un bain-marie à environ 60 °C, en agitant fréquemment, pendant environ 1 h. Après refroidissement, ajoutez 4,0 mL d'*acide chlorhydrique 1 M*. Filtrez la suspension en recueillant le filtrat dans une fiole jaugée de 100 mL, lavez et complétez à 100,0 mL avec un mélange à volumes égaux d'*eau R* et de *méthanol R*. Filtrez sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm).

*Solution témoin.* Dissolvez 5,0 mg de *picéine R* dans 25,0 mL d'un mélange de 20 volumes d'*eau R* et de 80 volumes de *méthanol R* (solution A). Dissolvez 15,0 mg de *salicine SCR* dans 25 mL d'un mélange de 20 volumes d'*eau R* et de 80 volumes de *méthanol R*. Ajoutez 5,0 mL de solution A et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R*.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,10 m, Ø = 4,6 mm,

– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (3 µm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *tétrahydrofurane R*, solution d'*acide phosphorique R* à 0,5 pour cent *V/V* (1,8:98,2 *V/V*),

– *phase mobile B* : *tétrahydrofurane R*,

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 15 | 100 | 0 |
| 15 - 17 | 100 → 90 | 0 → 10 |
| 17 - 23 | 90 | 10 |
| 23 - 25 | 90 → 100 | 10 → 0 |
| 25 - 40 | 100 | 0 |

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 270 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Temps de rétention* : salicine = environ 6,4 min ; picéine = environ 7,7 min.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus à la salicine et à la picéine.

Calculez la teneur pour cent en dérivés salicylés totaux, exprimés en salicine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 2}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à la salicine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à la salicine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse de *salicine SCR* utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en salicine de la *salicine SCR*.

**01/2009:2428**

# SCHISANDRA DE CHINE (FRUIT DE)

## Schisandrae chinensis fructus

DÉFINITION

Fruit mûr, entier, séché ou soumis à la vapeur d'eau puis séché, de *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.

*Teneur* : au minimum 0,40 pour cent de schisandrine ($C_{24}H_{32}O_7$ ; $M_r$ 432,5) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Baie plus ou moins sphérique, d'un diamètre pouvant atteindre 8 mm ; surface externe rouge, brun-rouge ou noirâtre, parfois recouverte d'une pruine blanchâtre ; péricarpe fortement fripé ; présence de 1-2 graines, réniformes, brun-jaune, luisantes, à enveloppe fine.

B. Réduisez le fruit de schisandra de Chine en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-rouge. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments du péricarpe, brun-rouge, constitués d'une assise de cellules épicarpiques, aux parois fines, accompagnées de cellules à huile essentielle éparses et de plusieurs assises de cellules du mésocarpe, ovoïdes, plus ou moins écrasées ; des fragments du tégument externe de la graine composé de cellules scléreuses, aux parois épaisses et finement canaliculées, polygonales vues de face (15-50 µm de diamètre), et en palissade vues de profil ; des fragments du tégument interne à cellules scléreuses, isolées ou groupées en petits amas, d'environ 80 µm de diamètre, aux parois peu épaissies et nettement canaliculées ; des fragments d'albumen à cellules polyédriques contenant des gouttelettes d'huile et de grains d'aleurone. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V* : la poudre présente des cellules parenchymateuses du mésocarpe contenant de nombreux petits grains d'amidon arrondis.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai *Schisandra sphenanthera*.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes d'atténuation de fluorescence présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes d'atténuation de fluorescence, de faible intensité, peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Drogues végétales

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| γ-Schisandrine : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence (γ-schisandrine) |
| _______ | _______ |
| | Une faible bande d'atténuation de fluorescence |
| _______ | _______ |
| Schisandrine : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence (schisandrine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| γ-Schisandrine : une bande brune | Une bande brune (γ-schisandrine) |
| _______ | _______ |
| _______ | _______ |
| Schisandrine : une bande vert-brun intense | Une bande vert-brun intense (schisandrine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

***Schisandra sphenanthera***. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Pesez 2,5 g de fruit de schisandra de Chine pulvérisé (355) (*2.9.12*) et ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Extrayez dans un bain à ultrasons à 25 °C pendant 5 min et centrifugez.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *schisandrine R* et 5 mg de *γ-schisandrine R* dans 5 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (5-40 μm) [ou *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R* (2-10 μm)].

*Phase mobile* : *acide acétique R, acétate d'éthyle R, toluène R* (2:22:46 *V/V/V*).

*Dépôt* : 5 μL [ou 2 μL] en bandes de 10 mm [ou 6 mm].

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 7 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Détection B* : pulvérisez une solution d'*acide sulfurique R* à 100 g/L dans du *méthanol R* et chauffez à l'étuve à 120 °C pendant 7 min ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats B* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande due à la schisandrine et une bande due à la γ-schisandrine. Le chromatogramme ne présente pas de bande rose-violet intense dans le tiers médian.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 6,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Pesez 1,250 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*) dans une fiole conique de 250 mL. Ajoutez 90 mL de *méthanol R* puis traitez aux ultrasons pendant 30 min. Filtrez la solution obtenue dans une fiole jaugée, ajoutez 10 mL de *méthanol R* en rinçant le filtre et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 5,0 mg de *schisandrine R* dans du *méthanol R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie R*,
– *température* : 25 °C.

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *eau R, méthanol R* (35:65 *V/V*),
– *phase mobile B* : *méthanol R*,

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 10 | 100 | 0 |
| 10 - 16 | 100 → 58 | 0 → 42 |
| 16 - 26 | 58 | 42 |

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 250 nm.

*Injection* : 10 μL.

*Temps de rétention* : schisandrine = environ 8 min.

*Conformité du système* :

– *nombre de plateaux théoriques* : au minimum 5000, calculé pour le pic dû à la schisandrine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

Calculez la teneur pour cent en schisandrine à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à la schisandrine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à la schisandrine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de drogue à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse de *schisandrine R* utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en schisandrine dans la *schisandrine R*.

**01/2008:0207**
**corrigé 6.0**

# SÉNÉ DE KHARTOUM OU D'ALEXANDRIE (FRUIT DE)

## Sennae fructus acutifoliae

DÉFINITION

Fruit séché de *Cassia senna* L. (*C. acutifolia* Delile).

*Teneur* : minimum 3,4 pour cent d'hétérosides hydroxyanthracéniques, exprimés en sennoside B ($C_{42}H_{38}O_{20}$ ; $M_r$ 863) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Odeur faible.

IDENTIFICATION

A. Le fruit est constitué par des gousses aplaties, réniformes, vertes ou brun-vert avec des zones brunes aux emplacements correspondant aux graines, généralement d'une longueur de 40-50 mm et d'une largeur d'au minimum 20 mm. Une des extrémités se termine en pointe stylaire, l'autre en court pédoncule. Les gousses renferment 6-7 graines aplaties, obovées, vertes ou brun clair. Le tégument présente un réseau de rides proéminentes.

B. Réduisez la drogue à examiner en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : l'épicarpe à cellules polygonales, occasionnellement à stomates de type anomocytique ou paracytique (*2.8.3*), de rares poils coniques verruqueux, des fibres, entrecroisées sur 2 plans, accompagnées d'une assise de cellules contenant des prismes d'oxalate de calcium, des cellules palissadiques caractéristiques de la graine et des cellules stratifiées de l'albumen, des macles et des prismes d'oxalate de calcium.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Chauffez à ébullition 0,5 g de drogue pulvérisée (180) (*2.9.12*) avec 5 mL d'un mélange à volumes égaux d'*éthanol à 96 pour cent R* et d'*eau R*. Centrifugez. Utilisez le surnageant.

*Solution témoin.* Dissolvez 10 mg d'*extrait de séné SCR* dans 1 mL d'un mélange à volumes égaux d'*éthanol à 96 pour cent R* et d'*eau R* (il persiste un faible résidu).

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, eau R, acétate d'éthyle R, propanol R* (1:30:40:40 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes de 20 mm sur 2 mm.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution d'*acide nitrique R* à 20 pour cent *V/V* et chauffez à 120 °C pendant 10 min. Laissez refroidir. Pulvérisez une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 50 g/L dans l'*éthanol à 50 pour cent V/V R* jusqu'à apparition des bandes.

*Résultats* : les bandes principales du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur position (sennosides B, A, D et C par ordre croissant de $R_F$), leur coloration et leurs dimensions aux bandes principales du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Entre les bandes dues aux sennosides D et C, une bande rouge due au rhéine-8-glucoside peut être visible. Les bandes dues aux sennosides D et C sont peu visibles dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

D. Dans une fiole conique, introduisez environ 25 mg de drogue pulvérisée (180) (*2.9.12*), puis ajoutez 50 mL d'*eau R* et 2 mL d'*acide chlorhydrique R*. Chauffez dans un bain-marie pendant 15 min. Refroidissez et agitez avec 40 mL d'*éther R*. Séparez la phase éthérée, séchez-la sur du *sulfate de sodium anhydre R*, puis évaporez-en 5 mL à siccité. Au résidu refroidi, ajoutez 5 mL d'*ammoniaque diluée R1*. Il se développe une coloration jaune ou orangée. Chauffez au bain-marie pendant 2 min. Il se développe une coloration violet-rouge.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 1 pour cent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 9,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 2,0 pour cent.

DOSAGE

*Effectuez le dosage à l'abri d'une lumière vive.*

Dans un ballon de 100 mL, introduisez 0,150 g de drogue pulvérisée (180) (*2.9.12*). Ajoutez 30,0 mL d'*eau R*, mélangez et pesez. Placez le ballon dans un bain-marie et chauffez à reflux pendant 15 min. Laissez refroidir, pesez et rétablissez la masse avec de l'*eau R*. Centrifugez. Dans une ampoule à décantation de 150 mL, introduisez 20,0 mL du surnageant et ajoutez 0,1 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*. Agitez avec 3 fois 15 mL de *chloroforme R*. Laissez décanter et éliminez la phase chloroformique. Ajoutez 0,10 g de *bicarbonate de sodium R* et agitez pendant 3 min. Centrifugez et introduisez 10,0 mL du surnageant dans un ballon de 100 mL à fond rond et à col rodé. Ajoutez 20 mL de *solution de chlorure ferrique R1* et mélangez. Placez le ballon dans un bain-marie de façon à ce que le niveau de l'eau soit au-dessus de celui du liquide dans le ballon et chauffez à reflux pendant 20 min. Ajoutez 1 mL d'*acide chlorhydrique R*, prolongez le chauffage pendant 20 min en agitant fréquemment jusqu'à dissolution du précipité et refroidissez. Dans une ampoule à décantation, introduisez le mélange. Agitez avec 3 fois 25 mL d'*éther R* utilisé au préalable pour rincer le ballon. Réunissez les 3 phases éthérées et lavez avec 2 fois 15 mL d'*eau R*. Dans un ballon jaugé, introduisez la phase éthérée et complétez à 100,0 mL avec de l'*éther R*. Evaporez soigneusement à siccité 10,0 mL de solution éthérée et dissolvez le résidu dans 10,0 mL d'une solution d'*acétate de magnésium R* à 5 g/L dans du *méthanol R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 515 nm en utilisant du *méthanol R* comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en hétérosides hydroxyanthracéniques, exprimés en sennoside B, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

en prenant 240 comme valeur de l'absorbance spécifique du sennoside B.

$A$ = absorbance à 515 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

CONSERVATION

A l'abri de l'humidité.

**01/2008:0208**
**corrigé 6.0**

# SÉNÉ DE L'INDE OU DE TINNEVELLY (FRUIT DE)

## Sennae fructus angustifoliae

DÉFINITION

Fruit séché de *Cassia angustifolia* Vahl.

*Teneur* : au minimum 2,2 pour cent d'hétérosides hydroxyanthracéniques, exprimés en sennoside B ($C_{42}H_{38}O_{20}$ ; $M_r$ 863) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Odeur faible.

IDENTIFICATION

A. Le fruit est constitué par des gousses aplaties, légèrement réniformes, brun-jaune ou brunes avec des zones brun foncé aux emplacements correspondant aux graines, généralement d'une longueur de 35-60 mm et d'une largeur de 14-18 mm. Une des extrémités se termine en pointe stylaire, l'autre en court pédoncule. Les gousses renferment 5-8 graines aplaties, obovées, vertes ou brun clair. Le tégument présente un réseau discontinu de rides transversales et sinueuses.

B. Réduisez la drogue à examiner en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : l'épicarpe à cellules polygonales, occasionnellement à stomates du type anomocytique ou paracytique (*2.8.3*), de rares poils coniques verruqueux, des fibres, entrecroisées sur 2 plans, accompagnées d'une assise de cellules contenant des prismes d'oxalate de calcium, des cellules palissadiques caractéristiques de la graine et des cellules stratifiées de l'albumen, des macles et des prismes d'oxalate de calcium.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Chauffez à ébullition 0,5 g de drogue pulvérisée (180) (*2.9.12*) avec 5 mL d'un mélange à volumes égaux d'*éthanol à 96 pour cent R* et d'*eau R*. Centrifugez. Utilisez le surnageant.

*Solution témoin.* Dissolvez 10 mg d'*extrait de séné SCR* dans 1 mL d'un mélange à volumes égaux d'*éthanol à 96 pour cent R* et d'*eau R* (il persiste un faible résidu).

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, eau R, acétate d'éthyle R, propanol R* (1:30:40:40 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 μL, en bandes de 20 mm sur 2 mm.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution d'*acide nitrique R* à 20 pour cent *V/V* et chauffez à 120 °C pendant 10 min. Laissez refroidir. Pulvérisez une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 50 g/L dans l'*éthanol à 50 pour cent V/V R* jusqu'à apparition des bandes.

*Résultats* : les bandes principales du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur position (sennosides B, A, D et C par ordre croissant de $R_F$), leur coloration et leurs dimensions aux bandes principales du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Entre les bandes dues aux sennosides D et C, une bande rouge due au rhéine-8-glucoside peut être visible. Les bandes dues aux sennosides D et C sont peu visibles dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

D. Dans une fiole conique, introduisez environ 25 mg de drogue pulvérisée (180) (*2.9.12*), puis ajoutez 50 mL d'*eau R* et 2 mL d'*acide chlorhydrique R*. Chauffez dans un bain-marie pendant 15 min. Refroidissez et agitez avec 40 mL d'*éther R*. Séparez la phase éthérée, séchez-la sur du *sulfate de sodium anhydre R*, puis évaporez-en 5 mL à siccité. Au résidu refroidi, ajoutez 5 mL d'*ammoniaque diluée R1*. Il se développe une coloration jaune ou orangée. Chauffez au bain-marie pendant 2 min. Il se développe une coloration violet-rouge.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 1 pour cent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 9,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 2,0 pour cent.

DOSAGE

*Effectuez le dosage à l'abri d'une lumière vive.*

Dans un ballon de 100 mL, introduisez 0,150 g de drogue pulvérisée (180) (*2.9.12*). Ajoutez 30,0 mL d'*eau R*, mélangez et pesez. Placez le ballon dans un bain-marie et chauffez à reflux pendant 15 min. Laissez refroidir, pesez et rétablissez la masse avec de l'*eau R*. Centrifugez. Dans une ampoule à décantation de 150 mL, introduisez 20,0 mL du surnageant et ajoutez 0,1 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*. Agitez avec 3 fois 15 mL de *chloroforme R*. Laissez décanter et éliminez la phase chloroformique. Ajoutez 0,10 g de *bicarbonate de sodium R* et agitez pendant 3 min. Centrifugez et introduisez 10,0 mL du surnageant dans un ballon de 100 mL à fond rond et à col rodé. Ajoutez 20 mL de *solution de chlorure ferrique R1* et mélangez. Placez le ballon dans un bain-marie de façon que le niveau de l'eau soit au-dessus de celui du liquide dans le ballon et chauffez à reflux pendant 20 min. Ajoutez 1 mL d'*acide chlorhydrique R*, prolongez le chauffage pendant 20 min en agitant fréquemment jusqu'à dissolution du précipité et refroidissez. Dans une ampoule à décantation, introduisez le mélange. Agitez avec 3 fois 25 mL d'*éther R* utilisé au préalable pour rincer le ballon. Réunissez les 3 phases éthérées et lavez avec 2 fois 15 mL d'*eau R*. Dans un ballon jaugé, introduisez la phase éthérée et complétez à 100,0 mL avec de l'*éther R*. Evaporez soigneusement à siccité 10,0 mL de solution éthérée et dissolvez le résidu dans 10,0 mL d'une solution d'*acétate de magnésium R* à 5 g/L dans du *méthanol R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 515 nm en utilisant du *méthanol R* comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en hétérosides hydroxyanthracéniques, exprimés en sennoside B, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

en prenant 240 comme valeur de l'absorbance spécifique du sennoside B.

$A$ = absorbance à 515 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

CONSERVATION

A l'abri de l'humidité.

**01/2008:0206**
**corrigé 6.0**

# SÉNÉ (FEUILLE DE)

## Sennae folium

DÉFINITION

Folioles séchées de *Cassia senna* L. (*C. acutifolia* Delile), connu sous le nom de séné d'Alexandrie ou de Khartoum ou de *Cassia angustifolia* Vahl, connu sous le nom de séné de l'Inde ou de Tinnevelly, ou mélange des 2 espèces.

*Teneur* : au minimum 2,5 pour cent d'hétérosides hydroxyanthracéniques, exprimés en sennoside B ($C_{42}H_{38}O_{20}$ ; $M_r$ 863) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Odeur faible mais caractéristique.

IDENTIFICATION

A. *C. senna.* Les folioles vert-gris ou vert-brun sont minces, fragiles, lancéolées, mucronées, asymétriques à la base, généralement d'une longueur de 15-40 mm et d'une largeur de 5-15 mm, la plus grande largeur étant située un peu plus bas que le milieu. Le limbe légèrement ondulé présente 2 faces finement pubescentes portant des poils fins et courts et une nervation pennée, visible surtout à la face abaxiale. Les nervures latérales, faisant avec la médiane un angle d'environ 60°, sont anastomosées en une nervure marginale.

*Indice stomatique* (*2.8.3*) : 10-12,5-15.

*C. angustifolia.* Les folioles vert-jaune ou vert-brun sont lancéolées, allongées, légèrement asymétriques à la base, généralement d'une longueur de 20-50 mm et d'une largeur de 7-20 mm dans leur partie médiane. Les 2 faces lisses sont fréquemment marquées par des lignes transversales ou obliques et portent un petit nombre de poils courts.

*Indice stomatique* (*2.8.3*) : 14-17,5-20.

B. Réduisez la feuille de séné en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert clair ou jaune-vert. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des cellules épidermiques polygonales à stomates de type paracytique (*2.8.3*), des poils unicellulaires, coniques, à paroi verruqueuse, isolés ou fixés sur des fragments d'épiderme, des fibres accompagnées de cristaux prismatiques d'oxalate de calcium disposés en file, des macles isolées ou localisées dans les fragments de parenchyme.

Drogues végétales

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Chauffez à ébullition 0,5 g de feuille de séné pulvérisée (180) (*2.9.12*) avec 5 mL d'un mélange à volumes égaux d'*éthanol à 96 pour cent R* et d'*eau R*. Centrifugez. Utilisez le surnageant.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg d'*extrait de séné SCR* dans 1 mL d'un mélange à volumes égaux d'*éthanol à 96 pour cent R* et d'*eau R* (il persiste un faible résidu).

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, eau R, acétate d'éthyle R, propanol R* (1:30:40:40 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes de 20 mm sur 2 mm.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution d'*acide nitrique R* à 20 pour cent *V/V* et chauffez à 120 °C pendant 10 min. Laissez refroidir. Pulvérisez une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 50 g/L dans l'*éthanol à 50 pour cent V/V R* jusqu'à apparition des bandes.

*Résultats* : les bandes principales du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables, quant à leur position (sennosides B, A, D et C par ordre croissant de $R_F$), leur coloration et leurs dimensions aux bandes principales du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Entre les bandes dues aux sennosides D et C, une bande rouge due au rhéine-8-glucoside peut être visible.

D. Dans une fiole conique, introduisez environ 25 mg de feuille de séné pulvérisée (180) (*2.9.12*), puis ajoutez 50 mL d'*eau R* et 2 mL d'*acide chlorhydrique R*. Chauffez dans un bain-marie pendant 15 min. Refroidissez et agitez avec 40 mL d'*éther R*. Séparez la phase éthérée, séchez-la sur du *sulfate de sodium anhydre R*, puis évaporez-en 5 mL à siccité. Au résidu refroidi, ajoutez 5 mL d'*ammoniaque diluée R1*. Il se développe une coloration jaune ou orangée. Chauffez au bain-marie pendant 2 min. Il se développe une coloration violet-rouge.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3 pour cent de parties étrangères et au maximum 1 pour cent de matières étrangères.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 12,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 2,5 pour cent.

DOSAGE

*Effectuez le dosage à l'abri d'une lumière vive.*

Dans un ballon de 100 mL, introduisez 0,150 g de feuille de séné pulvérisée (180) (*2.9.12*). Ajoutez 30,0 mL d'*eau R*, mélangez et pesez. Placez le ballon dans un bain-marie et chauffez à reflux pendant 15 min. Laissez refroidir, pesez et rétablissez la masse avec de l'*eau R*. Centrifugez. Dans une ampoule à décantation de 150 mL, introduisez 20,0 mL du liquide surnageant et ajoutez 0,1 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*. Agitez avec 3 fois 15 mL de *chloroforme R*. Laissez décanter et éliminez la phase chloroformique. Ajoutez 0,10 g de *bicarbonate de sodium R* et agitez pendant 3 min. Centrifugez et introduisez 10,0 mL du surnageant dans un ballon de 100 mL à fond rond et à col rodé. Ajoutez 20 mL de *solution de chlorure ferrique R1* et mélangez. Placez le ballon dans un bain-marie de façon à ce que le niveau de l'eau soit au-dessus de celui du liquide dans le ballon et chauffez à reflux pendant 20 min. Ajoutez 1 mL d'*acide chlorhydrique R*, prolongez le chauffage pendant 20 min en agitant fréquemment jusqu'à dissolution du précipité et refroidissez. Dans une ampoule à décantation, introduisez le mélange. Agitez avec 3 fois 25 mL d'*éther R* utilisé au préalable pour rincer le ballon. Réunissez les 3 phases éthérées et lavez avec 2 fois 15 mL d'*eau R*. Dans un ballon jaugé, introduisez la phase éthérée et complétez à 100,0 mL avec de l'*éther R*. Evaporez soigneusement à siccité 10,0 mL de solution éthérée et dissolvez le résidu dans 10,0 mL d'une solution d'*acétate de magnésium R* à 5 g/L dans du *méthanol R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 515 nm en utilisant du *méthanol R* comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en hétérosides hydroxyanthracéniques, exprimés en sennoside B, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

en prenant 240 comme valeur de l'absorbance spécifique du sennoside B.

$A$ = absorbance à 515 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

CONSERVATION

A l'abri de l'humidité.

**01/2009:1261**

# SÉNÉ (FEUILLE DE), EXTRAIT SEC TITRÉ DE

## Sennae folii extractum siccum normatum

[8055-96-7]

DÉFINITION

Extrait sec titré produit à partir de *Feuille de séné (0206)*.

*Teneur* : 5,5 pour cent à 8,0 pour cent d'hétérosides hydroxyanthracéniques, exprimés en sennoside B ($C_{42}H_{38}O_{20}$ ; $M_r$ 863) (extrait desséché). La teneur mesurée ne s'écarte pas de plus de 10 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec de l'éthanol à 50-80 pour cent *V/V*.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre brunâtre ou brune.

IDENTIFICATION

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Mélange de solvants* : *éthanol à 96 pour cent R, eau R* (50:50 *V/V*).

*Solution à examiner*. A 0,1 g d'extrait à examiner, ajoutez 5 mL du mélange de solvants et portez à ébullition. Refroidissez et centrifugez. Utilisez le surnageant.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg d'*extrait de séné SCR* dans 1 mL du mélange de solvants (il subsiste un léger résidu).

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, eau R, acétate d'éthyle R, 1-propanol R* (1:30:40:40 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution d'*acide nitrique R* à 20 pour cent *V/V*, puis chauffez à 120 °C pendant 10 min ; laissez refroidir et pulvérisez une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 50 g/L dans de l'*éthanol à 50 pour cent V/V R* jusqu'à apparition des bandes.

*Résultats* : les bandes principales du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur position, leur coloration et leurs dimensions aux bandes principales du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Les chromatogrammes présentent dans leur tiers inférieur une bande brune marquée due au sennoside B

et, au-dessus, une bande jaune suivie d'une autre bande brune marquée due au sennoside A. Ils présentent en outre dans leur moitié supérieure, par ordre de $R_F$ croissant, une bande brun-rouge prononcée et une bande brun orangé, puis une faible bande rose et 2 bandes jaunes. Près du front du solvant apparaît une bande rose foncé, qui peut être suivie de plusieurs bandes faiblement colorées.

B. Placez environ 25 mg d'extrait à examiner dans une fiole conique et ajoutez 50 mL d'*eau R* et 2 mL d'*acide chlorhydrique R*. Chauffez dans un bain-marie pendant 15 min, refroidissez et agitez avec 40 mL d'*éther R*. Séparez la phase éthérée, séchez-la sur du *sulfate de sodium anhydre R*, puis prélevez-en 5 mL et évaporez à siccité. Au résidu refroidi, ajoutez 5 mL d'*ammoniaque diluée R1*. Il se développe une coloration jaune ou orangée. Chauffez au bain-marie pendant 2 min. Il se développe une coloration violet-rouge.

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.8.17*) : au maximum 5,0 pour cent.

**Contamination microbienne**

DGAT : critère d'acceptation $10^4$ UFC/g (*2.6.12*).

DMLT : critère d'acceptation $10^2$ UFC/g (*2.6.12*).

Absence d'*Escherichia coli* (*2.6.13*).

Absence de salmonelles (*2.6.13*).

DOSAGE

*Effectuez le dosage à l'abri d'une lumière vive.*

Dans un ballon de 100 mL, introduisez 0,150 g d'extrait à examiner, dispersez dans de l'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Filtrez la solution et jetez les 10 premiers millilitres de filtrat. Transvasez 20,0 mL de filtrat dans une ampoule à décantation de 150 mL. Ajoutez 0,1 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*, puis agitez avec 3 fois 15 mL d'*éther R*. Laissez les phases se séparer et jetez la phase éthérée. Ajoutez 0,10 g de *bicarbonate de sodium R* à la phase aqueuse et agitez pendant 3 min. Centrifugez et transvasez 10,0 mL du surnageant dans un ballon à fond rond et à col rodé de 100 mL. Ajoutez 20 mL de *solution de chlorure ferrique R1* et mélangez. Placez le ballon dans un bain-marie et chauffez à reflux pendant 20 min en veillant à ce que le niveau de l'eau reste constamment supérieur à celui du liquide contenu dans le ballon. Ajoutez 3 mL d'*acide chlorhydrique R* et continuez de chauffer pendant 30 min, en agitant fréquemment, jusqu'à dissolution du précipité. Refroidissez, transvasez le mélange dans une ampoule à décantation et agitez avec 3 fois 25 mL d'*éther R* préalablement utilisé pour rincer le ballon. Réunissez les phases éthérées et lavez avec 2 fois 15 mL d'*eau R*. Transvasez les phases éthérées dans une fiole jaugée et complétez à 100,0 mL avec de l'*éther R*. Prélevez 10,0 mL de cette solution et évaporez à siccité avec précaution, puis dissolvez le résidu dans 10,0 mL d'une solution d'*acétate de magnésium R* à 5,0 g/L dans le *méthanol R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 515 nm en utilisant du *méthanol R* comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en hétérosides hydroxyanthracéniques, exprimés en sennoside B, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 4,167}{m}$$

en prenant 240 comme valeur de l'absorbance spécifique du sennoside B.

$A$ = absorbance à 515 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique la teneur en hétérosides hydroxyanthracéniques.



**01/2008:1891**
**corrigé 6.0**

# SERPOLET

## Serpylli herba

DÉFINITION

Parties aériennes fleuries séchées, entières ou fragmentées, de *Thymus serpyllum* L.s.l.

*Teneur* : au minimum 3,0 mL/kg d'huile essentielle (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La tige très ramifiée, d'un diamètre pouvant atteindre environ 1,5 mm, est cylindrique ou vaguement quadrangulaire et de couleur verte, rougeâtre ou pourpre ; les parties les plus anciennes sont brunes et ligneuses, les plus jeunes pubescentes. Les feuilles, opposées, mesurent 3 mm à 12 mm de long et jusqu'à 4 mm de large ; elles sont elliptiques à ovales-lancéolées avec un apex obtus, cunéiformes et brièvement pétiolées à la base ; la marge est entière et nettement ciliée, notamment près de la base ; les 2 faces sont plus ou moins glabres mais distinctement ponctuées. L'inflorescence est composée de 6 à 12 fleurs regroupées en capitules terminaux de forme arrondie à ovoïde. Le calice tubulaire est bilabié, avec une lèvre supérieure divisée en 3 dents et une lèvre inférieure à 2 dents, et bordé de longs poils ; sa surface interne est fortement pubescente et les poils forment après la floraison un tube fermé. La corolle, violet-pourpre à rouge, est bilabiée avec une lèvre inférieure trilobée et une lèvre supérieure échancrée, et sa surface interne est fortement pubescente. Les étamines épipétales, au nombre de 4, émergent du tube formé par la corolle.

B. Réduisez le serpolet en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-gris à vert-brun. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de l'épiderme foliaire composé de cellules à parois anticlinales ondulées, légèrement épaissies et de stomates de type diacytique (*2.8.3*) ; de nombreux poils tecteurs provenant des 2 épidermes et de la marge foliaire, la plupart courts, coniques, unicellulaires, à paroi épaissie et verruqueuse, quelques-uns longs, unisériés, comportant jusqu'à 8 cellules à jonctions légèrement renflées et à parois modérément épaissies ; de nombreux poils glanduleux, la plupart pluricellulaires avec un court pédicelle unicellulaire arrondi et une grosse tête globuleuse composée de plusieurs cellules radiales indistinctes contenant une sécrétion brune, d'autres plus petits, capités, à pédicelle unicellaire et tête globoïde à ovoïde ; des fragments violet-pourpre de la corolle, à épiderme externe portant de nombreux poils tecteurs et glanduleux, à épiderme interne papilleux ; des grains de pollen sphériques à elliptiques, d'un diamètre de 30 µm à 40 µm, à exine finement ponctuée et 6 pores germinatifs.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de serpolet pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 5 mL de *chlorure de méthylène R* et agitez pendant 3 min. Filtrez sur environ 2 g de *sulfate de sodium anhydre R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *thymol R* et 10 µL de *carvacrol R* dans 10 mL de *chlorure de méthylène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R.*

*Phase mobile* : *chlorure de méthylène R.*

*Dépôt* : 20 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| | Une bande d'atténuation de fluorescence marquée |
| Thymol : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence (thymol) |
| _______ | _______ |
| | Bandes d'atténuation de fluorescence |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez 10 mL de *solution d'aldéhyde anisique R* pour une plaque de 200 mm de côté ; chauffez la plaque à 100-105 °C pendant 10 min.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes sont présentes dans le tiers inférieur du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner. L'intensité des bandes dues au thymol et au carvacrol est fonction de l'échantillon examiné (chémotypes).

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Thymol : une bande rose-brun | Une bande rose-brun (thymol) |
| Carvacrol : une bande violet clair | Une bande violet clair (carvacrol) |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3 pour cent, déterminé sur 30 g de serpolet.

Les éléments étrangers peuvent être des feuilles aciculées à linéaires-lancéolées, à bords fortement enroulés, dont l'épiderme adaxial présente des poils tecteurs en forme de dents pointues, à paroi verruqueuse, et l'épiderme abaxial des poils tecteurs verruqueux de différents types : poils unicellulaires dressés ou légèrement incurvés, poils bi- ou tricellulaires le plus souvent coudés, poils bi- ou tricellulaires plus ou moins dressés (*Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*).

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de serpolet pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 3,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez 50,0 g de serpolet fragmenté, un ballon à fond rond de 1000 mL et 500 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 2 h, sans *xylène R* dans le tube gradué.

**01/2008:1892**
**corrigé 6.0**

# SOLIDAGE

## Solidaginis herba

DÉFINITION

Parties aériennes fleuries, séchées, entières ou fragmentées, de *Solidago gigantea* Ait, ou de *Solidago canadensis* L. ou de leurs variétés ou hybrides et/ou d'un mélange de ces espèces.

*Teneur* : au minimum 2,5 pour cent de flavonoïdes, exprimés en hypéroside ($C_{21}H_{20}O_{12}$ ; $M_r$ 464,4) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Les tiges sont jaune-vert ou brun-vert, prenant par endroit une coloration rougeâtre, arrondies, creusées de sillons plus ou moins apparents ; glabres et lisses dans leur partie inférieure, elles deviennent légèrement à fortement pubescentes dans leur partie supérieure. Elles sont solides et possèdent une moelle blanchâtre.

Les feuilles sont vertes, sessiles, lancéolées, à marge découpée, d'une longueur de 8-12 cm et d'une largeur d'environ 1-3 cm ; la face supérieure est verte et plus ou moins glabre ; la face inférieure est vert-gris et pubescente notamment sur les nervures. L'inflorescence est constituée de grappes unilatérales, recourbées, formant un panicule pyramidal à l'extrémité de la tige.

Chaque capitule a un involucre formé de bractées vert-jaune imbriquées, linéaires à lancéolées, entouré d'un seul rang de fleurs ligulées jaunes de même longueur que l'involucre ; de fleurs tubulées jaunes, à structure radiale, aussi longues, voire plus, que les fleurs ligulées ; un ovaire infère brunâtre surmonté d'un pappus blanc à poils soyeux.

B. Réduisez la drogue en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-gris. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente des soies des pappus, entières ou brisées, constituées de poils plurisériés à cellules allongées dont les extrémités se détachent de la surface en formant des projections pointues sur toute la longueur ; des fragments du mésophylle contenant des faisceaux vasculaires accompagnés de cellules sécrétrices ; des fragments de l'épiderme foliaire à cellules sinueuses à ondulées et des stomates de type anomocytique (*2.8.3*) ; des poils tecteurs unisériés à 5 ou 6 cellules, parfois en forme de cravache avec une cellule terminale à paroi plus épaisse ; des fragments du style à papilles longues et minces ; des fragments de la tige, avec des vaisseaux réticulés et spiralés ; des grains de pollen à 3 pores germinatifs et exine échinulée ; nombreux poils en fouets, quelques rares poils doubles isolés provenant de l'ovaire, absence de poils multicellulaires dont la cellule terminale peut être coudée à angle droit.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 0,75 g de solidage pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 5 mL de *méthanol R* et chauffez à reflux au bain-marie pendant 10 min. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 1,0 mg d'*acide chlorogénique R*, 2,5 mg de *quercitroside R* et 2,5 mg de *rutine R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R*, *eau R*, *méthyléthylcétone R*, *acétate d'éthyle R* (6:6:18:30 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL de solution à examiner et 10 µL de solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R*, puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R*. Laissez reposer pendant 30 min. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence vert-bleu |
| Quercitroside : une bande de fluorescence brun-jaune | Une bande de faible à intense fluorescence brun-jaune (quercitroside) |
| | Une bande de fluorescence brun-jaune plus ou moins intense |
| Acide chlorogénique : une bande de fluorescence bleu clair | Une bande de fluorescence bleu clair et/ou une bande de fluorescence jaune (acide chlorogénique) |
| Rutine : une bande de fluorescence orange | Une bande de faible à intense fluorescence brun-jaune (rutine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent d'éléments brunâtres et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 0,500 g de solidage pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 7,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 1,0 pour cent.

DOSAGE

*Solution mère*. Dans un ballon à fond rond de 100 mL, introduisez 0,200 g de solidage pulvérisé (250) (*2.9.12*), puis ajoutez 1 mL d'une solution d'*hexaméthylènetétramine R* à 5 g/L, 20 mL d'*acétone R* et 2 mL d'*acide chlorhydrique R1*. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Filtrez le liquide à travers un peu de coton hydrophile, en recueillant le filtrat dans un flacon de 100 mL. Ajoutez le coton hydrophile au résidu contenu dans le ballon à fond rond, et extrayez avec 2 fois 20 mL d'*acétone R*, en chauffant chaque fois à reflux pendant 10 min. Après refroidissement, filtrez les extraits acétoniques réunis sur un filtre en papier en recueillant le filtrat dans une fiole jaugée. Rincez le flacon et le filtre en papier et complétez à 100,0 mL avec de l'*acétone R*. Placez 20,0 mL de cette solution dans une ampoule à décantation, ajoutez 20 mL d'*eau R* et agitez le mélange avec 1 fois 15 mL, puis avec 3 fois 10 mL d'*acétate d'éthyle R*. Réunissez les extraits à l'acétate d'éthyle dans une ampoule à décantation, lavez avec 2 fois 50 mL d'*eau R*, puis filtrez sur 10 g de *sulfate de sodium anhydre R* en recueillant le filtrat dans une fiole jaugée. Complétez à 50,0 mL avec de l'*acétate d'éthyle R* en rinçant l'ampoule et le sulfate de sodium.

*Solution à examiner*. A 10,0 mL de solution mère, ajoutez 1,0 mL de *réactif au chlorure d'aluminium R* et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide acétique glacial R* à 5 pour cent *V/V* dans le *méthanol R*.

*Solution de compensation*. Prélevez 10,0 mL de solution mère et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide acétique glacial R* à 5 pour cent *V/V* dans le *méthanol R*.

Après 30 min, mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner à 425 nm par rapport à la solution de compensation.

Calculez la teneur pour cent en flavonoïdes, exprimés en hypéroside, à l'aide de l'expression :

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

en prenant 500 comme valeur de l'absorbance spécifique de l'hypéroside.

$A$ = absorbance mesurée à 425 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2008:1893**
**corrigé 6.0**

# SOLIDAGE VERGE D'OR

## Solidaginis virgaureae herba

DÉFINITION

Parties aériennes fleuries, séchées, entières ou fragmentées, de *Solidago virgaurea* L.

*Teneur* : au minimum 0,5 pour cent et au maximum 1,5 pour cent de flavonoïdes, exprimés en hypéroside ($C_{21}H_{20}O_{12}$ ; $M_r$ 464,4) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La tige est cylindrique, striée, généralement de couleur violet-rouge dans sa partie inférieure ; elle peut être entièrement glabre, ou pubescente et couverte de poils courts recourbés vers le haut. Les feuilles basilaires sont obovales à oblancéolées, avec un bord en dents de scie, et se prolongent par un long pétiole ailé. Les feuilles caulinaires sont alternes, plus petites et de forme plus elliptique que les feuilles basilaires, à bord entier ou légèrement denté ; elles sont sessiles ou brièvement pétiolées. Les 2 faces de la feuille sont glabres ou légèrement pubescentes et la face inférieure présente une nervation réticulée saillante. Les fleurs forment un panicule compact. La base du pédoncule porte 2 petites bractées linéaires à bord scarieux. L'involucre est formé de 2-4 rangées irrégulières de bractées imbriquées, de couleur jaune-vert, lisses et luisantes à la face interne, pubescentes ou glabres à la face externe, scarieuses sur les bords. Chaque capitule comporte 6-12 fleurs ligulées femelles largement espacées, à peu près 2 fois plus longues que les bractées, et environ 10-30 fleurs tubulées hermaphrodites. Toutes les fleurs sont jaunes. L'ovaire inférieur, brun, se rétrécit à la base et présente une surface nervurée couverte d'une pilosité éparse ; il est surmonté d'un pappus blanchâtre composé de soies lisses ou rugueuses.

B. Réduisez la drogue en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert clair. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente : des fragments d'épiderme foliaire vus de face, ceux de l'épiderme supérieur étant composés de cellules polygonales à paroi droite épaissie en chapelet et cuticule nettement striée, ceux de l'épiderme inférieur étant à cellules plus sinueuses, avec une striation moins distincte et de nombreux stomates anomocytiques (*2.8.3*) ; quelques fragments de feuilles à cellules contenant de petites macles d'oxalate de calcium isolées ; des poils tecteurs coniques unisériés provenant des feuilles et des bractées, comprenant jusqu'à environ 10 cellules, et dont certains des plus courts présentent une cellule terminale en forme d'étendard ; quelques poils glanduleux à pédicelle unicellulaire ou bicellulaire et à tête unicellulaire allongée ; de rares poils tecteurs géminés provenant de l'ovaire, à paroi centrale distinctement ponctuée et à apex bifide ; de nombreuses soies des pappus, entières ou brisées, multisériées, à cellules marginales se chevauchant vers l'extérieur ; des groupes de fibres et du tissu vasculaire des tiges ; des fragments de l'épiderme des pétales, à cuticule

striée, portant quelques longs poils glanduleux bisériés ; des grains de pollen sphériques à 3 pores germinatifs et exine échinulée.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications de l'essai *Solidago gigantea* et *Solidago canadensis*.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes colorées peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence bleu clair |
| Quercitroside : une bande de fluorescence orangée | |
| _______ | _______ |
| Acide chlorogénique : une bande de fluorescence bleu clair | Une bande de fluorescence bleu clair (acide chlorogénique) |
| Rutine : une bande de fluorescence orangée | Une bande de fluorescence orangée (rutine) |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent d'éléments de couleur brune et au maximum 5 pour cent d'autres éléments étrangers.

***Solidago gigantea* et *Solidago canadensis***. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 0,75 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 5 mL de *méthanol R* et chauffez à reflux au bain-marie pendant 10 min. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 1,0 mg d'*acide chlorogénique R*, 2,5 mg de *quercitroside R* et 2,5 mg de *rutine R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R*, *eau R*, *méthyléthylcétone R*, *acétate d'éthyle R* (6:6:18:30 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 20 μL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez la plaque avec une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R*, puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R*. Après 30 min, examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande de fluorescence orangée nette semblable quant à sa position à la bande du quercitroside du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 8,0 pour cent.

DOSAGE

*Solution mère*. Dans un ballon à fond rond de 100 mL, introduisez 0,200 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*), puis ajoutez 1 mL d'une solution d'*hexaméthylènetétramine R* à 5 g/L, 20 mL d'*acétone R* et 2 mL d'*acide chlorhydrique R1*. Chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Filtrez le liquide à travers un peu de coton hydrophile, en recueillant le filtrat dans un flacon de 100 mL. Ajoutez le coton hydrophile au résidu contenu dans le ballon à fond rond et extrayez avec 2 fois 20 mL d'*acétone R*, en chauffant chaque fois à reflux pendant 10 min. Après refroidissement, filtrez les extraits réunis sur un filtre en papier, puis complétez à 100,0 mL avec de l'*acétone R* en rinçant à l'acétone la fiole jaugée et le filtre en papier. Placez 20,0 mL de cette solution dans une ampoule à décantation, ajoutez 20 mL d'*eau R* et agitez le mélange avec 1 fois 15 mL, puis 3 fois 10 mL d'*acétate d'éthyle R*. Réunissez les extraits à l'acétate d'éthyle dans une ampoule à décantation, lavez avec 2 fois 50 mL d'*eau R*, puis filtrez sur 10 g de *sulfate de sodium anhydre R* en recueillant le filtrat dans une fiole jaugée. Complétez à 50,0 mL avec de l'*acétate d'éthyle R* en rinçant l'ampoule et le sulfate de sodium.

*Solution à examiner*. A 10,0 mL de solution mère, ajoutez 1,0 mL de *réactif au chlorure d'aluminium R* et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide acétique glacial R* à 5 pour cent *V/V* dans le *méthanol R*.

*Liquide de compensation*. Prélevez 10,0 mL de solution mère et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide acétique glacial R* à 5 pour cent *V/V* dans le *méthanol R*.

Après 30 min, mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner à 425 nm par rapport au liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en flavonoïdes, exprimés en hypéroside, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

en prenant 500 comme valeur de l'absorbance spécifique de l'hypéroside.

$A$ = absorbance mesurée à 425 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2011:1297**

# SOUCI

## Calendulae flos

DÉFINITION

Fleur entièrement épanouie, détachée du réceptacle et séchée, entière ou coupée, des formes cultivées à fleurs doubles de *Calendula officinalis* L.

*Teneur* : au minimum 0,4 pour cent de flavonoïdes, exprimés en hypéroside ($C_{21}H_{20}O_{12}$ ; $M_r$ 464,4) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Les fleurs ligulées se composent d'une ligule jaune ou jaune-orange à 3 dents, d'une largeur d'environ 3-5 mm et environ 7 mm au niveau médian, prolongeant un tube velu plus ou moins falciforme, brun-jaune ou brun-orange, dont émerge le style à stigmate bifide, avec parfois un ovaire brun-jaune ou brun-orange plus ou moins recourbé. Les fleurs tubulées, toujours présentes, ont une longueur d'environ 5 mm et se composent d'une corolle jaune, rouge-orange ou violet-rouge à 5 lobes et d'un tube brun-jaune ou brun-orange, velu à la base, avec en général un ovaire brun-jaune ou brun-orange plus ou moins recourbé.

B. Réduisez le souci en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-jaune. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants (figure 1297.-1) : des fragments des épidermes de la corolle [C, F, K] contenant des gouttelettes huileuses jaune clair, certains avec des stomates anomocytiques (*2.8.3*) d'assez grande taille [Fa, Ka] ; des poils tecteurs bisériés, pluricellulaires et coniques [G], le plus souvent fragmentés, et des poils sécréteurs à pied pluricellulaire [E], particulièrement nombreux à la base de la corolle [D] ; des fragments du parenchyme de la corolle [B] contenant des prismes et de très petites macles d'oxalate de calcium [Ba, Da] et de petits vaisseaux [Bb] ; des grains de pollen sphériques mesurant jusqu'à 40 μm de diamètre, à exine fortement échinulée et à 3 pores germinatifs [A, J] ; quelques fragments de stigmates à courtes papilles bulbeuses [H].

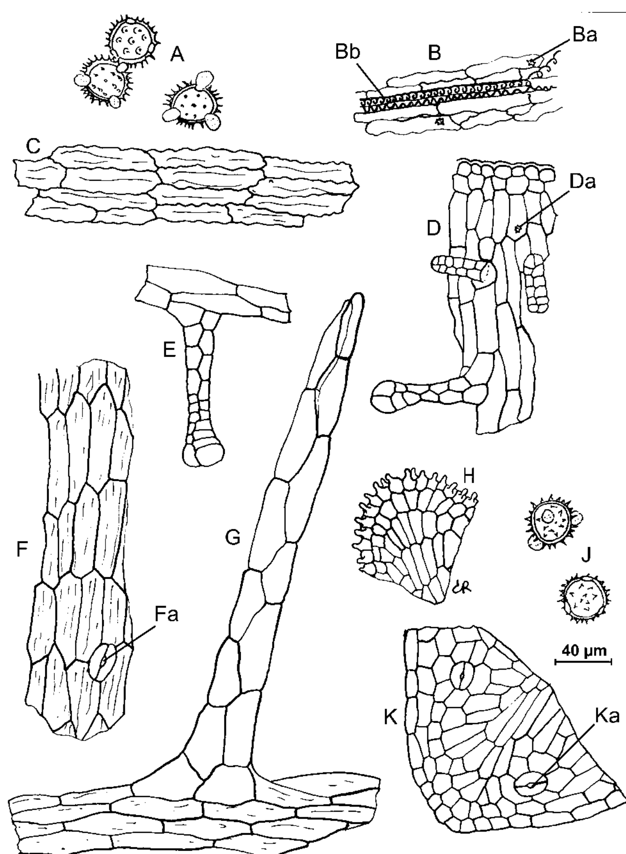



Figure 1297.-1. – *Dessin pour l'identification B du souci pulvérisé*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Mélangez 1,0 g de souci pulvérisé (500) (*2.9.12*) avec 10 mL de *méthanol R*. Chauffez au bain-marie à reflux pendant 10 min. Après refroidissement, filtrez la solution.

*Solution témoin.* Dissolvez 1,0 mg d'*acide caféique R*, 1,0 mg d'*acide chlorogénique R* et 2,5 mg de *rutine R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, acétate d'éthyle R* (10:10:80 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL de solution à examiner et 10 µL de solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez sur la plaque encore chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R*. Pulvérisez ensuite une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R*. Laissez sécher à l'air pendant 30 min et examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résulats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente, dans sa partie inférieure une bande de fluorescence brun-jaune (rutine), dans sa partie médiane une bande de fluorescence bleu clair (acide chlorogénique) et dans sa partie supérieure une bande de fluorescence bleu clair (acide caféique). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande de fluorescence brun-jaune semblable quant à sa position à la bande due à la rutine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, en dessous et directement au-dessus de cette bande, il présente une bande de fluorescence vert-jaune et une bande de fluorescence bleu clair correspondant à la bande due à l'acide chlorogénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Au-dessus de cette bande, il présente une bande de fluorescence vert-jaune et une bande de fluorescence bleu clair juste au-dessous de la bande due à l'acide caféique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatograme obtenu avec la solution à examiner.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent de bractées et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de souci pulvérisé (500) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

DOSAGE

*Solution-mère.* Dans un ballon à fond rond de 100 mL, placez 0,800 g de souci pulvérisé (500) (*2.9.12*), puis ajoutez 1 mL d'une solution d'*hexaméthylènetétramine R* à 5 g/L, 7 mL d'*acide chlorhydrique R1* et 20 mL d'*acétone R*. Chauffez à ébullition à reflux pendant 30 min. Filtrez le mélange sur un tampon de coton hydrophile, en recueillant le filtrat dans une fiole jaugée de 100 mL. Dans le ballon à fond rond, chauffez à ébullition à reflux le résidu et le tampon de coton hydrophile à 2 reprises pendant 10 min chaque fois avec 20 mL d'*acétone R*. Après refroidissement à température ambiante, filtrez la solution sur un tampon de coton hydrophile, puis filtrez la solution d'acétone sur un papier filtre en recueillant le filtrat dans une fiole jaugée et complétez à 100,0 mL avec de l'*acétone R* en rinçant le ballon et le filtre. Transvasez 20,0 mL de cette solution dans une ampoule à décantation, ajoutez 20 mL d'*eau R* et agitez le mélange avec 1 fois 15 mL, puis 3 fois 10 mL d'*acétate d'éthyle R*. Réunissez les extraits à l'acétate d'éthyle dans une ampoule à décantation, lavez avec 2 fois 50 mL d'*eau R*, puis filtrez les extraits sur 10 g de *sulfate de sodium anhydre R* en recueillant le filtrat dans une fiole jaugée de 50 mL. Complétez à 50,0 mL avec de l'*acétate d'éthyle R*.

*Solution à examiner.* A 10,0 mL de solution mère, ajoutez 1 mL de *réactif au chlorure d'aluminium R* et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide acétique glacial R* à 5 pour cent *V/V* dans du *méthanol R*.

*Liquide de compensation.* Prélevez 10,0 mL de solution mère et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide acétique glacial R* à 5 pour cent *V/V* dans du *méthanol R*.

Après 30 min, mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner à 425 nm, par comparaison au liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en flavonoïdes, exprimés en hypéroside, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

en prenant 500 comme valeur de l'absorbance spécifique de l'hypéroside.

$A$ = absorbance à 425 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2011:2478**

## STÉPHANIA (RACINE DE)

### Stephaniae tetrandrae radix

DÉFINITION

Racine raclée, coupée et séchée, de *Stephania tetrandra* S.Moore.

*Teneur* : au minimum 1,6 pour cent de la somme de la tétrandrine et de la fangchinoline, exprimée en tétrandrine ($C_{38}H_{42}N_2O_6$ ; $M_r$ 623) (drogue desséchée).

Drogues végétales

IDENTIFICATION

A. La racine de stéphania se présente en rouelles ou en morceaux irrégulièrement cylindriques ou semi-cylindriques, tortueux pour la plupart, d'environ 0,5-1 cm d'épaisseur et 1-5 cm de diamètre. La surface externe, jaune-gris, montre généralement de profondes et sinueuses stries transversales ; les parties courbes sont bosselées et noueuses. La texture est dense et compacte. La section blanc-gris est parcourue de stries radiales.

B. Réduisez la racine de stéphania en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est gris-blanc. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : de nombreux fragments de parenchyme à cellules à parois légèrement épaissies et moniliformes ; des vaisseaux de bois à ornementation réticulée ou ponctuée, accompagnés de fibres ; des fragments de phelloderme contenant des amas de cellules scléreuses ; de rares fragments de suber ; de rares, fins, cristaux d'oxalate de calcium en forme de bâtonnets. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente de très nombreux grains d'amidon d'un diamètre de 10-20 µm, à hile punctiforme, arrondis ou tronqués, simples ou groupés en 2-3 éléments.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 0,4 g de racine de stéphania pulvérisée (355) (*2.9.12*) ajoutez 10 mL d'un mélange de 1 volume d'*acide formique anhydre R*, 9 volumes d'*eau R* et 40 volumes de *méthanol R*. Traitez aux ultrasons pendant 10 min à 25 °C et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg de *chlorhydrate de protopine R* et 10 mg de *tétrandrine R* dans du *méthanol R*, puis complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, méthanol R, acétate d'éthyle R, toluène R* (0,3:5:10:10 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL [ou 5 µL] en bandes de 10 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : dans un courant d'air chaud pendant 5 min.

*Détection* : pulvérisez une solution d'*iode R* à 5 g/L dans de l'*éthanol à 96 pour cent R* jusqu'à ce que le fond soit jaune. Examinez à la lumière du jour, après disparition du fond jaune.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Protopine : une bande orange | |
| _______ | _______ |
| Tétrandrine : une bande orange | Une bande orange (tétrandrine) |
| | Une bande orange |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

***Aristolochia fangchi***. Essai des acides aristolochiques dans les drogues végétales (*2.8.21*). La racine de stéphania satisfait au procédé A.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de racine de stéphania pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 4,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 1,0 pour cent.

DOSAGE

**Tétrandrine et fangchinoline**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Dans un ballon à fond rond de 50 mL, pesez 0,500 g de racine de stéphania pulvérisée (355) (*2.9.12*). Ajoutez 25 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 2 pour cent *V/V* dans du *méthanol R* et pesez. Chauffez à reflux au bain-marie à 60 °C pendant 30 min. Refroidissez et pesez. Ajustez au poids initial à l'aide d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 2 pour cent *V/V* dans du *méthanol R* et filtrez. Prélevez 5,0 mL de filtrat et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin*. Dissolvez 10,0 mg de *tétrandrine SCR* dans 5 mL de *méthanol R* et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,

– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : solution de *dodécylsulfate de sodium R* à 4,1 g/L dans un mélange de 1 volume d'*acide acétique glacial R*, 30 volumes de *méthanol R*, 30 volumes d'*eau R* et 40 volumes d'*acétonitrile R*.

*Débit* : 2,0 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 280 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Enregistrement* : 30 min.

*Rétention relative* par rapport à la tétrandrine (temps de rétention = environ 18 min) : fangchinoline = environ 0,7.

*Conformité du système* : solution à examiner :

– *résolution* : au minimum 3,0 entre les pics dus à la fangchinoline et à la tétrandrine.

Calculez la teneur pour cent en tétrandrine et en fangchinoline, exprimée en tétrandrine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{(A_1 + A_3) \times m_2 \times p \times 5}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à la tétrandrine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à la tétrandrine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$A_3$ = surface du pic dû à la fangchinoline dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$m_1$ = masse de drogue à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse de *tétrandrine SCR* utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en tétrandrine de la *tétrandrine SCR*.

**04/2010:0246**

# STRAMOINE (FEUILLE DE)

## Stramonii folium

DÉFINITION

Feuilles seules ou mêlées de sommités florifères et, parfois fructifères, séchées de *Datura stramonium* L. et de ses variétés.

*Teneur* : au minimum 0,25 pour cent d'alcaloïdes totaux, exprimés en hyoscyamine ($C_{17}H_{23}NO_3$ ; $M_r$ 289,4) (drogue desséchée). Les alcaloïdes sont principalement constitués d'hyoscyamine associée à des quantités variables de scopolamine (hyoscine).

CARACTÈRES

Odeur désagréable.

IDENTIFICATION

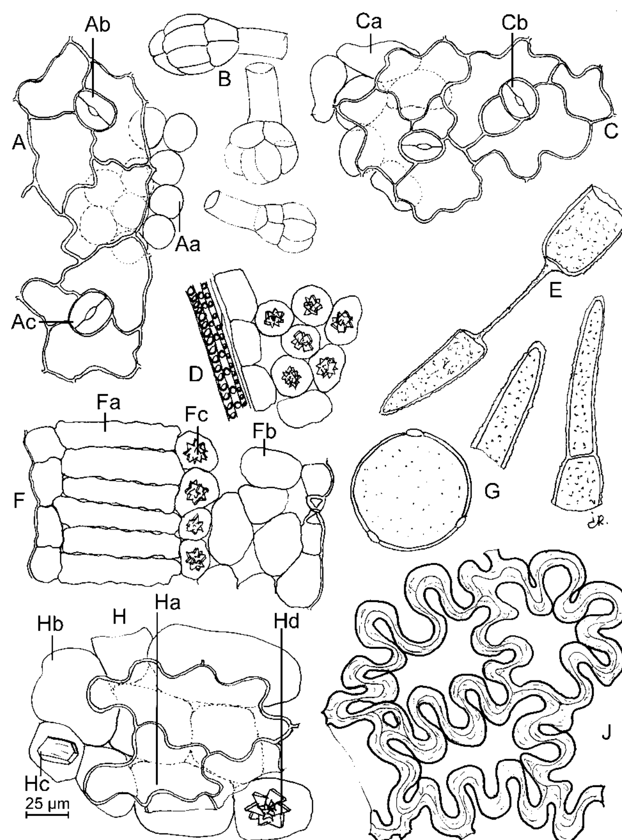
A. Les feuilles, vert-brun foncé ou vert-gris foncé, sont brièvement pétiolées, minces et fragiles, souvent froissées et tordues par la dessiccation et présentent des lobes dentés. Le limbe ovale ou ovale triangulaire a un apex acuminé et est souvent asymétrique à la base. Les feuilles jeunes sont pubescentes au niveau des nervures alors que les feuilles âgées sont pratiquement glabres. Les tiges, vertes ou vert-pourpre, sont minces, courbées et tordues, ridées longitudinalement et parfois transversalement, sont souvent ramifiées et portent, à l'aisselle des rameaux, une fleur solitaire ou un fruit immature. Les fleurs, courtement pédonculées, sont formées d'un calice gamosépale à 5 lobes et d'une corolle infundibuliforme blanc-brun ou pourprée. Le fruit est une capsule généralement recouverte de nombreuses aspérités courtes et raides ; les semences sont brunes ou noires avec un tégument finement réticulé.

B. Réduisez la feuille de stramoine en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert-gris. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments du limbe formés de cellules épidermiques à parois anticlinales légèrement sinueuses, à cuticule lisse ; des stomates anisocytiques et anomocytiques (*2.8.3*) plus fréquents sur l'épiderme inférieur ; des poils tecteurs coniques, unisériés, composés de 3-5 cellules à parois verruqueuses ; des poils sécréteurs courts et claviformes dont la tête est formée de 2-7 cellules ; un mésophylle bifacial qui comporte 1 seule assise de cellules palissadiques et un parenchyme lacuneux contenant des macles d'oxalate de calcium ; des vaisseaux épaissis annelés et spiralés. La feuille de stramoine pulvérisée peut également présenter : des vaisseaux réticulés épaissis et des fibres provenant des tiges ; des grains de pollen subsphériques d'un diamètre d'environ 60-80 µm, présentant 3 pores germinatifs et une exine pratiquement lisse ; des fragments de corolle à épiderme papilleux ; des fragments de graines contenant des scléréides tégumentaires à parois épaisses, sinueuses, brun-jaune ; de rares prismes et microcristaux cunéiformes d'oxalate de calcium.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai Chromatographie.

*Résultats* : les bandes principales des chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner sont semblables quant à leur position, leur coloration et leurs dimensions aux bandes principales du chromatogramme obtenu avec le même volume de la solution témoin.

D. Agitez 1 g de feuille de stramoine pulvérisée (180) (*2.9.12*) avec 10 mL d'*acide sulfurique 0,05 M* pendant 2 min et filtrez. Au filtrat, ajoutez 1 mL d'*ammoniaque concentrée R* et 5 mL d'*eau R*. Agitez ce mélange avec 15 mL d'*éther exempt de peroxydes R*, avec précaution pour éviter la formation d'émulsion. Recueillez la phase éthérée et desséchez-la sur du *sulfate de sodium anhydre R*. Filtrez dans une capsule de porcelaine, puis évaporez l'éther. Ajoutez 0,5 mL d'*acide nitrique R*, puis évaporez à siccité au bain-marie. Ajoutez 10 mL d'*acétone R* et, goutte à goutte, une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 30 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*. Il se développe une intense coloration violette.




A. Epiderme supérieur du limbe accompagné de parenchyme palissadique (Aa), avec stomate anomocytique (Ab) ou anisocytique (Ac), vu de face

B. Poils sécréteurs

C. Epiderme inférieur du limbe accompagné de parenchyme lacuneux (Ca), avec stomates anisocytiques (Cb), vu de face

D. Parenchyme lacuneux dont certaines cellules contiennent de petites macles d'oxalate de calcium et vaisseaux annelés et spiralés, vus de face

E. Poils tecteurs pluricellulaires à paroi verruqueuse

F. Limbe de la feuille, en section transversale, comportant une assise de parenchyme palissadique (Fa), du parenchyme lacuneux (Fb) et de petites macles d'oxalate de calcium (Fc)

G. Grain de pollen

H. Epiderme du pétale (Ha), vu de face, avec cellules du mésophylle sous-jacent (Hb) dont certaines contiennent un prisme (Hc) ou une macle (Hd) d'oxalate de calcium

J. Scléréides du tégument de la graine

Figure 0246.-1. – *Dessin pour l'identification de la feuille de stramoine (voir Identification B)*

ESSAI

**Chromatographie**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de feuille de stramoine pulvérisée (180) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL d'*acide sulfurique 0,05 M*, agitez pendant 15 min et filtrez. Lavez le filtre avec de l'*acide sulfurique 0,05 M* jusqu'à obtention de 25 mL de filtrat. Au filtrat, ajoutez 1 mL d'*ammoniaque concentrée R* et agitez avec 2 fois 10 mL d'*éther exempt de peroxydes R*. Séparez par centrifugation si nécessaire. Réunissez les phases éthérées et desséchez-les sur du *sulfate de sodium anhydre R*, filtrez et évaporez le filtrat à siccité au bain-marie. Dissolvez le résidu dans 0,5 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 50 mg de *sulfate d'hyoscyamine R* dans 9 mL de *méthanol R*. Dissolvez 15 mg de *bromhydrate de scopolamine R* dans 10 mL de *méthanol R*. Mélangez 3,8 mL

de la solution de sulfate d'hyoscyamine et 4,2 mL de la solution de bromhydrate de scopolamine puis complétez à 10 mL avec du *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R*.

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, eau R, acétone R* (3:7:90 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL et 20 µL, en bandes de 20 mm sur 3 mm, distantes de 1 cm.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C pendant 15 min ; laissez refroidir.

*Détection A* : pulvérisez environ 10 mL de *solution d'iodobismuthate de potassium R2* pour une plaque de 200 mm de côté, jusqu'à apparition de bandes oranges ou brunes sur fond jaune.

*Résultats A* : les bandes des chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner sont semblables quant à leur position (hyoscyamine dans le tiers inférieur, scopolamine dans le tiers supérieur des chromatogrammes) et leur coloration à celles des chromatogrammes obtenus avec la solution témoin. La dimension des bandes des chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner n'est pas inférieure à celle des bandes correspondantes dans le chromatogramme obtenu avec le même volume de solution témoin. Des bandes secondaires de faible intensité peuvent apparaître en particulier au centre du chromatogramme obtenu avec 20 µL de solution à examiner ou près du point de dépôt dans le chromatogramme obtenu avec 10 µL de solution à examiner.

*Détection B* : pulvérisez de la *solution de nitrite de sodium R* jusqu'à ce que la couche devienne transparente et examinez après 15 min.

*Résultats B* : la coloration des bandes dues à l'hyoscyamine dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner vire du brun au brun-rouge mais pas au bleu-gris (atropine) et les bandes secondaires éventuelles disparaissent.

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3 pour cent de tiges de diamètre supérieur à 5 mm.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 20,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 4,0 pour cent.

DOSAGE

a) Effectuez la perte à la dessiccation (*2.2.32*) par chauffage à l'étuve à 105 °C sur 2,000 g de feuille de stramoine pulvérisée (180) (*2.9.12*).

b) Imbibez 10,0 g de feuille de stramoine pulvérisée (180) (*2.9.12*) avec un mélange de 5 mL d'*ammoniaque R*, de 10 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et de 30 mL d'*éther exempt de peroxydes R* puis mélangez soigneusement. Dans un percolateur approprié, introduisez le mélange éventuellement à l'aide du mélange extracteur. Laissez macérer pendant 4 h. Lixiviez avec un mélange de 1 volume de *chloroforme R* et de 3 volumes d'*éther exempt de peroxydes R* jusqu'à extraction complète des alcaloïdes. Evaporez à siccité quelques millilitres s'écoulant du percolateur. Reprenez le résidu par l'*acide sulfurique 0,25 M* et vérifiez l'absence d'alcaloïdes avec de la *solution de tétraiodomercurate de potassium R*. Réduisez le volume du percolat à environ 50 mL par distillation au bain-marie, puis introduisez-les dans une ampoule à décantation en rinçant avec de l'*éther exempt de peroxydes R*. Au liquide obtenu, ajoutez au moins 2,1 fois son volume d'*éther exempt de peroxydes R*, de façon à obtenir une phase de densité nettement inférieure à celle de l'eau. Agitez avec au moins 3 fois 20 mL d'*acide sulfurique 0,25 M*, séparez les 2 phases par centrifugation si nécessaire, puis versez les fractions acides dans une 2e ampoule à décantation. Alcalinisez par l'*ammoniaque R* les solutions acides et agitez avec 3 fois 30 mL de *chloroforme R*. Réunissez les phases chloroformiques. Ajoutez 4 g de *sulfate de sodium anhydre R* et laissez en contact pendant 30 min en agitant de temps en temps. Recueillez le chloroforme et lavez le sulfate de sodium anhydre avec 3 fois 10 mL de *chloroforme R*. Réunissez les phases chloroformiques, évaporez à siccité au bain-marie et chauffez à l'étuve à 100-105 °C pendant 15 min. Dissolvez le résidu dans quelques millilitres de *chloroforme R*, ajoutez 20,0 mL d'*acide sulfurique 0,01 M* et éliminez le chloroforme par évaporation au bain-marie. Titrez l'excès d'acide par l'*hydroxyde de sodium 0,02 M* en présence d'*indicateur mixte au rouge de méthyle R*.

Calculez la teneur pour cent en alcaloïdes totaux, exprimés en hyoscyamine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{57,88 \times (20 - n)}{(100 - d) \times m}$$

*d* = perte à la dessiccation, en pour cent,

*n* = volume d'*hydroxyde de sodium 0,02 M*, en millilitres,

*m* = masse de la prise d'essai, en grammes.

CONSERVATION

A l'abri de l'humidité.

**01/2008:0247**

# STRAMOINE (POUDRE TITRÉE DE)

## Stramonii pulvis normatus

DÉFINITION

Feuille de stramoine pulvérisée (180) (*2.9.12*) ajustée, si nécessaire, avec du lactose en poudre ou une poudre de feuille de stramoine à faible teneur en alcaloïdes totaux.

*Teneur* : 0,23 pour cent à 0,27 pour cent d'alcaloïdes totaux, exprimés en hyoscyamine ($C_{17}H_{23}NO_3$ ; $M_r$ 289,4) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre vert-gris.

Odeur désagréable.

IDENTIFICATION

A. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments du limbe comportant des cellules épidermiques aux parois anticlinales légèrement sinueuses à cuticule lisse ; des stomates anisocytiques et anomocytiques (*2.8.3*) plus fréquents sur l'épiderme inférieur ; des poils tecteurs coniques, unisériés, composés de 3-5 cellules aux parois verruqueuses ; des poils glanduleux courts et claviformes dont la tête est formée de 2-7 cellules ; un mésophylle bifacial qui comporte 1 seule assise de cellules palissadiques et un parenchyme lacuneux contenant des macles d'oxalate de calcium ; des vaisseaux annelés et spiralés. La feuille pulvérisée peut également présenter les éléments suivants : des fibres et des vaisseaux réticulés provenant des tiges ; des grains de pollen subsphériques généralement d'un diamètre d'environ 60-80 µm présentant 3 pores germinatifs et une exine pratiquement lisse ; des fragments de corolle à épiderme papilleux ; des fragments de semences contenant des scléréides tégumentaires aux parois épaisses, sinueuses, brun-jaune ; de rares prismes et microcristaux cunéiformes d'oxalate de calcium. Examinée dans le *glycérol à 85 pour cent R*, la poudre titrée de stramoine peut présenter des cristaux de lactose.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai Chromatographie.

*Résultats* : les bandes principales du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur position, leur coloration et leurs dimensions aux bandes principales des chromatogrammes obtenus avec le même volume de la solution témoin.

C. Agitez 1 g de poudre titrée de stramoine avec 10 mL d'*acide sulfurique 0,05 M* pendant 2 min et filtrez. Au filtrat, ajoutez 1 mL d'*ammoniaque concentrée R* et 5 mL d'*eau R*. Agitez avec 15 mL d'*éther exempt de peroxydes R* avec précaution pour éviter la formation d'émulsion. Recueillez la phase éthérée et desséchez-la sur du *sulfate de sodium anhydre R*. Filtrez dans une capsule de porcelaine, puis évaporez l'éther. Ajoutez 0,5 mL d'*acide nitrique R*, puis évaporez à siccité au bain-marie. Ajoutez 10 mL d'*acétone R* et, goutte à goutte, une solution d'*hydroxyde de potassium R* à 30 g/L dans l'*éthanol à 96 pour cent R*. Il se développe une intense coloration violette.

ESSAI

**Chromatographie**. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 1,0 g de poudre titrée de stramoine, ajoutez 10 mL d'*acide sulfurique 0,05 M*, agitez pendant 15 min et filtrez. Lavez le filtre avec de l'*acide sulfurique 0,05 M* jusqu'à obtenir 25 mL de filtrat. Au filtrat, ajoutez 1 mL d'*ammoniaque concentrée R* et agitez avec 2 fois 10 mL d'*éther exempt de peroxydes R*. Séparez par centrifugation si nécessaire. Réunissez les phases éthérées et séchez-les sur du *sulfate de sodium anhydre R*, filtrez et évaporez le filtrat à siccité au bain-marie. Dissolvez le résidu dans 0,5 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 50 mg de *sulfate d'hyoscyamine R* dans 9 mL de *méthanol R*. Dissolvez 15 mg de *bromhydrate de scopolamine R* dans 10 mL de *méthanol R*. Mélangez 3,8 mL de solution de sulfate d'hyoscyamine et 4,2 mL de solution de bromhydrate de scopolamine et complétez à 10 mL avec du *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice G pour CCM R*.

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, eau R, acétone R* (3:7:90 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL et 20 µL de chaque solution en bandes de 20 mm sur 3 mm, distantes de 1 cm.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C pendant 15 min, puis laissez refroidir.

*Détection A* : pulvérisez environ 10 mL de *solution d'iodobismuthate de potassium R2* pour une plaque de 200 mm de côté, jusqu'à apparition de bandes orangées ou brunes sur fond jaune.

*Résultats A* : les bandes des chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner sont semblables quant à leur position (hyoscyamine dans le tiers inférieur, scopolamine dans le tiers supérieur des chromatogrammes) et leur coloration à celles des chromatogrammes obtenus avec la solution témoin. La dimension des bandes des chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner n'est pas inférieure à celle des bandes correspondantes dans le chromatogramme obtenu avec le même volume de solution témoin. De faibles bandes secondaires peuvent apparaître en particulier au centre du chromatogramme obtenu avec 20 µL de solution à examiner ou près du point de dépôt dans le chromatogramme obtenu avec 10 µL de solution à examiner.

*Détection B* : pulvérisez de la *solution de nitrite de sodium R* jusqu'à ce que la couche devienne transparente et examinez après 15 min.

*Résultats B* : les bandes dues à l'hyoscyamine dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et dans les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner virent du brun au brun-rouge mais pas au bleu-gris (atropine) et les bandes secondaires éventuelles disparaissent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 5,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de poudre titrée de stramoine.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 20,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 4,0 pour cent.

DOSAGE

a) Effectuez la perte à la dessiccation (*2.2.32*) par chauffage à l'étuve à 105 °C sur 2,000 g de poudre titrée de stramoine.

b) Imbibez 10,0 g de poudre titrée de stramoine avec un mélange de 5 mL d'*ammoniaque R*, de 10 mL d'*éthanol à 96 pour cent R* et de 30 mL d'*éther exempt de peroxydes R* puis mélangez uniformément. Dans un percolateur approprié, introduisez le mélange éventuellement à l'aide du mélange extracteur. Laissez macérer pendant 4 h et lixiviez avec un mélange de 1 volume de *chloroforme R* et de 3 volumes d'*éther exempt de peroxydes R* jusqu'à extraction complète des alcaloïdes. Evaporez à siccité quelques millilitres s'écoulant du percolateur. Reprenez le résidu par l'*acide sulfurique 0,25 M* et vérifiez l'absence d'alcaloïdes avec de la *solution de tétraiodomercurate de potassium R*. Réduisez le volume du percolat à environ 50 mL par distillation au bain-marie, puis introduisez-les dans une ampoule à décantation en rinçant avec de l'*éther exempt de peroxydes R*. Au liquide obtenu, ajoutez au moins 2,1 fois son volume d'*éther exempt de peroxydes R*, de façon à obtenir une phase de densité nettement inférieure à celle de l'eau. Agitez avec au moins 3 fois 20 mL d'*acide sulfurique 0,25 M*, séparez les 2 phases par centrifugation si nécessaire, puis versez les fractions acides dans une 2[de] ampoule à décantation. Alcalinisez par l'*ammoniaque R* les solutions acides et agitez avec 3 fois 30 mL de *chloroforme R*. Réunissez les phases chloroformiques. Ajoutez 4 g de *sulfate de sodium anhydre R* et laissez en contact pendant 30 min en agitant de temps en temps. Recueillez le chloroforme et lavez le sulfate de sodium anhydre avec 3 fois 10 mL de *chloroforme R*. Réunissez les fractions chloroformiques, évaporez à siccité au bain-marie et desséchez à l'étuve à 100-105 °C pendant 15 min. Dissolvez le résidu dans quelques millilitres de *chloroforme R*, ajoutez 20,0 mL d'*acide sulfurique 0,01 M* et éliminez le chloroforme par évaporation au bain-marie. Titrez l'excès d'acide par l'*hydroxyde de sodium 0,02 M* en présence d'*indicateur mixte au rouge de méthyle R*.

Calculez la teneur pour cent en alcaloïdes totaux, exprimés en hyoscyamine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{57,88\,(20-n)}{(100-d)\,m}$$

$d$ = perte à la dessiccation, en pour cent,

$n$ = volume d'*hydroxyde de sodium 0,02 M*, en millilitres,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

CONSERVATION

En récipient étanche.

**01/2008:1217**
**corrigé 6.0**

# SUREAU (FLEUR DE)

## Sambuci flos

DÉFINITION

Fleur séchée de *Sambucus nigra* L.

*Teneur* : au minimum 0,80 pour cent de flavonoïdes, exprimés en isoquercitroside ($C_{21}H_{20}O_{12}$ ; $M_r$ 464,4) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La fleur de sureau, d'un diamètre d'environ 5 mm, est munie de 3 petites bractées (loupe) et peut posséder un pédoncule. Le calice à 5 dents est petit ; la corolle est jaune clair, à 5 pétales largement ovales, soudés à leur base en un tube. Les filets des 5 étamines, jaunes, sont alternés avec les pétales. La corolle se présente souvent isolée ou attachée

aux étamines auxquelles elle est soudée par la base. L'ovaire est infère, à 3 loges ; il est surmonté d'un style court, à 3 stigmates obtus.

B. Réduisez la fleur de sureau en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est jaune-vert. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : de nombreux grains de pollen sphériques, parfois ellipsoïdaux, d'un diamètre d'environ 30 µm, à 3 pores germinatifs et exine très finement ponctuée ; des cellules épidermiques du calice à cuticule striée et parfois des dents marginales unicellulaires, de la région basale ; des fragments de corolle contenant de nombreux globules de petite taille d'huile volatile, dont certains provenant de l'épiderme supérieur possèdent des parois légèrement épaissies en chapelet et une cuticule striée ; des cellules du mésophylle des pétales et des sépales, avec des idioblastes contenant de nombreux cristaux en sable d'oxalate de calcium.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de *Sambucus ebulus*.

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande de fluorescence bleu clair intense due à l'acide chlorogénique, une bande de fluorescence orangée due à la rutine, et une bande de fluorescence orangée due à l'isoquercitrine, qui se situe un peu au-dessus de la bande de fluorescence due à l'hypéroside dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Il présente en outre une bande de fluorescence bleu-vert se situant un peu au-dessous de la bande due à l'acide caféique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Il peut également présenter d'autres bandes de faible fluorescence. A la lumière du jour, seules apparaissent clairement sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les bandes orangées dues à la rutine et à l'isoquercitroside.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 8 pour cent de fragments de pédicules grossiers et d'autres éléments étrangers et au maximum 15 pour cent de fleurs de couleur altérée, brune. Effectuez la détermination sur 10 g de fleur de sureau.

***Sambucus ebulus L***. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 0,5 g de fleur de sureau pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL de *méthanol R*. Chauffez dans un bain-marie à 65 °C pendant 5 min, en agitant fréquemment. Laissez refroidir et filtrez. Complétez le filtrat à 10 mL avec du *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 1 mg d'*acide chlorogénique R*, 1 mg d'*acide caféique R*, 2,5 mg d'*hypéroside R* et 2,5 mg de *rutine R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, méthyléthylcétone R, acétate d'éthyle R* (10:10:30:50 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez sur la plaque encore chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R*, puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R*. Laissez sécher à l'air pendant 30 min et examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente, dans sa moitié inférieure et par ordre de $R_F$ croissant, une bande de fluorescence orangée (rutine), une bande de fluorescence bleu clair (acide chlorogénique) et une bande de fluorescence jaune-orange ou brun-orange (hypéroside) et, dans son tiers supérieur, une bande de fluorescence bleu-vert (acide caféique). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande rose située au-dessous de la bande due à la rutine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de fleur de sureau pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

DOSAGE

*Solution mère*. Dans un ballon à fond rond de 100 mL, introduisez 0,600 g de fleur de sureau pulvérisée (355) (*2.9.12*), puis ajoutez 1 mL d'une solution d'*hexaméthylènetétramine R* à 5 g/L, 20 mL d'*acétone R* et 2 mL d'*acide chlorhydrique R1*. Chauffez à reflux pendant 30 min. Filtrez le mélange sur un tampon de coton hydrophile en recueillant le filtrat dans une fiole. Ajoutez le coton hydrophile au résidu contenu dans le ballon à fond rond, et extrayez avec 2 fois 20 mL d'*acétone R*, en chauffant chaque fois à reflux pendant 10 min. Laissez refroidir, puis filtrez à travers un tampon de coton hydrophile en recueillant le filtrat dans la fiole. Après refroidissement, filtrez les extraits à l'acétone réunis à travers un papier filtre dans une fiole jaugée, puis complétez à 100,0 mL avec de l'*acétone R* en rinçant la fiole et le papier filtre. Placez 20,0 mL de cette solution dans une ampoule à décantation, ajoutez 20 mL d'*eau R* et agitez le mélange avec 1 fois 15 mL, puis 3 fois 10 mL d'*acétate d'éthyle R*. Réunissez les extraits à l'acétate d'éthyle dans une ampoule à décantation, lavez avec 2 fois 50 mL d'*eau R*, puis filtrez sur 10 g de *sulfate de sodium anhydre R* en recueillant le filtrat dans une fiole jaugée. Complétez à 50,0 mL avec de l'*acétate d'éthyle R*.

*Solution à examiner*. A 10,0 mL de solution mère, ajoutez 1 mL de *réactif au chlorure d'aluminium R* et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide acétique glacial R* à 5 pour cent *V/V* dans du *méthanol R*.

*Liquide de compensation*. Prélevez 10,0 mL de solution mère et complétez à 25,0 mL avec une solution d'*acide acétique glacial R* à 5 pour cent *V/V* dans du *méthanol R*.

Après 30 min, mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner à 425 nm, par comparaison au liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en flavonoïdes, exprimés en isoquercitroside, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

en prenant 500 comme valeur de l'absorbance spécifique de l'isoquercitroside.

| | | |
|---|---|---|
| *A* | = | absorbance à 425 nm, |
| *m* | = | masse de la prise d'essai, en grammes. |

**01/2008:1441**

# TEMOE LAWACQ

## Curcumae xanthorrhizae rhizoma

DÉFINITION

Rhizome coupé en tranches et séché de *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. (*C. xanthorrhiza* D. Dietrich).

*Teneur* :

– *huile essentielle* : au minimum 50 mL/kg (drogue anhydre),
– *dérivés du dicinnamoylméthane, exprimés en curcumine* ($C_{21}H_{20}O_6$ ; $M_r$ 368,4) : au minimum 1,0 pour cent (drogue anhydre).

CARACTÈRES

Odeur aromatique.

Drogues végétales

IDENTIFICATION

A. Tranches, jaune orangé ou brun-jaune ou brun-gris, généralement pelées, d'une épaisseur de 1,5-6 mm et d'un diamètre de 15-50 mm pouvant dans de rares cas atteindre 70 mm. Des fragments de suber gris-brun sont parfois présents. La section transversale est jaune, avec un centre plus clair présentant des taches sombres. La cassure est courte et finement grenue.

B. Réduisez le temoe lawacq en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-rouge. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de parenchyme incolore contenant des cellules sécrétrices jaune orangé ou brun-jaune ; des fragments de vaisseaux, notamment réticulés ; de rares fragments de suber et d'épiderme ainsi que des fragments de poils unicellulaires acuminés à paroi épaisse. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente de nombreux grains d'amidon stratifiés, de forme ovale ou irrégulière d'une longueur d'environ 30-50 µm et d'une largeur d'environ 10-30 µm, avec un hile excentré et des stries concentrées prononcées.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications de l'essai de *Curcuma domestica* avec les modifications suivantes.

   *Détection* : pulvérisez une solution récemment préparée de *dichloroquinonechlorimide R* à 0,4 g/L dans le *2-propanol R*. Exposez aux vapeurs d'ammoniac jusqu'à virage au violet-bleu de la bande due au thymol.

   *Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente à peu près à mi-hauteur une bande violet-bleu (thymol) et dans la partie inférieure une bande jaune (fluorescéine). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande bleue (xanthorrhizol) légèrement au-dessus de la bande due au thymol dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, et 2 bandes brun-jaune ou brunes (curcumine et déméthoxycurcumine) entre les bandes dues au thymol et à la fluorescéine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

***Curcuma domestica***. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Agitez 0,5 g de temoe lawacq récemment pulvérisé (500) (*2.9.12*) avec 5 mL de *méthanol R* pendant 30 min, puis filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *fluorescéine R* et 10 mg de *thymol R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, toluène R* (20:80 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez un mélange de 1 volume d'*acide sulfurique R* et de 9 volumes d'*anhydride acétique R*. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande de fluorescence rouge-jaune (bisdéméthoxycurcumine) légèrement au-dessus de la bande de fluorescence bleu-vert due à la fluorescéine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

**Eau** (*2.2.13*) : au maximum 120 mL/kg, déterminé sur 20,0 g de temoe lawacq pulvérisé (500) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 8,0 pour cent.

DOSAGE

**Huile essentielle**. Effectuez la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (*2.8.12*). Utilisez un ballon à fond rond de 500 mL, 200 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement et 0,5 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Réduisez le temoe lawacq en poudre (500) (*2.9.12*) et procédez immédiatement à la détermination sur 5,0 g de poudre. Distillez à un débit de 3-4 mL/min pendant 3 h.

**Dérivés du dicinnamoylméthane**. A 0,100 g de temoe lawacq pulvérisé (180) (*2.9.12*), ajoutez 60 mL d'*acide acétique glacial R* et chauffez dans un bain-marie à 90 °C pendant 60 min. Ajoutez 2,0 g d'*acide borique R* et 2,0 g d'*acide oxalique R* et chauffez dans un bain-marie à 90 °C pendant 10 min. Laissez refroidir, complétez à 100,0 mL avec de l'*acide acétique glacial R* et agitez. Prélevez 5,0 mL du surnageant limpide et complétez à 50,0 mL avec de l'*acide acétique glacial R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 530 nm en utilisant l'*acide acétique glacial R* comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en dérivés du dicinnamoylméthane, exprimés en curcumine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 0,426}{m}$$

en prenant 2350 comme valeur de l'absorbance spécifique de la curcumine.

$A$ = absorbance à 530 nm,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2008:1627**
**corrigé 7.0**

# TÉRÉBENTHINE TYPE PINUS PINASTER (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Terebinthinae aetheroleum a Pino pinastro

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau, suivi de rectification à une température inférieure à 180 °C, de l'oléorésine obtenue par gemmage de *Pinus pinaster* Aiton. Un antioxydant approprié peut être ajouté.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide limpide, incolore ou jaune pâle.

Odeur caractéristique.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

   *Solution à examiner*. Mélangez 1 mL d'huile essentielle à examiner avec du *toluène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

   *Solution témoin*. Mélangez 10 µL de *β-pinène* R et 10 µL de *linalol R* avec du *toluène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

   *Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

   *Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

   *Dépôt* : 10 µL, en bandes.

   *Développement* : sur un parcours de 15 cm.

   *Séchage* : à l'air.

   *Détection* : pulvérisez une *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min. Examinez à la lumière du jour.

   *Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| β-Pinène : une bande rose | Une bande rose (β-pinène) |
| | Une bande rose |
| _______ | _______ |
| Linalol : une bande gris-rose | |
| | 3 bandes violettes de faible intensité |
| | Une bande jaune de faible intensité |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables, quant à leur temps de rétention, aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,856 à 0,872.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,465 à 1,475.

**Angle de rotation optique** (*2.2.7*) : – 40° à – 28°.

**Indice d'acide** (*2.5.1*) : au maximum 1,0.

**Indice de peroxyde** (*2.5.5, Procédé B*) : au maximum 20.

**Huiles grasses et huiles essentielles résinifiées** (*2.8.7*). L'huile essentielle à examiner satisfait à l'essai des huiles grasses et huiles essentielles résinifiées.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner.* L'huile essentielle à examiner.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 30 µL d'*α-pinène R*, 10 mg de *camphène R*, 20 µL de *β-pinène R*, 10 µL de *car-3-ène R*, 10 µL de *β-myrcène R*, 20 µL de *limonène R*, 10 µL de *longifolène R*, 10 µL de *β-caryophyllène R* et 10 mg d'*oxyde de caryophyllène R* dans 1 mL d'*hexane R*.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 5 µL de *β-caryophyllène R* dans de l'*hexane R* et complétez à 1 mL avec le même solvant. Prélevez 0,1 mL de solution et complétez à 1 mL avec de l'*hexane R*.

*Colonne* :
- *matériau* : silice fondue,
- *dimensions* : $l$ = 60 m, Ø = 0,25 mm,
- *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur du film 0,25 µm).

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R.*

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Rapport de division* : 1:63.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 10 | 60 |
| | 10 - 80 | 60 → 200 |
| | 80 - 120 | 200 |
| Chambre à injection | | 200 |
| Détecteur | | 250 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 0,5 µL.

*Ordre d'élution* : ordre donné pour la préparation de la solution témoin (a) ; notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* :
- *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au car-3-ène et au β-myrcène dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a), localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner les composants de la solution témoin (a).

Déterminez la teneur pour cent de ces composants. Ces teneurs sont comprises dans les limites suivantes :
- *α-pinène* : 70,0 pour cent à 85,0 pour cent,
- *camphène* : 0,5 pour cent à 1,5 pour cent,
- *β-pinène* : 11,0 pour cent à 20,0 pour cent,
- *car-3-ène* : au maximum 1,0 pour cent,
- *β-myrcène* : 0,4 pour cent à 1,5 pour cent,
- *limonène* : 1,0 pour cent à 7,0 pour cent,
- *longifolène* : 0,2 pour cent à 2,5 pour cent,
- *β-caryophyllène* : 0,1 pour cent à 3,0 pour cent,
- *oxyde de caryophyllène* : au maximum 1,0 pour cent,
- *limite d'exclusion* : la surface du pic dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,05 pour cent).

**Résidu à l'évaporation** (*2.8.9*) : au maximum 2,5 pour cent, déterminé après chauffage au bain-marie pendant 3 h.

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

**04/2009:0865**

# THYM

## Thymi herba

DÉFINITION

Feuille et fleur entière, détachée des tiges préalablement séchées de *Thymus vulgaris* L. ou de *Thymus zygis* L., ou d'un mélange de ces 2 espèces.

*Teneur* :
- *huile essentielle* : au minimum 12 mL/kg (drogue anhydre),
- *somme des teneurs en thymol et carvacrol* (chacun $C_{10}H_{14}O$ ; $M_r$ 150,2) : au minimum 40 pour cent dans l'huile essentielle.

CARACTÈRES

Forte odeur aromatique, rappelant le thymol.

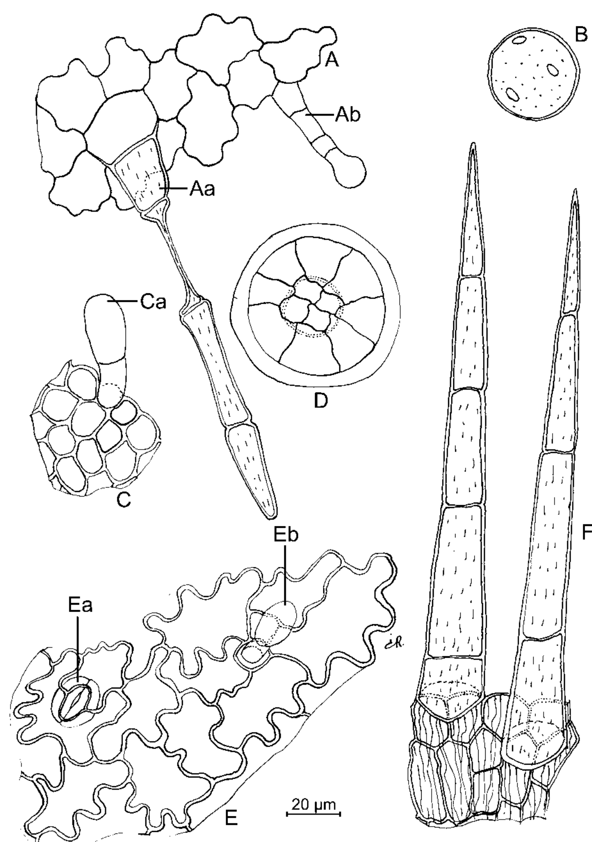
IDENTIFICATION

A. La feuille de *Thymus vulgaris* a généralement une longueur de 4-12 mm et une largeur d'au maximum 3 mm ; elle est sessile ou très brièvement pétiolée. Le limbe est coriace, entier, lancéolé ou ovale, recouvert sur les 2 faces d'un indument gris ou gris-vert ; les bords sont fortement enroulés vers la face abaxiale. La nervure médiane est déprimée à la face adaxiale et très proéminente à la face abaxiale. Le calice est vert, souvent parsemé de violet et tubuleux ; il comporte à son extrémité 2 lèvres : la lèvre supérieure est recourbée et se termine en 3 lobes et la lèvre inférieure, plus longue, a 2 dents ciliées. Le tube du calice, après floraison, est obturé par une couronne de poils longs et raides. La corolle, environ 2 fois plus longue que le calice, est le plus souvent brunâtre à l'état desséché et faiblement bilabiée.

La feuille de *Thymus zygis* a généralement une longueur de 1,7-6,5 mm et une largeur de 0,4-1,2 mm ; elle est aciculée ou linéaire-lancéolée et ses bords sont fortement enroulés vers la face abaxiale. Les 2 faces du limbe sont vert ou gris-vert, avec une nervure médiane parfois violette ; ses bords, en particulier au niveau de la partie basale, sont garnis de longs poils blancs. Les fleurs desséchées sont très semblables à celles de *Thymus vulgaris*.

B. Réduisez le thym en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre des 2 espèces est vert-gris ou brun-vert. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R.* Les épidermes des feuilles présentent des cellules à parois anticlinales sinueuses, à épaississements en forme de

chapelet et des stomates de type diacytique (*2.8.3*) ; de nombreux poils sécréteurs composés de 12 cellules sécrétrices dont la cuticule commune est soulevée par la sécrétion et prend la forme d'une vésicule globuleuse ou ovoïde ; des poils glanduleux à pédicelle unicellulaire et à tête globuleuse ou ovoïde ; des poils tecteurs de l'épiderme adaxial, communs aux 2 espèces, à paroi verruqueuse, en forme de dents pointues ; des poils tecteurs verruqueux de l'épiderme abaxial, de plusieurs types : unicellulaires dressés ou légèrement incurvés et bicellulaires ou tricellulaires, articulés, le plus souvent coudés (*Thymus vulgaris*) ; des poils bicellulaires ou tricellulaires, plus ou moins dressés (*Thymus zygis*). Les fragments du calice sont recouverts par de nombreux poils articulés, unisériés, formés de 5-6 cellules, à parois faiblement striées. Les fragments de la corolle portent de nombreux poils tecteurs unisériés, souvent collabés, et des poils sécréteurs composés généralement de 12 cellules. Les grains de pollen, relativement rares, sont sphériques, lisses, à 6 pores germinatifs en fente et mesurent environ 35 µm de diamètre. La poudre de *Thymus zygis* contient, en outre, de nombreux faisceaux épais de fibres provenant des nervures principales et des fragments de tiges.




A. Epiderme de la surface externe de la corolle, vu de face, présentant un poil tecteur avec une cellule collabée (Aa) et un poil glanduleux à tête unicellulaire (Ab)

B. Grain de pollen à 6 pores germinatifs (dont 3 seulement sont visibles dans le dessin)

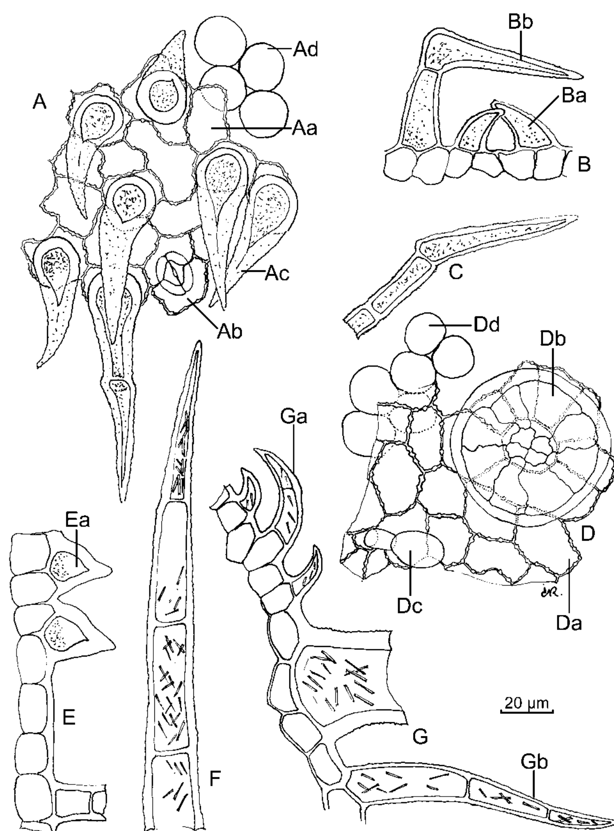
C. Epiderme de la corolle inférieure avec poil glanduleux (Ca)

D. Poil sécréteur à 12 cellules

E. Epiderme externe de la corolle supérieure, vu de face, avec stomates diacytiques (Ea) et poil glanduleux (Eb)

F. Epiderme du calice, vu de face, avec poils tecteurs

Figure 0865.-1. – *Dessin pour l'identification de Thymus vulgaris* L. *(voir Identification B)*




A. Epiderme supérieur, vu de face, à cellules à épaississement en forme de chapelet (Aa), stomates diacytiques (Ab) et poils tecteurs à parois verruqueuses (Ac), avec parenchyme palissadique sous-jacent (Ad)

B et E. Epiderme, vu en section transversale, avec poils tecteurs unicellulaires (Ba, Ea) et poil tecteur bicellulaire articulé (Bb)

C. Poil tecteur tricellulaire articulé

D. Epiderme supérieur, vu de face, à cellules à épaississement en forme de chapelet (Da), poil sécréteur à 12 cellules sécrétrices (Db), et poil glanduleux à tête unicellulaire (Dc), avec parenchyme palissadique sous-jacent (Dd)

F. Poil tecteur pluricellulaire de la base du limbe (*T. zygis*)

G. Epiderme, vu en section transversale, avec poils tecteurs bicellulaires (Ga) et tricellulaires (Gb) (*T. zygis*)

Figure 0865.-2. – *Dessin pour l'identification de Thymus zygis* L. *(voir Identification B)*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* A 1,0 g de thym pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 5 mL de *chlorure de méthylène R* et agitez pendant 3 min. Filtrez sur environ 2 g de *sulfate de sodium anhydre R.*

*Solution témoin.* Dissolvez 5 mg de *thymol R* et 10 µL de *carvacrol R* dans 10 mL de *chlorure de méthylène R.*

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R.*

*Phase mobile* : *chlorure de méthylène R.*

*Dépôt* : 20 µL en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

Drogues végétales

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| | Une bande d'atténuation de fluorescence marquée |
| Thymol : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence (thymol) |
| ——— | ——— |
| | Bandes d'atténuation de fluorescence |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez 10 mL de *solution d'aldéhyde anisique R* pour une plaque de 200 mm de côté. Chauffez à 100-105 °C pendant 10 min.

*Résultats B* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes sont également présentes dans le tiers inférieur du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner. L'intensité des bandes dues au thymol et au carvacrol est fonction de l'espèce examinée.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| Thymol : une bande rose-brun | Une bande rose-brun (thymol) |
| Carvacrol : une bande violet clair | Une bande violet clair (carvacrol) |
| ——— | ——— |
| | Une bande rose-gris |
| | Une bande violette (cinéole et linalol) |
| | Une bande brun-gris (bornéol) |
| | Une bande bleu-violet |
| | Une bande intense violette |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

D. Examinez les chromatogrammes obtenus dans le dosage du thymol et du carvacrol.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur temps de rétention aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 10 pour cent de tiges et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers. Les tiges ne doivent pas avoir un diamètre supérieur à 1 mm et une longueur supérieure à 15 mm. Des feuilles portant de longs poils à leur base et faiblement pubescentes aux autres parties (*Thymus serpyllum* L.) sont absentes.

**Eau** (*2.2.13*) : au maximum 100 mL/kg, déterminé sur 20,0 g de thym pulvérisé (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 15,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 3,0 pour cent.

DOSAGE

**Huile essentielle** (*2.8.12*). Utilisez 30,0 g de thym, un ballon de 1000 mL et 400 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Distillez à un débit de 2-3 mL/min pendant 2 h, sans *xylène R* dans le tube gradué.

**Thymol et carvacrol**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner*. Filtrez l'huile essentielle obtenue par le dosage de l'huile essentielle sur une petite quantité de *sulfate de sodium anhydre R* et complétez à 5,0 mL avec de l'*hexane R* en rinçant l'appareil et le sulfate de sodium anhydre.

*Solution témoin*. Dissolvez 0,20 g de *thymol R* et 50 mg de *carvacrol R* dans de l'*hexane R* et complétez à 5,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 30-60 m, Ø = 0,25 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R* (épaisseur du film 0,25 µm).

*Gaz vecteur* : *azote pour chromatographie R* ou *hélium pour chromatographie R*.

*Débit* : 1-2 mL/min.

*Rapport de division* : 1:100.

*Température* :

| | Intervalle (min) | Température (°C) |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 45 | 40 → 220 |
| Chambre à injection | | 190 |
| Détecteur | | 210 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 0,2 µL.

*Ordre d'élution* : ordre indiqué pour la préparation de la solution témoin. Notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au thymol et au carvacrol.

A l'aide des temps de rétention déterminés à partir du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez les composants de la solution témoin sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Déterminez la teneur pour cent en thymol et en carvacrol.

**01/2008:1374**

# THYM (HUILE ESSENTIELLE DE)

## Thymi aetheroleum

DÉFINITION

Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau des parties aériennes fleuries fraîches de *Thymus vulgaris* L., de *T. zygis* Loefl. ex L. ou d'un mélange des 2 espèces.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide mobile, limpide, de couleur jaune ou brun-rouge très foncé.

Odeur caractéristique, aromatique, épicée, rappelant celle du thymol.

*Solubilité* : miscible à l'éthanol et à l'éther de pétrole.

IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A.*

A. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Dissolvez 0,2 g d'huile essentielle de thym dans du *pentane R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin.* Dissolvez 0,15 g de *thymol R*, 25 mg d'*α-terpinéol R*, 40 µL de *linalol R* et 10 µL de *carvacrol R* dans du *pentane R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acétate d'éthyle R, toluène R* (5:95 *V/V*).

*Dépôt* : 20 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez la plaque à 100-105 °C pendant 5-10 min tout en l'observant. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande violette importante (hydrocarbures) (front de solvant) |
| Thymol : une bande rose-brun | Une bande rose-brun (thymol) |
| Carvacrol : une bande violet pâle | Une bande violet pâle (carvacrol) |
| Linalol : une bande violette | Une bande violette (linalol) |
| α-Terpinéol : une bande violette | Une bande violette (α-terpinéol) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai du profil chromatographique.

*Résultats* : les pics caractéristiques du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables, quant à leur temps de rétention, aux pics du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,915 à 0,935.

**Indice de réfraction** (*2.2.6*) : 1,490 à 1,505.

**Profil chromatographique**. Chromatographie en phase gazeuse (*2.2.28*) : utilisez le procédé de normalisation.

*Solution à examiner.* Huile essentielle de thym.

*Solution témoin.* Dissolvez 0,15 g de *β-myrcène R*, 0,1 g de *γ-terpinène R*, 0,1 g de *p-cymène R*, 0,1 g de *linalol R*, 0,2 g de *terpinén-4-ol R*, 0,2 g de *thymol R* et 50 mg de *carvacrol R* dans 5 mL d'*hexane R*.

*Colonne* :

– *matériau* : silice fondue,
– *dimensions* : *l* = 30 m (une épaisseur de film de 1 µm peut être utilisée) à 60 m (une épaisseur de film de 0,2 µm peut être utilisée), Ø = 0,25-0,53 mm,
– *phase stationnaire* : *macrogol 20 000 R*.

*Gaz vecteur* : *hélium pour chromatographie R*.

*Rapport de division* : 1:100.

*Température* :

| | **Intervalle (min)** | **Température (°C)** |
|---|---|---|
| Colonne | 0 - 15 | 60 |
| | 15 - 55 | 60→180 |
| Chambre à injection | | 200 |
| Détecteur | | 220 |

*Détection* : ionisation de flamme.

*Injection* : 0,2 µL.

*Ordre d'élution* : ordre donné pour la préparation de la solution témoin. Notez les temps de rétention de ces substances.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *résolution* : au minimum 1,5 entre les pics dus au thymol et au carvacrol,
– *nombre de plateaux théoriques* : au minimum 30 000 calculé pour le pic du *p*-cymène à 80 °C.

A l'aide des temps de rétention déterminés avec le chromatogramme obtenu avec la solution témoin, localisez sur le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, les composants de la solution témoin. Ne tenez pas compte du pic dû à l'hexane.

Déterminez la teneur pour cent de ces composants. Ces teneurs sont comprises dans les limites suivantes :

– *β-myrcène* : 1,0 pour cent à 3,0 pour cent,
– *γ-terpinène* : 5,0 pour cent à 10,0 pour cent,
– *p-cymène* : 15,0 pour cent à 28,0 pour cent,
– *linalol* : 4,0 pour cent à 6,5 pour cent,
– *terpinén-4-ol* : 0,2 pour cent à 2,5 pour cent,
– *thymol* : 36,0 pour cent à 55,0 pour cent,
– *carvacrol* : 1,0 pour cent à 4,0 pour cent.

CONSERVATION

A une température ne dépassant pas 25 °C.

**01/2008:0957**
**corrigé 6.0**

# TILLEUL (FLEUR DE)

## Tiliae flos

DÉFINITION

Inflorescence entière séchée de *Tilia cordata* Miller, de *Tilia platyphyllos* Scop., de *Tilia* × *vulgaris* Heyne ou d'un mélange.

CARACTÈRES

Faible odeur aromatique.

Saveur légèrement sucrée et mucilagineuse.

IDENTIFICATION

A. L'inflorescence est vert-jaune. L'axe principal de l'inflorescence comporte une bractée linguiforme, membraneuse, vert-jaune, pratiquement glabre qui lui est soudée jusqu'à environ la moitié de sa nervure médiane. L'inflorescence est constituée le plus souvent par 2-7 fleurs, occasionnellement allant jusqu'à 16. Les sépales se détachent facilement du périanthe ; ils atteignent jusqu'à 6 mm de longueur, leur face abaxiale est le plus souvent glabre, leur face adaxiale et leurs bords sont fortement velus. Les 5 pétales spatulés, minces, blanc-jaune, atteignent jusqu'à 8 mm de longueur ; ils présentent une nervation fine et seuls leurs bords sont quelquefois recouverts de poils isolés. Les nombreuses étamines sont libres et forment généralement 5 groupes. L'ovaire est supère et porte un style muni d'un stigmate divisé en 5 lobes peu distincts.

B. Séparez l'inflorescence en ses différentes parties. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. L'épiderme adaxial de la bractée présente des cellules à parois anticlinales droites ou légèrement sinueuses ; l'épiderme abaxial présente des cellules à parois anticlinales ondulées-sinueuses et des stomates de type anomocytique (*2.8.3*). Au niveau du mésophylle, des cellules isolées renfermant de petites macles d'oxalate de calcium, sont présentes. Le parenchyme des sépales présente, notamment au voisinage des nervures, de nombreuses cellules à mucilage et des cellules contenant de petites macles d'oxalate de calcium. L'épiderme adaxial des sépales comporte des poils tecteurs à parois épaisses, unicellulaires, ou disposés en étoiles pouvant comporter jusqu'à 5 cellules. Les cellules épidermiques des pétales présentent des parois anticlinales droites à cuticule striée ; les stomates sont absents. Le parenchyme des pétales présente de petites macles d'oxalate de calcium et, surtout dans sa partie acuminale, des cellules à mucilage. Les grains de pollen, d'un diamètre d'environ 30-40 µm, sont ovales ou légèrement triangulaires ; ils comportent 3 pores germinatifs et une exine finement granulée. L'ovaire est glabre ou recouvert de poils abondants, souvent très emmêlés, unicellulaires ou disposés en étoiles comptant 2-4 branches.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Agitez 1,0 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*) dans 10 mL de *méthanol R* dans un bain-marie à 65 °C pendant 5 min. Laissez refroidir et filtrez.

*Solution témoin.* Dissolvez 2,0 mg d'*acide caféique R*, 5 mg d'*hypéroside R* et 5 mg de *rutine R* dans 10 mL de *méthanol R*.

Drogues végétales

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, méthyléthylcétone R, acétate d'éthyle R* (10:10:30:50 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C.

*Détection* : pulvérisez sur la plaque encore chaude une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans du *méthanol R*. Pulvérisez ensuite une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans du *méthanol R*. Laissez sécher pendant environ 30 min et examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin présente, dans l'ordre croissant de $R_F$, les bandes de fluorescence orange-jaune ou orange-brun dues à la rutine et à l'hypéroside et une bande de fluorescence bleu-vert due à l'acide caféique. Dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, la bande principale de fluorescence jaune-brun ou orange est située très légèrement au-dessus de la bande due à l'hypéroside dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. A la lumière du jour, cette bande est également la bande principale. Au niveau du $R_F$ de la bande due à la rutine se trouve une bande de fluorescence jaune-brun. En dessous de cette bande, 2 bandes de fluorescence jaune peuvent être présentes. Entre les bandes dues à la rutine et à l'hypéroside, des bandes de fluorescence orange et jaune sont visibles. Entre les bandes dues à l'hypéroside et à l'acide caféique, jusqu'à 5 bandes de fluorescence jaune ou orange sont présentes. Immédiatement au-dessous de la bande due à l'acide caféique, se situe une bande de fluorescence bleue.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 2 pour cent, déterminé sur 30 g de fleur de tilleul. La fleur de tilleul ne contient pas d'inflorescences dont la face abaxiale de la bractée porte des poils tecteurs en étoile, formés de 5-8 éléments, dont la corolle paraît être double à la suite d'une transformation de 5 étamines en staminodes ayant la forme de pétales, et dont le stigmate n'est ni lobé ni fendu. Des fleurs hexamères ne sont présentes qu'occasionnellement (*Tilia americana* L., *Tilia tomentosa* Moench).

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 8,0 pour cent.

**07/2010:1478**

# TORMENTILLE

## Tormentillae rhizoma

DÉFINITION

Rhizome séché, entier ou fragmenté, dépourvu de racines, de *Potentilla erecta* (L.) Raeusch. (*P. tormentilla* Stokes).

*Teneur* : au minimum 7 pour cent de tanins, exprimés en pyrogallol ($C_6H_6O_3$ ; $M_r$ 126,1) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Le rhizome est cylindrique et fusiforme, d'aspect très irrégulier, formant souvent des sortes de tubercules noueux, tortueux ; il a une longueur atteignant 10 cm et une épaisseur de 1-2 cm ; il est très dur et peu ramifié. Sa surface, brune à brun-rouge, est rugueuse et porte des restes de racines ; elle présente de profondes cicatrices transversales, blanchâtres, correspondant aux tiges. L'extrémité du rhizome peut porter des restes de nombreuses tiges aériennes. La cassure, rouge sombre à jaune-brun, est courte et granuleuse.

B. Réduisez la tormentille en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-rouge. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des macles d'oxalate de calcium en dents de scie grossières, d'un diamètre atteignant 60 µm ; des fragments de parenchyme composé de cellules à paroi mince contenant des tanins brun-rouge ; des groupes de vaisseaux étroits à ponctuation aréolée et pores latéraux ; des cellules parenchymateuses polygonales à paroi épaisse et ponctuée ; des groupes et fragments de fibres sclérenchymateuses à paroi épaisse ; parfois des fragments de suber à cellules rectangulaires aplaties, brunes, à paroi mince. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente des grains d'amidon sphériques ou elliptiques, d'une longueur atteignant environ 20 µm.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 0,5 g de tormentille pulvérisée (355) (*2.9.12*), ajoutez 10 mL d'*eau R*, agitez pendant 10 min, puis filtrez. Agitez le filtrat avec 2 fois 10 mL d'*acétate d'éthyle R*, réunissez les phases supérieures et filtrez sur 6 g de *sulfate de sodium anhydre R*. Evaporez le filtrat à siccité sous pression réduite et reprenez le résidu par 1,0 mL d'*acétate d'éthyle R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 1,0 mg de *catéchine R* dans 1,0 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, éther R, hexane R, acétate d'éthyle R* (20:20:20:40 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air pendant 10-15 min.

*Détection* : pulvérisez une solution de *sel de bleu solide B R* à 5 g/L, récemment préparée ; des bandes rougeâtres apparaissent. Exposez la plaque aux vapeurs d'ammoniac ; les bandes deviennent plus intenses et virent au brun-rouge. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes moins intenses sont présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Catéchine : une bande brun-rouge intense | Une bande brun-rouge plus intense (catéchine) |
| | Une bande de plus faible intensité |
| | Une bande intense |
| | Des bandes de plus faible intensité |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 3 pour cent de racines, de tiges et de rhizomes présentant une cassure noire et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Cadmium** (*2.4.27*) : au maximum 2,0 ppm.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de tormentille pulvérisée (355) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 5,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez la détermination des tanins dans les drogues végétales (*2.8.14*). Utilisez 0,500 g de tormentille pulvérisée (180) (*2.9.12*).

**01/2008:1895**

# TORMENTILLE (TEINTURE DE)

## Tormentillae tinctura

DÉFINITION

Teinture produite à partir de *Tormentille (1478)*.

*Teneur* : au minimum 1,5 pour cent *m/m* de tanins, exprimés en pyrogallol ($C_6H_6O_3$ ; $M_r$ 126,1).

PRODUCTION

La teinture est produite à partir de 1 partie de drogue fragmentée et de 5 parties d'éthanol à 70 pour cent *V/V* par une méthode appropriée.

CARACTÈRES

Liquide rouge ou brun-rouge.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Mélangez 1,0 mL de teinture de tormentille avec 1,0 mL d'*alcool à 70 pour cent V/V R*.

*Solution témoin.* Dissolvez 1,0 mg de *catéchine R* dans 1,0 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *éther R, acide acétique glacial R, hexane R, acétate d'éthyle R* (20:20:20:40 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air pendant 10-15 min.

*Détection* : pulvérisez avec une solution récemment préparée de *sel de bleu solide B R* à 5 g/L. Des bandes rougeâtres apparaissent. Exposez la plaque à des vapeurs d'ammoniac, les bandes deviennent plus intenses et virent au brun-rouge. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| Catéchine : une bande intense | Une bande intense (catéchine) |
| ——— | ——— |
| | Une bande de plus faible intensité |
| | Une bande intense |
| | Des bandes de plus faible intensité |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Ethanol** (*2.9.10*) : 64 pour cent *V/V* à 69 pour cent *V/V*.

**Méthanol et 2-propanol** (*2.9.11*) : au maximum 0,05 pour cent *V/V* de méthanol et au maximum 0,05 pour cent *V/V* de 2-propanol.

DOSAGE

Effectuez la détermination des tanins dans les drogues végétales (*2.8.14*). Utilisez 2,50 g de teinture de tormentille.

**07/2010:2400**

# VALÉRIANE (EXTRAIT AQUEUX SEC DE)

## Valerianae extractum aquosum siccum

DÉFINITION

Extrait produit à partir de *Racine de valériane (0453)*.

*Teneur* : au minimum 0,02 pour cent d'acides sesquiterpéniques, exprimés en acide valérénique ($C_{15}H_{22}O_2$ ; $M_r$ 234,3) (extrait desséché).

PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec de l'eau au minimum à 60 °C.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre brune ou brunâtre, hygroscopique.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Mettez en suspension 1,0 g d'extrait à examiner dans 10 mL de *méthanol R* et traitez aux ultrasons pendant 10 min. Filtrez le surnageant sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm). Utilisez le filtrat comme solution à examiner.

*Solution témoin.* Dissolvez 5 mg d'*acide acétoxyvalérénique R* et 5 mg d'*acide valérénique R* dans 20 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, acétate d'éthyle R, cyclohexane R* (2:38:60 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL [ou 5 µL] en bandes de 10 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Une bande violette faible due à l'acide valérénique peut être présente dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| Acide valérénique : une bande violette | |
| Acide acétoxyvalérénique : une bande violette | Une bande violette (acide acétoxyvalérénique) |
| ——— | ——— |
| | Une bande violette (acide hydroxyvalérénique) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.8.17*) : au maximum 6,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Mélange de solvants* : *méthanol R, eau R* (50:50 *V/V*).

*Solution à examiner.* Dans une fiole conique de 300 mL, mettez en suspension 1,00 g d'extrait à examiner dans 40 mL d'*eau R*, tout en agitant. Ajoutez 40 mL de *méthanol R* et agitez pendant 1 h à 200 tr/min. Filtrez la suspension dans une fiole jaugée et rincez la fiole conique avec 3 fois 5 mL du mélange de solvants. Complétez à 100,0 mL avec le mélange de solvants.

*Solution témoin (a).* Dissolvez une quantité d'*extrait sec de valériane ERV* correspondant à 1,0 mg d'acide valérénique dans du *méthanol R* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant. Traitez aux ultrasons pendant 10 min puis filtrez sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm).

*Solution témoin (b).* Prélevez 1,0 mL de solution témoin (a) et complétez à 50,0 mL avec du *méthanol R*.

*Colonne* :
- *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* :
- *phase mobile A* : *acétonitrile R1*, solution d'*acide phosphorique R* à 5 g/L (20:80 *V/V*),
- *phase mobile B* : solution d'*acide phosphorique R* à 5 g/L, *acétonitrile R1* (20:80 *V/V*),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 5 | 55 | 45 |
| 5 - 18 | 55 → 20 | 45 → 80 |
| 18 - 22 | 20 | 80 |

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 220 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Identification des pics* : utilisez le chromatogramme fourni avec l'*extrait sec de valériane ERV* et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) pour identifier les pics dus à l'acide acétoxyvalérénique et à l'acide hydroxyvalérénique.

*Rétention relative* par rapport à l'acide valérénique (temps de rétention = environ 19 min) : acide hydroxyvalérénique = environ 0,2 ; acide acétoxyvalérénique = environ 0,5.

Calculez la teneur pour cent en acides sesquiterpéniques, exprimés en acide valérénique, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{(A_1 + A_2) \times m_2 \times p \times 0,2}{A_3 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'acide hydroxyvalérénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'acide acétoxyvalérénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_3$ = surface du pic dû à l'acide valérénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b),

$m_1$ = masse de l'extrait à examiner utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse de l'*extrait sec de valériane ERV* utilisée pour préparer la solution témoin (a), en grammes,

$p$ = teneur pour cent en acide valérénique de l'*extrait sec de valériane ERV*.

**01/2008:1898**

# VALÉRIANE (EXTRAIT HYDROALCOOLIQUE SEC DE)

## Valerianae extractum hydroalcoholicum siccum

### DÉFINITION

Extrait produit à partir de *Racine de valériane (0453)*.

*Teneur* : au minimum 0,25 pour cent *m/m* d'acides sesquiterpéniques, exprimés en acide valérénique ($C_{15}H_{22}O_2$ ; $M_r$ 234,3) (extrait desséché).

### PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue, par une méthode appropriée, en utilisant de l'éthanol de 45 à 80 pour cent *V/V* ou du méthanol de 40 à 55 pour cent *V/V*.

### CARACTÈRES

*Aspect* : poudre brune, hygroscopique.

### IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Mettez en suspension 1 g d'extrait à examiner dans 10 mL de *méthanol R* et traitez aux ultrasons pendant 10 min. Filtrez le surnageant sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm). Utilisez le filtrat comme solution à examiner.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg d'*acide acétoxyvalérénique R* et 5 mg d'*acide valérénique R* dans 20 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, acétate d'éthyle R, cyclohexane R* (2:38:60 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL [ou 5 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes violettes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Acide valérénique : une bande violette | Une bande violette (acide valérénique) |
| Acide acétoxyvalérénique : une bande violette | Une bande violette (acide acétoxyvalérénique) |
| _______ | _______ |
| | 2 bandes violet pâle ou très pâle |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

### ESSAI

**Perte à la dessiccation** (*2.8.17*) : au maximum 6,0 pour cent.

### DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Mettez en suspension 1,00 g d'extrait à examiner dans 50,0 mL de *méthanol R1*, traitez aux ultrasons pendant 10 min puis filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez une quantité d'*extrait sec titré de valériane SCR* correspondant à 1,0 mg d'acide valérénique dans du *méthanol R1* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Colonne* :
- *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* :
- *phase mobile A* : *acétonitrile R1*, solution d'*acide phosphorique R* à 5 g/L (20:80 *V/V*),
- *phase mobile B* : solution d'*acide phosphorique R* à 5 g/L, *acétonitrile R1* (20:80 *V/V*),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 5 | 55 | 45 |
| 5 - 18 | 55 → 20 | 45 → 80 |
| 18 - 20 | 20 | 80 |

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 220 nm.

*Injection* : 20 µL.

Drogues végétales

*Identification des pics* : utilisez le chromatogramme fourni avec l'*extrait sec titré de valériane SCR* et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin pour identifier les pics dus à l'acide acétoxyvalérénique et à l'acide valérénique.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *rétention relative* par rapport à l'acide valérénique (temps de rétention = environ 21 min) : acide acétoxyvalérénique = environ 0,5.

Calculez la teneur pour cent en acides sesquiterpéniques, exprimée en acide valérénique à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{(A_1 + A_2) \times m_2 \times p \times 5}{A_3 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'acide acétoxyvalérénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'acide valérénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_3$ = surface du pic dû à l'acide valérénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai de l'extrait desséché, en grammes,

$m_2$ = masse d'*extrait sec titré de valériane SCR* dans la solution témoin, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en acide valérénique de l'*extrait sec titré de valériane SCR*.

**07/2010:0453**

# VALÉRIANE (RACINE DE)

## Valerianae radix

DÉFINITION

Organes souterrains séchés, entiers ou fragmentés de *Valeriana officinalis* L. *s.l.*, comprenant le rhizome entouré des racines et les stolons.

*Teneur* :

– *huile essentielle* : au minimum 4 mL/kg (drogue desséchée),

– *acides sesquiterpéniques* : au minimum 0,17 pour cent *m/m*, exprimés en acide valérénique ($C_{15}H_{22}O_2$ ; $M_r$ 234,3) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Le rhizome, gris-jaune ou gris-brun clair, est conique ou cylindrique et peut atteindre environ 50 mm de longueur et 30 mm de diamètre ; atténué ou comprimé à la base, il possède de nombreuses racines qui le recouvrent le plus souvent entièrement ; l'apex présente habituellement une cicatrice concave, laissée par les parties aériennes ; la base des tiges est rarement présente. La section longitudinale du rhizome montre une moelle lacuneuse et des cloisons transversales. Les racines sont abondantes, de même teinte que le rhizome, presque cylindriques ; leur diamètre est de 1-3 mm, leur longueur peut dépasser 100 mm ; les racines latérales, filiformes et fragiles, sont peu nombreuses ; la cassure est courte. Les stolons présentent des noeuds saillants séparés par des entre-noeuds striés longitudinalement, d'une longueur de 20-50 mm ; leur cassure est fibreuse.

B. Réduisez la racine de valériane en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est gris-jaune clair ou brun-gris clair. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des cellules contenant une résine brun clair ou des gouttelettes d'huile essentielle ; des groupes de petits sclérites rectangulaires à paroi épaisse et à lumen étroit et canaliculé ; quelques groupes de cellules scléreuses de plus grande taille, à paroi mince, provenant des bases de tiges ; des vaisseaux lignifiés aux épaississements réticulés, isolés ou en petits groupes ; des cellules allongées, à paroi mince, de l'assise pilifère, portant parfois des poils absorbants ; quelques fragments de suber. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente de nombreux grains d'amidon, pour la plupart composés de 4-6 éléments, mais souvent séparés, de forme arrondie ou irrégulière et d'un diamètre pouvant atteindre environ 15 µm ; la plupart des grains présentent un hile en fente ou étoilé assez peu distinct.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Mettez en suspension 1 g de racine de valériane pulvérisée (355) (*2.9.12*) dans 10 mL de *méthanol R* et traitez aux ultrasons pendant 10 min. Filtrez le surnageant à travers une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm). Utilisez le filtrat comme solution à examiner.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg d'*acide acétoxyvalérénique R* et 5 mg d'*acide valérénique R* dans 20 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R*, *acétate d'éthyle R*, *cyclohexane R* (2:38:60 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL [ou 5 µL] en bandes de 10 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes violettes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| Acide valérénique : une bande violette | Une bande violette (acide valérénique) |
| Acide acétoxyvalérénique : une bande violette | Une bande violette (acide acétoxyvalérénique) |
| ——— | ——— |
| | 2 bandes violettes pâles ou très pâles |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent de bases de tiges et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de racine de valériane pulvérisée (355) (*2.9.12*) bien homogénéisée.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 12,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 5,0 pour cent.

DOSAGE

**Huile essentielle** (*2.8.12*). Utilisez 40,0 g de racine de valériane récemment pulvérisée (500) (*2.9.12*), un ballon de 2000 mL et 500 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Introduisez 0,50 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 3-4 mL/min pendant 4 h.

**Acides sesquiterpéniques**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. Dans un ballon à fond rond à col rodé de 100 mL, introduisez 1,50 g de racine de valériane pulvérisée (710) (*2.9.12*). Ajoutez 20 mL de *méthanol R1*, mélangez et chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Laissez

Drogues végétales

refroidir, puis filtrez. Placez le filtre avec le résidu dans le ballon à fond rond. Ajoutez 20 mL de *méthanol R1* et chauffez à reflux au bain-marie pendant 15 min. Laissez refroidir puis filtrez. Réunissez les filtrats et complétez à 50,0 mL avec du *méthanol R1*, en rinçant le ballon à fond rond et le filtre.

*Solution témoin*. Dissolvez une quantité d'*extrait sec de valériane ERV* correspondant à 1,0 mg d'acide valérénique dans du *méthanol R1* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant. Traitez aux ultrasons pendant 10 min puis filtrez sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm).

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acétonitrile R1*, solution d'*acide phosphorique R* à 5 g/L (20:80 *V/V*),
– *phase mobile B* : solution d'*acide phosphorique R* à 5 g/L, *acétonitrile R1* (20:80 *V/V*),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 5 | 55 | 45 |
| 5 - 18 | 55 → 20 | 45 → 80 |
| 18 - 22 | 20 | 80 |

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 220 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Identification des pics* : utilisez le chromatogramme fourni avec l'*extrait sec de valériane ERV* et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin pour identifier les pics dus à l'acide acétoxyvalérénique et à l'acide valérénique.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *rétention relative* par rapport à l'acide valérénique (temps de rétention = environ 19 min) : acide acétoxyvalérénique = environ 0,5.

Calculez la teneur pour cent en acides sesquiterpéniques, exprimés en acide valérénique, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{(A_1 + A_2) \times m_2 \times p \times 5}{A_3 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'acide acétoxyvalérénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'acide valérénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_3$ = surface du pic dû à l'acide valérénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse d'*extrait sec de valériane ERV* utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en acide valérénique de l'*extrait sec de valériane ERV*.

**07/2010:2526**

# VALÉRIANE (RACINE DE) DIVISÉE

## Valerianae radix minutata

DÉFINITION

Organes souterrains séchés, divisés de *Valeriana officinalis* L. *s.l.*, comprenant le rhizome, les racines et les stolons.

La racine de valériane divisée est produite à partir de la *Racine de valériane (0453)* et destinée à être utilisée en tisane.

*Teneur* :

– *huile essentielle* : au minimum 3 mL/kg (drogue desséchée),
– *acides sesquiterpéniques* : au minimum 0,10 pour cent *m/m*, exprimés en acide valérénique ($C_{15}H_{22}O_2$ ; $M_r$ 234,3) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. Réduisez la racine de valériane en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est gris-jaune clair ou brun-gris clair. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des cellules contenant une résine brun clair ou des gouttelettes d'huile essentielle ; des groupes de petits sclérites rectangulaires à paroi épaisse et à lumen étroit et canaliculé ; quelques groupes de cellules scléreuses de plus grande taille, à paroi mince, provenant des bases de tiges ; des vaisseaux lignifiés à épaississements réticulés, isolés ou en petits groupes ; des cellules allongées, à paroi mince, de l'assise pilifère, portant parfois des poils absorbants ; quelques fragments de suber. Examinez au microscope en utilisant une solution de *glycérol R* à 50 pour cent *V/V*. La poudre présente de nombreux grains d'amidon, pour la plupart composés de 4-6 éléments, mais souvent séparés, de forme arrondie ou irrégulière et d'un diamètre pouvant atteindre environ 15 µm ; la plupart des grains présentent un hile en fente ou étoilé, assez peu distinct.

B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Mettez en suspension 1 g de racine de valériane pulvérisée (355) (*2.9.12*) dans 10 mL de *méthanol R* et traitez aux ultrasons pendant 10 min. Filtrez le surnageant à travers une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm). Utilisez le filtrat comme solution à examiner.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg d'*acide acétoxyvalérénique R* et 5 mg d'*acide valérénique R* dans 20 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R*, *acétate d'éthyle R*, *cyclohexane R* (2:38:60 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL [ou 5 µL] en bandes de 10 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes violettes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Acide valérénique : une bande violette | Une bande violette (acide valérénique) |
| Acide acétoxyvalérénique : une bande violette | Une bande violette (acide acétoxyvalérénique) |
| _______ | _______ |
| | 2 bandes violettes pâles ou très pâles |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent de bases de tiges et au maximum 2 pour cent d'autres éléments étrangers, déterminé sur la drogue végétale avant division.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de racine de valériane pulvérisée (355) (*2.9.12*) bien homogénéisée.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 12,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 5,0 pour cent.

DOSAGE

**Huile essentielle** (*2.8.12*). Utilisez 40,0 g de racine de valériane récemment pulvérisée (500) (*2.9.12*), un ballon de 2000 mL et 500 mL d'*eau R* comme liquide d'entraînement. Introduisez 0,50 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 3-4 mL/min pendant 4 h.

**Acides sesquiterpéniques**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Dans un ballon à fond rond à col rodé de 100 mL, introduisez 1,50 g de racine de valériane pulvérisée (710) (*2.9.12*). Ajoutez 20 mL de *méthanol R1,* mélangez et chauffez à reflux au bain-marie pendant 30 min. Laissez refroidir, puis filtrez. Placez le filtre avec le résidu dans le ballon à fond rond de 100 mL. Ajoutez 20 mL de *méthanol R1* et chauffez à reflux au bain-marie pendant 15 min. Laissez refroidir puis filtrez. Réunissez les filtrats et complétez à 50,0 mL avec du *méthanol R1,* en rinçant le ballon à fond rond et le filtre.

*Solution témoin.* Dissolvez une quantité d'*extrait sec de valériane ERV* correspondant à 1,0 mg d'acide valérénique dans du *méthanol R1* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant. Traitez aux ultrasons pendant 10 min puis filtrez sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm).

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,

– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acétonitrile R1,* solution d'*acide phosphorique R* à 5 g/L (20:80 *V/V*),

– *phase mobile B* : solution d'*acide phosphorique R* à 5 g/L, *acétonitrile R1* (20:80 *V/V*),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 5 | 55 | 45 |
| 5 - 18 | 55 → 20 | 45 → 80 |
| 18 - 22 | 20 | 80 |

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 220 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Identification des pics* : utilisez le chromatogramme fourni avec l'*extrait sec de valériane ERV* et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin pour identifier les pics dus à l'acide acétoxyvalérénique et à l'acide valérénique.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *rétention relative* par rapport à l'acide valérénique (temps de rétention = environ 19 min) : acide acétoxyvalérénique = environ 0,5.

Calculez la teneur pour cent en acides sesquiterpéniques, exprimée en acide valérénique, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{(A_1 + A_2) \times m_2 \times p \times 5}{A_3 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'acide acétoxyvalérénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'acide valérénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_3$ = surface du pic dû à l'acide valérénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse d'*extrait sec de valériane ERV* utilisée pour préparer la solution témoin, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en acide valérénique de l'*extrait sec de valériane ERV.*

**07/2010:1899**

# VALÉRIANE (TEINTURE DE)

## Valerianae tinctura

DÉFINITION

Teinture produite à partir de *Racine de valériane (0453).*

*Teneur* : au minimum 0,015 pour cent *m/m* d'acides sesquiterpéniques, exprimés en acide valérénique ($C_{15}H_{22}O_2$ ; $M_r$ 234,3).

PRODUCTION

La teinture est produite à partir de 1 partie de drogue et de 5 parties d'éthanol de 60 à 80 pour cent *V/V*, par une méthode appropriée.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide brun.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* Diluez 5 mL de teinture à examiner avec 5 mL d'*éthanol à 70 pour cent V/V R.*

*Solution témoin.* Dissolvez 5 mg d'*acide acétoxyvalérénique R* et 5 mg d'*acide valérénique R* dans 20 mL de *méthanol R.*

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, acétate d'éthyle R, cyclohexane R* (2:38:60 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL [ou 5 µL] en bandes de 10 mm [ou 8 mm].

*Développement* : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez la *solution d'aldéhyde anisique R* et chauffez à 100-105 °C pendant 5-10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes violettes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Acide valérénique : une bande violette | Une bande violette (acide valérénique) |
| Acide acétoxyvalérénique : une bande violette | Une bande violette (acide acétoxyvalérénique) |
| _______ | _______ |
| | 2 bandes violet pâle ou très pâle |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Ethanol** (*2.9.10*) : 95 pour cent à 105 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Prélevez 10,0 g de teinture à examiner et complétez à 50,0 mL avec du *méthanol R1.*

*Solution témoin.* Dissolvez une quantité d'*extrait sec de valériane ERV* correspondant à 1,0 mg d'acide valérénique dans du *méthanol R1* et complétez à 10,0 mL avec le même solvant. Traitez aux ultrasons pendant 10 min puis filtrez sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm).

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : *acétonitrile R1,* solution d'*acide phosphorique R* à 5 g/L (20:80 *V/V*),
– *phase mobile B* : solution d'*acide phosphorique R* à 5 g/L, *acétonitrile R1* (20:80 *V/V*),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 5 | 55 | 45 |
| 5 - 18 | 55 → 20 | 45 → 80 |
| 18 - 22 | 20 | 80 |

*Débit* : 1,5 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 220 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Identification des pics* : utilisez le chromatogramme fourni avec l'*extrait sec de valériane ERV* et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin pour identifier les pics dus à l'acide acétoxyvalérénique et à l'acide valérénique.

*Conformité du système* : solution témoin :

– *rétention relative* par rapport à l'acide valérénique (temps de rétention = environ 19 min) : acide acétoxyvalérénique = environ 0,5.

Calculez la teneur pour cent en acides sesquiterpéniques, exprimée en acide valérénique, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{(A_1 + A_2) \times m_2 \times p \times 5}{A_3 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'acide acétoxyvalérénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'acide valérénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_3$ = surface du pic dû à l'acide valérénique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse d'*extrait sec de valériane ERV* dans la solution témoin, en grammes,

$P$ = teneur pour cent en acide valérénique de l'*extrait sec de valériane ERV.*

**01/2008:1426**
**corrigé 6.0**

# VARECH

## Fucus vel Ascophyllum

DÉFINITION

Thalle fragmenté séché de *Fucus vesiculosus* L. ou de *F. serratus* L. ou d'*Ascophyllum nodosum* Le Jolis.

*Teneur* : au minimum 0,03 pour cent et au maximum 0,2 pour cent d'iode total ($A_r$ 126,9) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Saveur salée et mucilagineuse.

Odeur marine désagréable.

IDENTIFICATION

A. Le varech se présente sous forme de fragments ayant une consistance cornée et une couleur brun-noir à brun-vert, parfois recouverts d'efflorescences blanchâtres. Le thalle est constitué par une lame rubanée, ramifiée par dichotomie présentant une côte médiane saillante, appelée pseudo-nervure. Dans sa forme typique, *F. vesiculosus* présente une lame foliacée à bord lisse et porte des vésicules espacées dites aérifères, ovoïdes, isolées ou groupées par paires. Les extrémités de certaines frondes sont ovoïdes et un peu élargies et portent de nombreux organes de la reproduction (conceptacles). *F. serratus* présente une lame foliacée à marge découpée en dents de scie. Il est dépourvu de vésicules, et les frondes qui portent les conceptacles sont moins gonflées. La thalle d'*A. nodosum* est irrégulièrement ramifié, sans pseudo-nervure médiane. Il présente des vésicules aérifères isolées ovoïdes, les conceptacles falciformes se situent à l'extrémité de petites frondes.

B. Réduisez le varech en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-vert. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de tissu superficiel à cellules isodiamétriques, régulières, à contenu brun, et des fragments de tissu profond, à cellules allongées, incolores, disposées en filaments allongés, et laissant entre elles de vastes méats mucilagineux. Des files de cellules à parois épaissies réunies en groupes serrés, provenant de la pseudo-nervure, sont parfois visibles.

C. A 1 g de varech pulvérisé (355) (*2.9.12*), ajoutez 20 mL d'une solution d'*acide chlorhydrique R* à 2 pour cent *V/V*. Agitez énergiquement ; filtrez. Lavez le résidu avec 10 mL d'*eau R* ; filtrez. Au résidu, ajoutez 10 mL d'une solution de *carbonate de sodium R* à 200 g/L. Agitez. Centrifugez. Recueillez le surnageant. Ajustez à pH 1,5 avec de l'*acide sulfurique R.* Un précipité floconneux blanc apparaît lentement.

ESSAI

**Arsenic** (*2.4.27*) : au maximum 90 ppm.

**Cadmium** (*2.4.27*) : au maximum 4 ppm.

**Plomb** (*2.4.27*) : au maximum 5 ppm.

**Mercure** (*2.4.27*) : au maximum 0,1 ppm.

**Indice de gonflement** (*2.8.4*) : au minimum 6.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 15,0 pour cent, déterminée à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de varech pendant 2 h.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 24 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 3,0 pour cent.

DOSAGE

**Iode total**. A 1,000 g de varech pulvérisé, dans un creuset de silice de forme haute, ajoutez 5 mL d'*eau R* et 5 g d'*hydroxyde de potassium R*. Mélangez avec une baguette en magnésium. Chauffez au bain-marie. Ajoutez 1 g de *carbonate de potassium R*. Mélangez, ajoutez la pointe de la baguette en magnésium et les résidus de la drogue, puis desséchez, d'abord au bain-marie, puis à feu nu. Incinérez en augmentant progressivement la température sans dépasser 600 °C. Laissez refroidir. Ajoutez 20 mL d'*eau R* et chauffez doucement jusqu'à ébullition en remuant à l'aide d'un agitateur de verre. Filtrez le mélange chaud sur un filtre non plissé, dans une fiole conique. Lavez le résidu avec 4 fois 20 mL d'*eau R* chaude. Rincez le filtre et le creuset avec 50 mL d'*eau R* chaude. Réunissez les solutions. Laissez refroidir. Neutralisez avec de l'*acide sulfurique dilué R* en présence de *solution de méthylorange R*. Ajoutez 3 mL d'*acide sulfurique dilué R* et 1 mL d'*eau de brome R*. La solution est jaune. Après 5 min, ajoutez 0,6 mL d'une solution de *phénol R* à 50 g/L. La solution ne se trouble pas. Acidifiez avec 5 mL d'*acide phosphorique R*, puis ajoutez 0,2 g d'*iodure de potassium R*. Laissez reposer 5 min, à l'abri de la lumière. Ajoutez 1 mL de *solution d'amidon R* et titrez par le *thiosulfate de sodium 0,01 M*.

1 mL de *thiosulfate de sodium 0,01 M* correspond à 0,2115 mg d'iode.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique l'espèce ou les espèces de varech utilisées.

**01/2008:1834**
**corrigé 6.3**

# VERVEINE ODORANTE (FEUILLE DE)

## Verbenae citriodoratae folium

DÉFINITION

Feuilles séchées, entières ou fragmentées, d'*Aloysia citriodora* Palau (syn. *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Kuntze ; *Verbena triphylla* L'Hér. ; *Lippia citriodora* Kunth.).

*Teneur* :

– *actéoside* ($C_{29}H_{36}O_{15}$ ; $M_r$ 625) : au minimum 2,5 pour cent, exprimé en acide férulique (drogue desséchée) ;
– *huile essentielle* : au minimum 3,0 mL/kg pour la drogue entière et au minimum 2,0 mL/kg pour la drogue fragmentée (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Lorsqu'elle est broyée, la drogue à examiner présente une odeur caractéristique rappelant celle du citron.

IDENTIFICATION

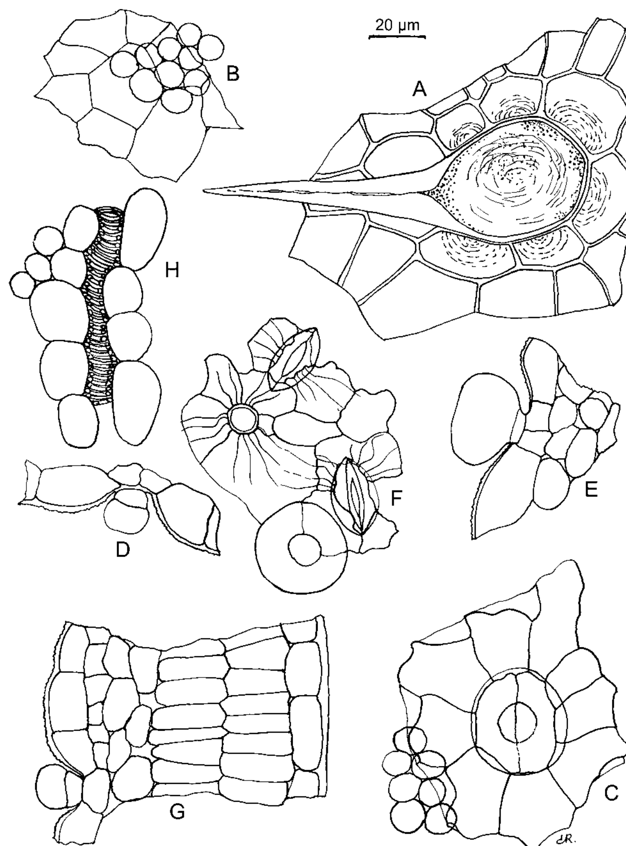
A. Les feuilles sont simples, courtement pétiolées. Elles sont étroites, lancéolées, environ 4 fois plus longues que larges. Les bords, entiers, ondulés, sont recourbés vers la face supérieure. La face supérieure est vert foncé et rugueuse au toucher ; la face inférieure, d'un vert plus pâle, présente une nervure médiane saillante et des nervures secondaires dirigées vers les bords.

B. Réduisez la drogue en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est vert clair. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : des fragments de l'épiderme supérieur du limbe, vus de face, composés de cellules polygonales, de nombreux poils cystolithiques courts, unicellulaires, à parois épaisses, dont la base est entourée de cellules disposées en rosette ; absence de stomates ; des fragments de l'épiderme inférieur du limbe composés de cellules plus irrégulières, aux contours plus ou moins sinueux, de nombreux stomates anomocytiques (*2.8.3*) et de nombreux poils sécréteurs, subsessiles, à tête globuleuse ; des fragments des parenchymes du mésophylle ; des faisceaux de vaisseaux, des nervures.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de *Verbena officinalis*.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner. Des bandes situées en-dessous de la bande due à la rutine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| | Une bande vert-gris intense |
| Arbutoside : une bande bleue ou brune | |
| Rutine : une bande jaune-brun foncé | Une bande bleue ou violette |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |




A. Epiderme supérieur, avec poil cystolithique, accompagné de cellules annexes contenant des concrétions calciques

B et C. Epiderme supérieur, vu de face, accompagné de parenchyme palissadique et de poil sécréteur (C)

D et E. Poils sécréteurs, vus en section transversale

F. Epiderme inférieur, vu de face, présentant une cuticule striée, stomates anomocytiques et poil sécréteur

G. Limbe de la feuille, vu en section transversale

H. Parenchyme du mésophylle, avec vaisseau lignifié

Figure 1834.-1. – *Dessin pour l'identification de la feuille de verveine odorante (voir Identification B)*

Drogues végétales

ESSAI

***Verbena officinalis***. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 0,50 g de drogue pulvérisée (710) (*2.9.12*), ajoutez 5 mL de *méthanol R*. Chauffez au bain-marie à 60 °C pendant 10 min. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg d'*arbutoside R* et 10 mg de *rutine R* dans du *méthanol R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, acide acétique glacial R, eau R, acétate d'éthyle R* (11:11:27:100 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL [ou 5 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours d'environ 12 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* puis séchez à 100-105 °C pendant environ 10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente aucune bande gris-brun à une position située entre celle de l'arbutoside et celle de la rutine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue pulvérisée (710) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 13,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 3,5 pour cent.

DOSAGE

**Actéoside**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner*. A 1,00 g de drogue pulvérisée (710) (*2.9.12*), ajoutez 50,0 mL de solution témoin et agitez à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 2 h. Centrifugez pendant 15 min et filtrez le surnageant sur une membrane filtrante (diamètre nominal des pores 0,45 µm).

*Solution témoin*. Dissolvez 10,0 mg d'*acide férulique SCR* dans de l'*éthanol à 60 pour cent V/V R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Précolonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,01 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
– *température* : 20 °C.

*Phase mobile* :

– *phase mobile A* : solution d'*acide phosphorique R* à 0,3 pour cent *V/V*,
– *phase mobile B* : *acétonitrile R*,

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 20 | 93 → 83 | 7 → 17 |
| 20 - 30 | 83 | 17 |
| 30 - 35 | 83 → 75 | 17 → 25 |
| 35 - 40 | 75 → 20 | 25 → 80 |
| 40 - 45 | 20 → 93 | 80 → 7 |

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 330 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Conformité du système* : solution à examiner :

– *résolution* : au minimum 3,5 entre les pics dus à l'acide férulique et à l'actéoside.

Calculez la teneur pour cent en actéoside, exprimé en acide férulique, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 0,5 \times 3,1}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'actéoside dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'acide férulique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai dans la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse de l'*acide férulique SCR* dans la solution témoin, en grammes,

$p$ = teneur pour cent en acide férulique dans l'*acide férulique SCR*,

3,1 = facteur de corrélation entre l'actéoside et l'acide férulique.

**Huile essentielle** (*2.8.12*). Dans un ballon de 1000 mL, introduisez 25,0 g de drogue fraîchement broyée et 500 mL d'une solution de *chlorure de sodium R* à 10 g/L comme liquide de distillation. Utilisez 0,50 mL de *xylène R* dans le tube gradué. Distillez à un débit de 3,0-3,5 mL/min pendant 3 h.

**01/2008:1854**
**corrigé 6.0**

# VERVEINE OFFICINALE

## Verbenae herba

DÉFINITION

Parties aériennes, entières ou fragmentées, séchées, de *Verbena officinalis* L., récoltées pendant la floraison.

*Teneur* : au minimum 1,5 pour cent de verbénaline ($C_{17}H_{24}O_{10}$ ; $M_r$ 388,4) (drogue desséchée).

IDENTIFICATION

A. La tige brun-vert, à sillons longitudinaux, est quadrangulaire et grossièrement velue, notamment aux angles. Les feuilles les plus grandes, à bords dentés émoussés, sont pétiolées et profondément pennatiséquées, les feuilles les plus petites, sessiles et non lobées, à bords crénelés ou dentés ; les faces sont rugueuses et velues, notamment sur les nervures, proéminentes sur la face inférieure. Les fleurs, nombreuses, situées à l'aisselle des bractées foliaires, sont groupées en épi allongé ; le calice tubuleux possède 5 lobes très pointus et la corolle, rose clair ou lilas, forme un tube environ 2 fois plus long que le calice.

B. Réduisez la verveine officinale en poudre (355) (*2.9.12*). La poudre est brun-vert. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente les éléments suivants : de longues cellules épidermiques provenant des tiges, polygonales ou rectangulaires, à parois externes épaissies ; des fragments de feuilles qui, vus de face, présentent des cellules épidermiques à parois sinueuses et des stomates anomocytiques ou anisocytiques (*2.8.3*), plus nombreux sur l'épiderme inférieur ; des poils tecteurs, unicellulaires, à parois épaisses, de longueur allant jusqu'à 500 µm, à base large et entourés d'un simple anneau de cellules épidermiques arrondies et bombées ; de rares poils sécréteurs de 2 sortes : (a) à pied pluricellulaire et à tête aplatie d'environ 25 µm de diamètre, composée de 4-8 cellules et (b) à pied unicellulaire et à tête renflée ovale d'un diamètre d'environ 65 µm, composée de 8 cellules rayonnantes ; des fragments de l'assise fibreuse de l'anthère à épaississements

bien marqués ; des grains de pollen triangulaires, ovoïdes ou arrondis d'environ 30 µm de diamètre, à exine lisse et à 3 pores ; de nombreux groupes de fibres, des vaisseaux à paroi réticulée et des fragments des tissus parenchymateux issus des tiges.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai B d'*Aloysia citrodora*.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| | Une bande verte ou brune |
| Arbutoside : une bande bleue ou brune | |
| | Une bande gris-brun intense |
| Rutine : une bande jaune-brun foncé | |
| _______ | _______ |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

***Aloysia citrodora***

A. Une odeur citronnée indique la présence d'*Aloysia citrodora*.

B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 0,50 g de verveine officinale pulvérisée (710) (*2.9.12*), ajoutez 5 mL de *méthanol R*. Chauffez au bain-marie à 60 °C pendant 10 min. Refroidissez et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg d'*arbutoside R* et 10 mg de *rutine R* dans le *méthanol R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R* (5-40 µm) [ou *plaque au gel de silice pour CCM R* (2-10 µm)].

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, acide acétique glacial R, eau R, acétate d'éthyle R* (11:11:27:100 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL [ou 5 µL] en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 12 cm [ou 6 cm].

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R* puis chauffez à 100-105 °C pendant environ 10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente aucune bande bleue ou violette intense à une position approximativement égale à celle de la rutine dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de verveine officinale pulvérisée (710) (*2.9.12*).

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 10,0 pour cent.

**Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique** (*2.8.1*) : au maximum 2,0 pour cent.

DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution d'étalon interne*. Dissolvez 10,0 mg d'*acide férulique R* dans de l'*éthanol à 60 pour cent V/V R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

*Solution à examiner*. A 1,00 g de verveine officinale pulvérisée (710) (*2.9.12*), ajoutez 50,0 mL de solution d'étalon interne et agitez à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 2 h. Centrifugez pendant 15 min et filtrez le surnageant sur une membrane filtrante (diamètre nominal de pores 0,45 µm).

*Solution témoin*. Dissolvez le contenu d'un flacon de *verbénaline SCR* dans la solution d'étalon interne et complétez à 5,0 mL avec la même solution.

*Précolonne* :

- *dimensions* : *l* = 0,01 m, Ø = 4,0 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Colonne* :

- *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,0 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
- *température* : 20 °C.

*Phase mobile* :

- *phase mobile A* : solution d'*acide phosphorique R* à 0,3 pour cent *V/V*,
- *phase mobile B* : *acétonitrile R*,

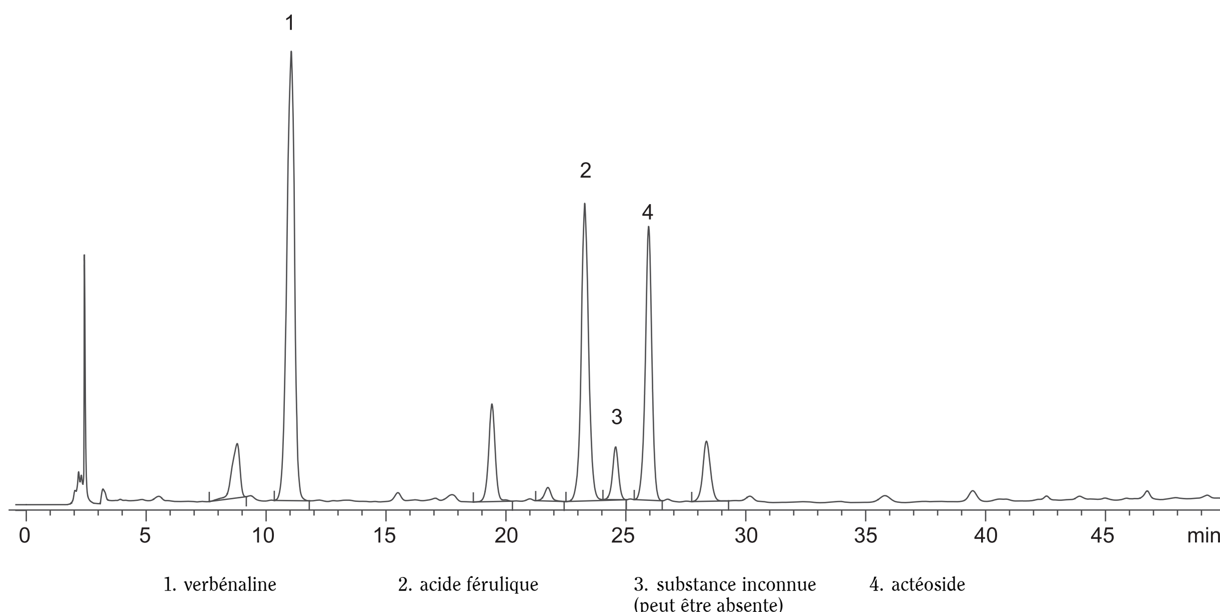



Figure 1854.-1. – *Chromatogramme pour le dosage de la verveine officinale : solution à examiner*

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent *V/V*) | Phase mobile B (pour cent *V/V*) |
|---|---|---|
| 0 - 20 | 93 → 83 | 7 → 17 |
| 20 - 30 | 83 | 17 |
| 30 - 35 | 83 → 75 | 17 → 25 |
| 35 - 40 | 75 → 20 | 25 → 80 |
| 40 - 45 | 20 → 93 | 80 → 7 |

*Débit* : 1,0 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 240 nm.

*Injection* : 20 μL.

*Conformité du système* : solution à examiner :

– le chromatogramme obtenu est semblable au chromatogramme de la figure 1854.-1,

– *résolution* : au minimum 3,5 entre les pics dus à l'acide férulique et à l'actéoside.

Calculez la teneur pour cent en verbénaline à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times A_4 \times m_2 \times 10}{A_2 \times A_3 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à la verbénaline dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à la verbénaline dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$A_3$ = surface du pic dû à l'acide férulique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_4$ = surface du pic dû à l'acide férulique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de drogue utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse de verbénaline dans la solution témoin, en grammes.

Drogues végétales

# PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

**01/2008:90006**

# INTRODUCTION

*Tous les textes généraux et autres monographies de la Pharmacopée Européenne pouvant concerner l'homéopathie sont applicables.*

*La partie « Homéopathie » de la Pharmacopée Européenne contient des monographies générales et des monographies individuelles, décrivant des matières premières et des préparations qui ne sont quasiment utilisées que pour les médicaments homéopathiques. La référence à ces monographies pour d'autres applications peut être autorisée par les autorités d'enregistrement.*

**07/2009:2045**

# DROGUES VÉGÉTALES POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

## Plantae medicinales ad praeparationes homoeopathicas

DÉFINITION

Les drogues végétales pour préparations homéopathiques sont principalement des plantes, parties de plantes, y compris d'algues, de champignons ou de lichens, entiers, fragmentés ou coupés, utilisés en l'état, le plus souvent à l'état frais. L'état, frais ou sec, de la drogue utilisée est défini dans la monographie spécifique de la Pharmacopée Européenne ou à défaut dans la monographie spécifique d'une Pharmacopée nationale. En l'absence d'une telle monographie, l'état dans lequel la drogue est utilisée doit être spécifié. Certains exsudats n'ayant pas subi de traitements spécifiques sont également considérés comme des drogues végétales pour préparations homéopathiques. Les drogues végétales pour préparations homéopathiques sont définies avec précision par la dénomination scientifique botanique de l'espèce productrice selon le système binomial (genre, espèce, variété, auteur).

PRODUCTION

Les drogues végétales pour préparations homéopathiques sont obtenues à partir de plantes cultivées ou sauvages. Des conditions appropriées de collecte, de culture, de récolte, de tri, de séchage, de fragmentation et de stockage sont essentielles pour garantir la qualité des drogues végétales pour préparations homéopathiques.

Les drogues végétales pour préparations homéopathiques sont dans la mesure du possible exemptes d'impuretés telles que terre, poussière, souillure ou autres contaminants (par exemple contamination fongique, par les insectes ou autre contamination animale). Elles ne présentent pas de signe de pourriture.

Dans le cas où un traitement décontaminant a été utilisé, il est nécessaire de démontrer qu'il n'altère pas les constituants de la plante et qu'il ne laisse pas de résidus nocifs. L'emploi d'oxyde d'éthylène est interdit pour la décontamination des drogues végétales pour préparations homéopathiques.

Les drogues végétales fraîches sont utilisées aussi rapidement que possible après la récolte. Dans les cas justifiés et autorisés pour le transport ou le stockage, les matières premières d'origine végétale utilisées à l'état frais peuvent être congelées ; elles peuvent également être conservées dans l'éthanol à 96 pour cent ou dans de l'éthanol de titre approprié, à condition que la totalité de la matière première et du solvant soit employée pour la fabrication.

Des mesures appropriées sont prises pour garantir que la qualité microbiologique des préparations homéopathiques contenant une ou plusieurs drogues végétales satisfait aux recommandations indiquées dans le texte *5.1.4. Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles.*

IDENTIFICATION

Les drogues végétales pour préparations homéopathiques sont identifiées par leur description macroscopique et, si nécessaire, microscopique et tout essai complémentaire éventuellement requis (par exemple une chromatographie sur couche mince).

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*). Lorsqu'une plante fraîche est utilisée pour la fabrication de préparations homéopathiques, le taux d'éléments étrangers est le plus bas possible ; si nécessaire le taux maximal en éléments étrangers est indiqué dans les monographies spécifiques. Lorsqu'une plante sèche est utilisée pour la fabrication de préparations homéopathiques, effectuez une recherche des éléments étrangers, sauf indication contraire dans les monographies spécifiques. La teneur en éléments étrangers est au maximum de 2 pour cent *m/m*, sauf indication contraire ou exception justifiée et autorisée.

**Falsification**. Les drogues végétales pour préparations homéopathiques pour lesquelles existe un risque de falsification peuvent faire l'objet d'un essai spécifique approprié.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*). Dans le cas de drogues végétales pour préparations homéopathiques utilisées sous forme desséchée, un essai de perte à la dessiccation est effectué.

**Eau** (*2.2.13*). Dans le cas de drogues végétales pour préparations homéopathiques ayant une teneur élevée en huile essentielle, un essai de teneur en eau est effectué. Dans le cas de drogues végétales pour préparations homéopathiques utilisées à l'état frais, un essai de teneur en eau peut être effectué, selon une méthode appropriée.

**Pesticides** (*2.8.13*). Les drogues végétales pour préparations homéopathiques satisfont aux exigences en matière de résidus de pesticides. Ces exigences prennent en compte la nature de la plante, si nécessaire la préparation à laquelle la plante est éventuellement destinée ainsi que, si disponible, la connaissance de l'historique complet du traitement du lot de la plante. La teneur en résidus de pesticides peut être déterminée par la méthode décrite en annexe à la méthode générale.

Dans les cas appropriés, les drogues végétales pour préparations homéopathiques satisfont à d'autres essais, comme par exemple les essais suivants :

**Cendres totales** (*2.4.16*).

**Indice d'amertume** (*2.8.15*).

**Métaux lourds**. Le risque de contamination des drogues végétales pour préparations homéopathiques par des métaux lourds doit être envisagé. Si une monographie ne prescrit pas de limites pour les métaux lourds ou pour certains éléments spécifiques, de telles limites peuvent être exigées dans les cas justifiés.

**Aflatoxines** (*2.8.18*). Une limite pour les aflatoxines peut être exigée.

**Contamination radioactive**. Dans certaines circonstances particulières, il y a lieu de considérer le risque de contamination radioactive.

DOSAGE

Dans les cas appropriés, les drogues végétales pour préparations homéopathiques sont dosées par une méthode appropriée.

CONSERVATION

Conservez les drogues végétales sèches à l'abri de la lumière.

01/2011:2371

# MÉTHODES DE PRÉPARATION DES SOUCHES HOMÉOPATHIQUES ET DÉCONCENTRATION

## Via praeparandi stirpes homoeopathicas et potentificandi

Les souches homéopathiques sont préparées à partir des matières premières qui satisfont aux exigences de la monographie *Préparations homéopathiques (1038)*, par des méthodes appropriées. Les méthodes décrites ci-après, complétées par des méthodes de déconcentration établies, sont des exemples de méthodes, mais l'emploi d'autres méthodes décrites dans les pharmacopées nationales officielles des Etats membres est également admis.

Lorsque des matières premières d'origine animale sont utilisées, il convient de se référer aux exigences de la monographie *Préparations homéopathiques (1038)* concernant l'usage de matières premières d'origine animale ou humaine.

Pour la préparation des dilutions liquides, l'éthanol du titre prescrit dans la méthode peut, si nécessaire, être remplacé par de l'éthanol à 36 pour cent *V/V* (30 pour cent *m/m*) ou de l'éthanol à 18 pour cent *V/V* (15 pour cent *m/m*).

Lorsqu'une monographie spécifique permet la préparation de la teinture mère à partir de plusieurs espèces végétales, cette teinture mère peut être préparée à partir des parties spécifiées de l'une de ces espèces ou d'un mélange de ces espèces.

Sauf indication contraire, les teintures mères sont préparées par macération. La macération dure au minimum 10 jours et au maximum 30 jours.

La macération peut être remplacée par une macération longue (au maximum 60 jours) ou très longue (au maximum 180 jours) sous réserve qu'il soit démontré que la qualité de cette teinture mère est la même que celle de la teinture préparée par macération.

Sauf indication contraire dans la monographie spécifique, le terme « partie(s) » s'entend « partie(s) en masse ». Sauf indication contraire dans la méthode, la température maximale pour la préparation est de 25 °C.

### 1. TEINTURES MÈRES

*MÉTHODE 1.1*

**MÉTHODE 1.1.1 (ÉQUIVALENTE À LA MÉTHODE HOMÖOPATHISCHES ARZNEIBUCH (HAB) 1a : TEINTURES MÈRES ET DILUTIONS LIQUIDES)**

La méthode 1.1.1 est utilisée pour les drogues végétales fraîches contenant généralement plus de 70 pour cent de jus d'expression, et ni huile essentielle ni résine ni mucilage. Les teintures mères préparées par la méthode 1.1.1 sont des mélanges à parties égales de jus d'expression et d'éthanol à 90 pour cent *V/V* (86 pour cent *m/m*).

Pressez la drogue végétale convenablement divisée et mélangez immédiatement le jus exprimé avec une masse égale d'éthanol à 90 pour cent *V/V* (86 pour cent *m/m*). Laissez reposer en récipient fermé pendant au moins 5 jours à une température ne dépassant pas 20 °C. Filtrez.

**Ajustement à la teneur prescrite dans la monographie spécifique**

Déterminez la teneur pour cent du filtrat en résidu sec (*2.8.16*) ou, si la monographie le prescrit, sa teneur pour cent en constituant dosé. Calculez à l'aide de l'expression suivante la quantité $A_1$ d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*), en kilogrammes, requise pour l'ajustement :

$$\frac{m \times (N_x - N_0)}{N_0}$$

$m$ = masse du filtrat, en kilogrammes,

$N_0$ = teneur pour cent, en résidu sec ou en constituant dosé, requise dans la monographie spécifique,

$N_x$ = teneur pour cent, en résidu sec ou en constituant dosé, du filtrat.

Mélangez le filtrat avec la quantité d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*) ainsi calculée. Laissez reposer pendant au moins 5 jours à une température ne dépassant pas 20 °C. Filtrez si nécessaire.

**Déconcentration**

La 1[re] dilution « décimale » (D1) est préparée avec :

2 parties de teinture mère,

8 parties d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*).

La 2[e] dilution décimale (D2) est préparée avec :

1 partie de la 1[re] dilution « décimale »,

9 parties d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*).

Les dilutions décimales suivantes sont préparées comme indiqué pour D2.

La 1[re] dilution « centésimale » (C1) est préparée avec :

2 parties de teinture mère,

98 parties d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*).

La 2[e] dilution centésimale (C2) est préparée avec :

1 partie de la 1[re] dilution « centésimale »,

99 parties d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*).

Les dilutions centésimales suivantes sont préparées comme indiqué pour C2.

**MÉTHODE 1.1.2 (ÉQUIVALENTE À LA MÉTHODE HAB 1b : TEINTURES MÈRES ET DILUTIONS LIQUIDES)**

La méthode 1.1.2 est utilisée pour traiter le latex des drogues végétales.

Les teintures mères préparées par la méthode 1.1.2 sont des mélanges de latex issu de la plante fraîche et d'éthanol à 36 pour cent *V/V* (30 pour cent *m/m*). Mélangez le latex frais avec 2 parties d'éthanol à 36 pour cent *V/V* (30 pour cent *m/m*). Filtrez.

**Ajustement à la teneur prescrite dans la monographie spécifique**

Déterminez la teneur pour cent du filtrat en résidu sec (*2.8.16*) ou, si la monographie le prescrit, sa teneur pour cent en constituant dosé. Calculez à l'aide de l'expression suivante la quantité $A_1$ d'éthanol à 36 pour cent *V/V* (30 pour cent *m/m*), en kilogrammes, requise pour l'ajustement :

$$\frac{m \times (N_x - N_0)}{N_0}$$

$m$ = masse du filtrat, en kilogrammes,

$N_0$ = teneur pour cent, en résidu sec ou en constituant dosé, requise dans la monographie spécifique,

$N_x$ = teneur pour cent en résidu sec ou en constituant dosé du filtrat.

Mélangez le filtrat avec la quantité d'éthanol à 36 pour cent *V/V* (30 pour cent *m/m*) ainsi calculée. Laissez reposer pendant au moins 5 jours à une température ne dépassant pas 20 °C. Filtrez si nécessaire.

**Déconcentration**

La 1[re] dilution « décimale » (D1) est préparée avec :

3 parties de teinture mère,

7 parties d'éthanol à 36 pour cent *V/V* (30 pour cent *m/m*).

La 2[e] dilution décimale (D2) est préparée avec :

1 partie de la 1[re] dilution « décimale »,

9 parties d'éthanol à 18 pour cent *V/V* (15 pour cent *m/m*).

Les dilutions décimales suivantes sont préparées comme indiqué pour D2.

Préparations homéopathiques

**MÉTHODE 1.1.3 (ÉQUIVALENTE À LA MÉTHODE HAB 2a : TEINTURES MÈRES ET DILUTIONS LIQUIDES)**

La méthode 1.1.3 est utilisée pour les drogues végétales fraîches contenant généralement moins de 70 pour cent de jus d'expression et plus de 60 pour cent d'humidité (perte à la dessiccation), et ni huile essentielle ni résine.

Les teintures mères préparées par la méthode 1.1.3 (teneur en éthanol d'environ 50 pour cent *V/V* ou 43 pour cent *m/m*) sont préparées par macération comme décrit ci-après.

Divisez convenablement la drogue végétale. Prélevez-en un échantillon et déterminez la perte à la dessiccation (*2.2.32*). Sauf indication contraire, effectuez cette détermination sur 2,00-5,00 g de matière première divisée, dans un récipient taré à fond plat d'un diamètre de 45-55 mm préalablement séché selon la procédure indiquée pour la matière première. Desséchez la matière première à 105 °C pendant 2 h, puis laissez refroidir dans un dessiccateur.

Ajoutez à la drogue végétale, immédiatement après sa division, une quantité d'éthanol à 90 pour cent *V/V* (86 pour cent *m/m*) au moins égale à la moitié de sa masse. Conservez en récipient bien fermé à une température ne dépassant pas 20 °C.

Calculez à l'aide de l'expression suivante la quantité $A_2$ d'éthanol à 90 pour cent *V/V* (86 pour cent *m/m*), en kilogrammes, requise pour la masse $m$ de matière première à traiter, puis soustrayez du résultat la quantité d'éthanol à 90 pour cent *V/V* (86 pour cent *m/m*) déjà ajoutée et complétez le mélange avec la différence.

$$\frac{m \times T}{100}$$

$m$ = masse de la matière première, en kilogrammes,

$T$ = perte à la dessiccation de l'échantillon, en pourcentage.

Laissez reposer pendant au moins 10 jours à une température ne dépassant pas 20 °C, en agitant de temps en temps, puis pressez le mélange et filtrez le liquide exprimé.

**Ajustement à la teneur prescrite dans la monographie spécifique**

Déterminez la teneur pour cent du filtrat en résidu sec (*2.8.16*) ou, si la monographie le prescrit, sa teneur pour cent en constituant dosé. Calculez à l'aide de l'expression suivante la quantité $A_1$ d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*), en kilogrammes, requise pour l'ajustement :

$$\frac{m \times (N_x - N_0)}{N_0}$$

$m$ = masse du filtrat, en kilogrammes,

$N_0$ = teneur pour cent, en résidu sec ou en constituant dosé, requise dans la monographie spécifique,

$N_x$ = teneur pour cent en résidu sec ou en constituant dosé du filtrat.

Mélangez le filtrat avec la quantité d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*) ainsi calculée. Laissez reposer pendant au moins 5 jours à une température ne dépassant pas 20 °C. Filtrez si nécessaire.

**Déconcentration**

La 1re dilution « décimale » (D1) est préparée avec :

2 parties de teinture mère,

8 parties d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*).

La 2e dilution décimale (D2) est préparée avec :

1 partie de la 1re dilution « décimale »,

9 parties d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*).

Les dilutions décimales suivantes sont préparées comme indiqué pour D2.

La 1re dilution « centésimale » (C1) est préparée avec :

2 parties de teinture mère,

98 parties d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*).

La 2e dilution centésimale (C2) est préparée avec :

1 partie de la 1re dilution « centésimale »,

99 parties d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*).

Les dilutions centésimales suivantes sont préparées comme indiqué pour C2.

**MÉTHODE 1.1.4 (ÉQUIVALENTE À LA MÉTHODE HAB 2b : TEINTURES MÈRES ET DILUTIONS LIQUIDES)**

La méthode 1.1.4 est utilisée pour les drogues végétales fraîches contenant généralement moins de 70 pour cent de jus d'expression et plus de 60 pour cent d'humidité (perte à la dessiccation), et ni huile essentielle ni résine.

Les teintures mères préparées par la méthode 1.1.4 (teneur en éthanol d'environ 36 pour cent *V/V* ou 30 pour cent *m/m*) sont préparées par macération comme décrit ci-après.

Divisez convenablement la drogue végétale. Prélevez-en un échantillon et déterminez la perte à la dessiccation (*2.2.32*). Sauf indication contraire, effectuez cette détermination sur 2,00-5,00 g de matière première divisée, dans un récipient taré à fond plat d'un diamètre de 45-55 mm préalablement séché selon la procédure indiquée pour la matière première. Desséchez la matière première à 105 °C pendant 2 h, puis laissez refroidir dans un dessiccateur.

Ajoutez à la drogue végétale, immédiatement après sa division, une quantité d'éthanol à 70 pour cent *V/V* (62 pour cent *m/m*) au moins égale à la moitié de sa masse. Conservez en récipient bien fermé à une température ne dépassant pas 20 °C.

Calculez à l'aide de l'expression suivante la quantité $A_2$ d'éthanol à 70 pour cent *V/V* (62 pour cent *m/m*), en kilogrammes, requise pour la masse $m$ de drogue végétale à traiter, puis soustrayez du résultat la quantité d'éthanol à 70 pour cent *V/V* (62 pour cent *m/m*) déjà ajoutée et complétez le mélange avec la différence.

$$\frac{m \times T}{100}$$

$m$ = masse de la matière première, en kilogrammes,

$T$ = perte à la dessiccation de l'échantillon, en pourcentage.

Laissez reposer pendant au moins 10 jours à une température ne dépassant pas 20 °C, en agitant de temps en temps, puis pressez le mélange et filtrez le liquide exprimé.

**Ajustement à la teneur prescrite dans la monographie spécifique**

Déterminez la teneur pour cent du filtrat en résidu sec (*2.8.16*) ou, si la monographie le prescrit, sa teneur pour cent en constituant dosé. Calculez à l'aide de l'expression suivante la quantité $A_1$ d'éthanol à 36 pour cent *V/V* (30 pour cent *m/m*), en kilogrammes, requise pour l'ajustement :

$$\frac{m \times (N_x - N_0)}{N_0}$$

$m$ = masse du filtrat, en kilogrammes,

$N_0$ = teneur pour cent, en résidu sec ou en constituant dosé, requise dans la monographie spécifique,

$N_x$ = teneur pour cent en résidu sec ou en constituant dosé du filtrat.

Mélangez le filtrat avec la quantité d'éthanol à 36 pour cent *V/V* (30 pour cent *m/m*) ainsi calculée. Laissez reposer pendant au moins 5 jours à une température ne dépassant pas 20 °C. Filtrez si nécessaire.

**Déconcentration**

La 1re dilution « décimale » (D1) est préparée avec :

2 parties de teinture mère,

8 parties d'éthanol à 36 pour cent *V/V* (30 pour cent *m/m*).

La 2e dilution décimale (D2) est préparée avec :

1 partie de la 1re dilution « décimale »,

9 parties d'éthanol à 18 pour cent *V/V* (15 pour cent *m/m*).

Les dilutions décimales suivantes sont préparées comme indiqué pour D2.

**MÉTHODE 1.1.5 (ÉQUIVALENTE À LA MÉTHODE HAB 3a : TEINTURES MÈRES ET DILUTIONS LIQUIDES)**

La méthode 1.1.5 est utilisée pour les drogues végétales fraîches contenant une huile essentielle ou une résine, ou généralement moins de 60 pour cent d'humidité (perte à la dessiccation).

Les teintures mères préparées par la méthode 1.1.5 (teneur en éthanol d'environ 68 pour cent *V/V* ou 60 pour cent *m/m*) sont préparées par macération comme décrit ci-après.

Divisez convenablement la drogue végétale. Prélevez-en un échantillon et déterminez la perte à la dessiccation (*2.2.32*). Sauf indication contraire, effectuez cette détermination sur 2,00-5,00 g de matière première divisée, dans un récipient taré à fond plat d'un diamètre de 45-55 mm préalablement séché selon la procédure indiquée pour la matière première. Desséchez la matière première à 105 °C pendant 2 h, puis laissez refroidir dans un dessiccateur.

Ajoutez à la drogue végétale, immédiatement après sa division, une quantité d'éthanol à 90 pour cent *V/V* (86 pour cent *m/m*) au moins égale à la moitié de sa masse. Conservez en récipient bien fermé à une température ne dépassant pas 20 °C.

Calculez à l'aide de l'expression suivante la quantité $A_3$ d'éthanol à 90 pour cent *V/V* (86 pour cent *m/m*), en kilogrammes, requise pour la masse $m$ de matière première à traiter, puis soustrayez du résultat la quantité d'éthanol à 90 pour cent *V/V* (86 pour cent *m/m*) déjà ajoutée et complétez le mélange avec la différence.

$$\frac{2 \times m \times T}{100}$$

$m$ = masse de la matière première, en kilogrammes,

$T$ = perte à la dessiccation de l'échantillon, en pourcentage.

Laissez reposer pendant au moins 10 jours à une température ne dépassant pas 20 °C, en agitant de temps en temps, puis pressez le mélange et filtrez le liquide exprimé.

**Ajustement à la teneur prescrite dans la monographie spécifique**

Déterminez la teneur pour cent du filtrat en résidu sec (*2.8.16*) ou, si la monographie le prescrit, sa teneur pour cent en constituant dosé. Calculez à l'aide de l'expression suivante la quantité $A_1$ d'éthanol à 70 pour cent *V/V* (62 pour cent *m/m*), en kilogrammes, requise pour l'ajustement :

$$\frac{m \times (N_x - N_0)}{N_0}$$

$m$ = masse du filtrat, en kilogrammes,

$N_0$ = teneur pour cent, en résidu sec ou en constituant dosé, requise dans la monographie spécifique,

$N_x$ = teneur pour cent en résidu sec ou en constituant dosé du filtrat.

Mélangez le filtrat avec la quantité d'éthanol à 70 pour cent *V/V* (62 pour cent *m/m*) ainsi calculée. Laissez reposer pendant au moins 5 jours à une température ne dépassant pas 20 °C. Filtrez si nécessaire.

**Déconcentration**

La 1re dilution « décimale » (D1) est préparée avec :

3 parties de teinture mère,

7 parties d'éthanol à 70 pour cent *V/V* (62 pour cent *m/m*).

La 2e dilution décimale (D2) est préparée avec :

1 partie de la 1re dilution « décimale »,

9 parties d'éthanol à 70 pour cent *V/V* (62 pour cent *m/m*).

Les dilutions décimales suivantes sont préparées comme indiqué pour D2. A partir de la dilution D4, utilisez de l'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*).

La 1re dilution « centésimale » (C1) est préparée avec :

3 parties de teinture mère,

97 parties d'éthanol à 70 pour cent *V/V* (62 pour cent *m/m*).

La 2e dilution centésimale (C2) est préparée avec :

1 partie de la 1re dilution « centésimale »,

99 parties d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*).

Les dilutions centésimales suivantes sont préparées comme indiqué pour C2.

**MÉTHODE 1.1.6 (ÉQUIVALENTE À LA MÉTHODE HAB 3b : TEINTURES MÈRES ET DILUTIONS LIQUIDES)**

La méthode 1.1.6 est utilisée pour les drogues végétales fraîches contenant des huiles essentielles ou des résines, ou généralement moins de 60 pour cent d'humidité (perte à la dessiccation).

Les teintures mères préparées par la méthode 1.1.6 (teneur en éthanol d'environ 50 pour cent *V/V* ou 43 pour cent *m/m*) sont préparées par macération comme décrit ci-après.

Divisez convenablement la drogue végétale. Prélevez-en un échantillon et déterminez la perte à la dessiccation (*2.2.32*). Sauf indication contraire, effectuez cette détermination sur 2,00-5,00 g de matière première divisée, dans un récipient taré à fond plat d'un diamètre de 45-55 mm préalablement séché selon la procédure indiquée pour la matière première. Desséchez la matière première à 105 °C pendant 2 h, puis laissez refroidir dans un dessiccateur.

Ajoutez à la drogue végétale, immédiatement après sa division, une quantité d'éthanol à 80 pour cent *V/V* (73 pour cent *m/m*) au moins égale à la moitié de sa masse. Conservez en récipient bien fermé à une température ne dépassant pas 20 °C.

Calculez à l'aide de l'expression suivante la quantité $A_3$ d'éthanol à 80 pour cent *V/V* (73 pour cent *m/m*), en kilogrammes, requise pour la masse $m$ de matière première à traiter, puis soustrayez du résultat la quantité d'éthanol à 80 pour cent *V/V* (73 pour cent *m/m*) déjà ajoutée et complétez le mélange avec la différence.

$$\frac{2 \times m \times T}{100}$$

$m$ = masse de la matière première, en kilogrammes,

$T$ = perte à la dessiccation de l'échantillon, en pourcentage.

Laissez reposer pendant au moins 10 jours à une température ne dépassant pas 20 °C, en agitant de temps en temps, puis pressez le mélange et filtrez le liquide exprimé.

**Ajustement à la teneur prescrite dans la monographie spécifique**

Déterminez la teneur pour cent du filtrat en résidu sec (*2.8.16*) ou, si la monographie le prescrit, sa teneur pour cent en constituant dosé. Calculez à l'aide de l'expression suivante la quantité $A_1$ d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*), en kilogrammes, requise pour l'ajustement :

$$\frac{m \times (N_x - N_0)}{N_0}$$

$m$ = masse du filtrat, en kilogrammes,

$N_0$ = teneur pour cent, en résidu sec ou en constituant dosé, requise dans la monographie spécifique,

$N_x$ = teneur pour cent en résidu sec ou en constituant dosé du filtrat.

Mélangez le filtrat avec la quantité d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*) ainsi calculée. Laissez reposer pendant au moins 5 jours à une température ne dépassant pas 20 °C. Filtrez si nécessaire.

**Déconcentration**

La 1re dilution « décimale » (D1) est préparée avec :

3 parties de teinture mère,

7 parties d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*).

La 2e dilution décimale (D2) est préparée avec :

1 partie de la 1re dilution « décimale »,

9 parties d'éthanol à 36 pour cent *V/V* (30 pour cent *m/m*).

La 3e dilution décimale (D3) est préparée avec :

1 partie de la 2e dilution décimale,

9 parties d'éthanol à 19 pour cent *V/V* (15 pour cent *m/m*).

Les dilutions décimales suivantes sont préparées comme indiqué pour D3.

**MÉTHODE 1.1.7 (ÉQUIVALENTE À LA MÉTHODE HAB 3c : TEINTURES MÈRES ET DILUTIONS LIQUIDES)**

La méthode 1.1.7 est utilisée pour les drogues végétales fraîches contenant généralement moins de 60 pour cent d'humidité (perte à la dessiccation).

Les teintures mères préparées par la méthode 1.1.7 (teneur en éthanol d'environ 36 pour cent *V/V* ou 30 pour cent *m/m*) sont préparées par macération comme décrit ci-après.

Divisez convenablement la drogue végétale. Prélevez-en un échantillon et déterminez la perte à la dessiccation (*2.2.32*). Sauf indication contraire, effectuez cette détermination sur 2,00-5,00 g de matière première divisée, dans un récipient taré à fond plat d'un diamètre de 45-55 mm préalablement séché selon la procédure indiquée pour la matière première. Desséchez la matière première à 105 °C pendant 2 h, puis laissez refroidir dans un dessiccateur.

Ajoutez à la drogue végétale, immédiatement après sa division, une quantité d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*) au moins égale à la moitié de sa masse. Conservez en récipient bien fermé à une température ne dépassant pas 20 °C.

Calculez à l'aide de l'expression suivante la quantité $A_3$ d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*), en kilogrammes, requise pour la masse $m$ de matière première à traiter, puis soustrayez du résultat la quantité d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*) déjà ajoutée et complétez le mélange avec la différence.

$$\frac{2 \times m \times T}{100}$$

$m$ = masse de la matière première, en kilogrammes,

$T$ = perte à la dessiccation de l'échantillon, en pourcentage.

Laissez reposer pendant au moins 10 jours à une température ne dépassant pas 20 °C, en agitant de temps en temps, puis pressez le mélange et filtrez le liquide exprimé.

**Ajustement à la teneur prescrite dans la monographie spécifique**

Déterminez la teneur pour cent du filtrat en résidu sec (*2.8.16*) ou, si la monographie le prescrit, sa teneur pour cent en constituant dosé. Calculez à l'aide de l'expression suivante la quantité $A_1$ d'éthanol à 36 pour cent *V/V* (30 pour cent *m/m*), en kilogrammes, requise pour l'ajustement :

$$\frac{m \times (N_x - N_0)}{N_0}$$

$m$ = masse du filtrat, en kilogrammes,

$N_0$ = teneur pour cent, en résidu sec ou en constituant dosé, requise dans la monographie spécifique,

$N_x$ = teneur pour cent en résidu sec ou en constituant dosé du filtrat.

Mélangez le filtrat avec la quantité d'éthanol à 36 pour cent *V/V* (30 pour cent *m/m*) ainsi calculée. Laissez reposer pendant au moins 5 jours à une température ne dépassant pas 20 °C. Filtrez si nécessaire.

**Déconcentration**

La 1re dilution « décimale » (D1) est préparée avec :

3 parties de teinture mère,

7 parties d'éthanol 36 pour cent *V/V* (30 pour cent *m/m*).

La 2e dilution décimale (D2) est préparée avec :

1 partie de la 1re dilution « décimale »,

9 parties d'éthanol à 18 pour cent *V/V* (15 pour cent *m/m*).

Les dilutions décimales suivantes sont préparées comme indiqué pour D2.

**MÉTHODE 1.1.8 (ÉQUIVALENTE À LA MÉTHODE HAB 4a : TEINTURES MÈRES ET DILUTIONS LIQUIDES)**

La méthode 1.1.8 est généralement utilisée pour les drogues végétales séchées.

Les teintures mères préparées par la méthode 1.1.8 sont obtenues par macération ou percolation comme décrit ci-après, avec 1 partie de drogue végétale séchée pour 10 parties d'éthanol de titre approprié : éthanol anhydre, à 96 pour cent *V/V* (94 pour cent *m/m*) à 90 pour cent *V/V* (86 pour cent *m/m*), à 80 pour cent *V/V* (73 pour cent *m/m*), à 70 pour cent *V/V* (62 pour cent *m/m*), à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*), à 36 pour cent *V/V* (30 pour cent *m/m*), à 18 pour cent *V/V* (15 pour cent *m/m*), sauf indication contraire dans la monographie spécifique.

*Production par macération*. Sauf indication contraire, divisez convenablement la drogue végétale, mélangez uniformément avec de l'éthanol de titre approprié et laissez reposer en récipient fermé pendant une durée appropriée. Séparez le marc de l'éthanol et, si nécessaire, pressez pour exprimer le liquide et réunissez les 2 liquides obtenus.

*Production par percolation*. Si nécessaire, divisez convenablement la drogue végétale. Mélangez uniformément avec une partie de l'éthanol de titre approprié et laissez reposer pendant une durée appropriée. Transférez dans un percolateur et laissez le percolat s'écouler lentement à température ambiante en veillant à ce que la drogue végétale soit toujours couverte par l'éthanol restant. Le marc peut être pressé et le liquide exprimé ajouté au percolat.

Si un ajustement à une concentration donnée est nécessaire, calculez à l'aide de l'expression suivante la quantité $A_1$ d'éthanol de titre approprié, en kilogrammes, requise pour obtenir la concentration spécifiée ou utilisée pour la production.

$$\frac{m \times (N_x - N_0)}{N_0}$$

$m$ = masse du macérat ou du percolat, en kilogrammes,

$N_0$ = teneur pour cent, en résidu sec ou en constituant dosé, requise dans la monographie spécifique,

$N_x$ = teneur pour cent en résidu sec ou en constituant dosé du macérat ou du percolat.

Mélangez le macérat ou le percolat avec la quantité d'éthanol de titre approprié ainsi calculée. Laissez reposer pendant au moins 5 jours à une température ne dépassant pas 20 °C. Filtrez si nécessaire.

**Déconcentration**

La teinture mère correspond à la 1re dilution décimale (Ø = D1).

La 2e dilution décimale (D2) est préparée avec :

1 partie de teinture mère (D1),

9 parties d'éthanol du même titre.

La 3e dilution décimale (D3) est préparée avec :

1 partie de la 2e dilution décimale,

9 parties d'éthanol du même titre.

Sauf si l'emploi d'éthanol de titre différent est spécifié, utilisez de l'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*) pour les dilutions décimales suivantes, à partir de D4, et procédez comme indiqué pour D3.

La 1re dilution « centésimale » (C1) est préparée avec :

10 parties de teinture mère (D1),

90 parties d'éthanol du même titre.

La 2e dilution centésimale (C2) est préparée avec :

1 partie de la 1re dilution « centésimale »,

99 parties d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*), sauf si l'emploi d'éthanol de titre différent est spécifié.

Les dilutions centésimales suivantes sont préparées comme indiqué pour C2.

**MÉTHODE 1.1.9 (ÉQUIVALENTE À LA MÉTHODE HAB 4b : TEINTURES MÈRES ET DILUTIONS LIQUIDES)**

La méthode 1.1.9 est généralement utilisée pour les matières animales.

Les teintures mères préparées par la méthode 1.1.9 sont obtenues par macération ou percolation comme décrit ci-après, en utilisant 1 partie de matière animale pour 10 parties d'éthanol de titre approprié (anhydre, 96 pour cent *V/V* ou 94 pour cent *m/m*, 90 pour cent *V/V* ou 86 pour cent *m/m*, 80 pour cent *V/V* ou 73 pour cent *m/m*, 70 pour cent *V/V* ou 62 pour cent *m/m*, 50 pour cent *V/V* ou 43 pour cent *m/m*, 36 pour cent *V/V* ou 30 pour cent *m/m*, 18 pour cent *V/V* ou 15 pour cent *m/m*), sauf indication contraire dans la monographie spécifique.

*Production par macération.* Sauf indication contraire, divisez convenablement la matière animale, mélangez uniformément avec de l'éthanol de titre approprié et laissez reposer en récipient fermé pendant une durée appropriée. Séparez le marc de l'éthanol et, si nécessaire, pressez pour exprimer le liquide et réunissez les 2 liquides obtenus.

*Production par percolation.* Si nécessaire, divisez convenablement la matière animale. Mélangez uniformément avec une partie de l'éthanol de titre approprié et laissez reposer pendant une durée appropriée. Transférez dans un percolateur et laissez le percolat s'écouler lentement à température ambiante en veillant à ce que la matière animale soit toujours couverte par l'éthanol restant. Le marc peut être pressé et le liquide exprimé ajouté au percolat.

Si un ajustement à une concentration donnée est nécessaire, calculez à l'aide de l'expression suivante la quantité $A_1$ d'éthanol de titre approprié, en kilogrammes, requise pour obtenir la concentration spécifiée ou utilisée pour la production.

$$\frac{m \times (N_x - N_0)}{N_0}$$

$m$ = masse du macérat ou du percolat, en kilogrammes,

$N_0$ = teneur pour cent, en résidu sec ou en constituant dosé, requise dans la monographie spécifique,

$N_x$ = teneur pour cent en résidu sec ou en constituant dosé du macérat ou du percolat.

Mélangez le macérat ou le percolat avec la quantité d'éthanol de titre approprié ainsi calculée. Laissez reposer pendant au moins 5 jours à une température ne dépassant pas 20 °C. Filtrez si nécessaire.

**Déconcentration**

La teinture mère correspond à la 1re dilution décimale (Ø = D1).

La 2e dilution décimale (D2) est préparée avec :

1 partie de teinture mère (D1),

9 parties d'éthanol du même titre.

La 3e dilution décimale (D3) est préparée avec :

1 partie de la 2e dilution décimale,

9 parties d'éthanol du même titre.

Sauf si l'emploi d'éthanol de titre différent est spécifié, utilisez de l'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*) pour les dilutions décimales suivantes, à partir de D4, et procédez comme indiqué pour D3.

La 1re dilution « centésimale » (C1) est préparée avec :

10 parties de teinture mère (D1),

90 parties d'éthanol du même titre.

La 2e dilution centésimale (C2) est préparée avec :

1 partie de la 1re dilution « centésimale »,

99 parties d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*), sauf si l'emploi d'éthanol de titre différent est spécifié.

Les dilutions centésimales suivantes sont préparées comme indiqué pour C2.

**MÉTHODE 1.1.10 (PHARMACOPÉE FRANÇAISE)**

La méthode 1.1.10 est généralement utilisée pour les drogues végétales. L'état de la drogue végétale (fraîche ou séchée) est indiqué dans la monographie spécifique.

Les teintures mères préparées par la méthode 1.1.10 sont obtenues par macération.

Divisez convenablement la drogue végétale. Prélevez-en un échantillon et déterminez soit la perte à la dessiccation à 105 °C pendant 2 h (*2.2.32*) soit la teneur en eau (*2.2.13*). En tenant compte du résultat, calculez et ajoutez à la drogue végétale la quantité d'éthanol de titre approprié requise pour produire, sauf indication contraire, une teinture mère au 1/10 de teneur en éthanol appropriée. Laissez macérer pendant au moins 10 jours, en agitant suffisamment.

Séparez le marc de l'éthanol et exprimez-le sous pression si nécessaire. Mélangez les liquides obtenus, laissez reposer 48 h et filtrez. Pour les teintures mères à teneur spécifiée, un ajustement peut être effectué si nécessaire par addition d'éthanol de même titre que celui utilisé pour préparer la teinture.

**Déconcentration**

La 1re dilution décimale (D1) est préparée avec :

1 partie de teinture mère,

9 parties d'éthanol de titre approprié.

La 2e dilution décimale (D2) est préparée avec :

1 partie de la 1re dilution décimale,

9 parties d'éthanol de titre approprié.

Les dilutions décimales suivantes sont préparées comme indiqué pour D2, avec de l'éthanol de titre approprié.

La 1re dilution centésimale (C1) est préparée avec :

1 partie de teinture mère,

99 parties d'éthanol de titre approprié.

La 2e dilution centésimale (C2) est préparée avec :

1 partie de la 1re dilution centésimale,

99 parties d'éthanol de titre approprié.

Les dilutions centésimales suivantes sont préparées comme indiqué pour C2, avec de l'éthanol de titre approprié.

**MÉTHODE 1.1.11 (PHARMACOPÉE FRANÇAISE)**

La méthode 1.1.11 est généralement utilisée pour les matières animales.

Les teintures mères préparées par la méthode 1.1.11 sont obtenues par macération.

Le rapport en masse, de matière première sur teinture mère, est généralement de 1/20. A la matière première convenablement divisée, ajoutez la quantité d'éthanol de titre approprié requise pour produire une teinture mère au 1/20. Laissez macérer pendant au moins 10 jours, en agitant suffisamment. Décantez et filtrez. Laissez reposer pendant 48 h et filtrez à nouveau. Pour les teintures mères à teneur spécifiée, un ajustement peut être effectué si nécessaire par addition d'éthanol de même titre que celui utilisé pour préparer la teinture.

**Déconcentration**

La 1re dilution décimale (D1) est préparée avec :

1 partie de teinture mère,

9 parties d'éthanol de titre approprié.

La 2e dilution décimale (D2) est préparée avec :

1 partie de la 1re dilution décimale,

9 parties d'éthanol de titre approprié.

Les dilutions décimales suivantes sont préparées comme indiqué pour D2, avec de l'éthanol de titre approprié.

La 1re dilution centésimale (C1) est préparée avec :

1 partie de teinture mère,

99 parties d'éthanol de titre approprié.

La 2e dilution centésimale (C2) est préparée avec :

1 partie de la 1re dilution centésimale,

99 parties d'éthanol de titre approprié.

Les dilutions centésimales suivantes sont préparées comme indiqué pour C2, avec de l'éthanol de titre approprié.

## 2. MACÉRATS GLYCÉRINÉS

### *MÉTHODE 2.1*

La méthode 2.1 est utilisée pour la macération de matières premières d'origine animale ou végétale dans du glycérol à 85 pour cent ou dans un mélange de glycérol/éthanol de concentration appropriée. Les matières premières pathologiques sont exclues.

Si besoin est, divisez convenablement les matières premières avant emploi.

#### MÉTHODES 2.1.1, 2.1.2 (ÉQUIVALENTES AUX MÉTHODES HAB 42a, 42b : TEINTURES MÈRES ET DILUTIONS LIQUIDES DE TEINTURES MÈRES)

Les matières premières utilisées sont d'origine animale (animaux récemment tués ou parties de ces animaux). Le traitement des matières premières intervient immédiatement après la mort des animaux.

**Macération**

Dispersez 1 partie de la matière première animale convenablement divisée dans :

- 9 parties (dilution décimale) ou 99 parties (dilution centésimale) de glycérol à 85 pour cent pour la méthode 2.1.1,
- 2,1 parties de glycérol à 85 pour cent pour la méthode 2.1.2.

Laissez macérer pendant au moins 2 h, puis dynamisez par succussion. Filtrez si nécessaire.

Dans certains cas justifiés, il est admis d'ajouter 1 partie de glycérol à 85 pour cent à 1 partie de la matière première animale avant de procéder à sa division. Si la matière première est utilisée en très petite quantité, la dilution peut être préparée par dispersion de 1 partie de matière première convenablement divisée dans 99 parties de glycérol à 85 pour cent (C1 ou « D2 » si la dilution doit servir à la préparation de dilutions décimales).

**Déconcentration**

*Méthode 2.1.1*

La 2e dilution décimale (D2) est préparée avec :

1 partie de macérat glycériné D1,

9 parties de glycérol à 85 pour cent ou d'éthanol à 18 pour cent *V/V* (15 pour cent *m/m*).

Les dilutions décimales suivantes sont préparées comme décrit pour D2 mais avec comme véhicule de l'éthanol à 18 pour cent *V/V* (15 pour cent *m/m*).

La 2e dilution centésimale (C2) est préparée avec :

1 partie de macérat glycériné C1,

99 parties d'éthanol à 18 pour cent *V/V* (15 pour cent *m/m*).

Les dilutions centésimales suivantes sont préparées comme indiqué pour C2.

*Méthode 2.1.2*

La 1re dilution « décimale » (D1) est préparée avec :

3 parties de macérat glycériné,

7 parties d'eau pour préparations injectables.

La 2e dilution décimale (D2) est préparée avec :

1 partie de D1,

9 parties d'eau pour préparations injectables.

Les dilutions décimales suivantes sont préparées comme indiqué pour D2.

#### MÉTHODE 2.1.3 (PHARMACOPÉE FRANÇAISE)

Les matières premières utilisées sont d'origine animale ou végétale.

**Macération**

Divisez convenablement la matière première. Prélevez-en un échantillon et déterminez soit la perte à la dessiccation à 105 °C pendant 2 h (*2.2.32*) soit la teneur en eau (*2.2.13*). En tenant compte du résultat, calculez et ajoutez à la matière première la quantité de mélange éthanol/glycérol de concentration appropriée requise pour produire, sauf indication contraire, un macérat glycériné au 1/20. Laissez macérer pendant au moins 3 semaines, en agitant suffisamment. Séparez le marc du liquide et exprimez-le sous pression si nécessaire. Mélangez les liquides obtenus, laissez reposer 48 h et filtrez.

**Déconcentration**

La 1re dilution décimale (D1) est préparée avec :

1 partie de macérat glycériné,

9 parties d'un mélange eau/éthanol/glycérol de concentration appropriée.

La 2e dilution décimale (D2) est préparée avec :

1 partie de la 1re dilution décimale,

9 parties d'un mélange eau/éthanol/glycérol de concentration appropriée.

Les dilutions décimales suivantes sont préparées comme indiqué pour D2, avec le même véhicule ou un autre véhicule approprié.

La 1re dilution centésimale (C1) est préparée avec :

1 partie de macérat glycériné,

99 parties d'un mélange eau/éthanol/glycérol de concentration appropriée.

La 2e dilution centésimale (C2) est préparée avec :

1 partie de la 1re dilution centésimale,

99 parties d'un mélange eau/éthanol/glycérol de concentration appropriée.

Les dilutions centésimales suivantes sont préparées comme indiqué pour C2, avec le même véhicule ou un autre véhicule approprié.

### *MÉTHODE 2.2*

#### MÉTHODES 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3, 2.2.4 (ÉQUIVALENTES AUX MÉTHODES HAB 41a, 41b, 41c, 41d : TEINTURES MÈRES GLYCÉRINÉES ET DILUTIONS LIQUIDES DE CES TEINTURES MÈRES)

La méthode 2.2 est utilisée pour la macération de matières premières d'origine animale dans une solution de glycérol contenant du chlorure de sodium. Les matières premières pathologiques sont exclues.

Pour les méthodes 2.2.1, 2.2.2 et 2.2.3, les matières premières utilisées sont des animaux récemment tués ou des parties ou sécrétions de ces animaux. Les animaux inférieurs sont asphyxiés avec du dioxyde de carbone dans un récipient fermé. Le traitement des matières premières intervient dans tous les cas immédiatement après la mort des animaux.

Pour la méthode 2.2.4, les matières premières utilisées sont des composants sanguins provenant de chevaux vivants.

**Collecte et/ou prétraitement des échantillons**

Les matières premières utilisées pour les méthodes 2.2.1, 2.2.2 et 2.2.3 sont convenablement divisées avant emploi, dans les cas appropriés.

Le sang utilisé pour la méthode 2.2.4 est prélevé par un vétérinaire. L'utilisation de sang d'animaux saignés à mort est proscrite. A 200 mL du sang prélevé, ajoutez 15 UI d'héparine sodique et 0,625 mL d'une solution de chlorure de sodium à 9 g/kg par millilitre. Séparez les composants sanguins par centrifugation fractionnée et remettez individuellement en suspension chacun des culots cellulaires dans 1,1 mL d'une solution de chlorure de sodium à 9 g/kg. A partir des ces suspensions cellulaires, préparez le macérat glycériné.

**Macération**

Mélangez 1 partie de matière première (matériel animal convenablement divisé, sécrétions animales ou suspension de cellules sanguines, selon la méthode utilisée) avec 5 parties d'une solution de chlorure de sodium de concentration appropriée (voir tableau 2371.-1) et 95 parties de glycérol. Laissez reposer au moins 7 jours à l'abri de la lumière, puis recueillez le liquide. Si nécessaire, pour les méthodes 2.2.1, 2.2.2 et 2.2.3, centrifugez préalablement, puis filtrez le surnageant si nécessaire. Le liquide ou filtrat recueilli, selon le cas, constitue le macérat glycériné.

Avant de procéder au traitement du macérat glycériné, remettez en suspension les sédiments éventuels.

Tableau 2371.-1

| Méthodes 2.2.1 et 2.2.4 | Méthode 2.2.2 | Méthode 2.2.3 |
|---|---|---|
| Solution de chlorure de sodium à 15 g/kg dans l'eau purifiée | Solution de chlorure de sodium à 40 g/kg dans l'eau purifiée | Solution de chlorure de sodium à 80 g/kg dans l'eau purifiée |

**Véhicule**

0,2 partie de bicarbonate de sodium et 8,8 parties de chlorure de sodium dans 991 parties d'eau pour préparations injectables ou d'eau purifiée, selon le cas.

**Déconcentration**

Le macérat glycériné correspond à la 2[e] dilution décimale (« D2 ») ou à la 1[re] dilution centésimale (C1).

La 3[e] dilution décimale (D3) est préparée avec :

1 partie de la 2[e] dilution décimale,

9 parties du véhicule approprié.

Les dilutions décimales suivantes sont préparées comme indiqué pour D3.

Dans les cas appropriés, la 4[e] dilution décimale (D4) peut être préparée avec 1 partie de la 3[e] dilution décimale, 5,6 parties du véhicule et 3,4 parties d'eau pour préparations injectables.

La 2[e] dilution centésimale (C2) est préparée avec :

1 partie de la 1[re] dilution centésimale,

99 parties du véhicule approprié.

Les dilutions centésimales suivantes sont préparées comme indiqué pour C2.

## 3. DILUTIONS LIQUIDES

*MÉTHODE 3.1*

Les méthodes 3.1.1, 3.1.2 et 3.1.3 sont utilisées pour la dissolution de toute matière première organique ou inorganique appropriée, par exemple des minéraux ou des venins.

Sauf indication contraire, dissolvez 1 partie de matière première dans 9 parties (D1) ou 99 parties (C1) du véhicule liquide et dynamisez par succussion.

Dans les cas justifiés et autorisés, en cas d'insuffisance de solubilité de la matière première dans le véhicule spécifié, préparez directement la première dilution possible. Par exemple, si la matière première est « peu soluble », dissolvez-la à raison de 1 partie pour 99 parties de véhicule (C1, ou « D2 » si elle doit servir à la préparation de dilutions décimales).

**MÉTHODES 3.1.1, 3.1.2 (ÉQUIVALENTES AUX MÉTHODES HAB 5a, 5b : SOLUTIONS, SOLUTIONS AQUEUSES)**

**Véhicules**

Les véhicules indiqués dans le tableau 2371.-2 peuvent être utilisés.

Tableau 2371.-2

| Méthode 3.1.1 | Méthode 3.1.2 |
|---|---|
| Ethanol anhydre | Eau pour préparations injectables |
| Ethanol à 96 pour cent *V/V* (94 pour cent *m/m*) | Eau purifiée |
| Ethanol à 90 pour cent *V/V* (86 pour cent *m/m*) | |
| Ethanol à 80 pour cent *V/V* (73 pour cent *m/m*) | |
| Ethanol à 70 pour cent *V/V* (62 pour cent *m/m*) | |
| Ethanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*) | |
| Ethanol à 36 pour cent *V/V* (30 pour cent *m/m*) | |
| Ethanol à 18 pour cent *V/V* (15 pour cent *m/m*) | |
| Eau purifiée | |
| Glycérol à 85 pour cent | |

Si, pour la méthode 3.1.1, l'éthanol à 18 pour cent *V/V* (15 pour cent *m/m*) est utilisé, la matière première peut être dissoute dans 7,58 parties d'eau purifiée et la teneur en éthanol ajustée par addition à la solution de 1,42 partie d'éthanol à 96 pour cent *V/V* (94 pour cent *m/m*), pour les dilutions décimales. Pour les dilutions centésimales, utilisez 83,4 parties d'eau purifiée pour 15,6 parties d'éthanol à 96 pour cent *V/V* (94 pour cent *m/m*).

Si, dans la méthode 3.1.2, la matière première n'est pas stable et/ou soluble dans l'eau, du glycérol à 85 pour cent peut être ajouté au véhicule, dans une proportion maximale de 35 pour cent, pour la déconcentration jusqu'au niveau D4.

**Déconcentration**

Sauf indication contraire, la 2[e] dilution décimale (D2) est préparée avec :

1 partie de la 1[re] dilution décimale (D1),

9 parties d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*) dans la méthode 3.1.1 ou 9 parties d'eau pour préparations injectables (ou d'eau purifiée, selon le cas) dans la méthode 3.1.2.

Les dilutions décimales suivantes sont préparées comme indiqué pour D2.

Sauf indication contraire, la 2[e] dilution centésimale (C2) est préparée avec :

1 partie de la 1[re] dilution centésimale (C1),

99 parties d'éthanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*) dans la méthode 3.1.1 ou 99 parties d'eau pour préparations injectables (ou d'eau purifiée, selon le cas) dans la méthode 3.1.2.

Les dilutions centésimales suivantes sont préparées comme indiqué pour C2.

**Additifs**

Si, dans la méthode 3.1.1, une réaction telle qu'une précipitation est observée dans la dilution finale, l'utilisation des additifs suivants est admise, sauf indication contraire, pour améliorer la stabilité et/ou la solubilité :

- acide acétique glacial,
- acide chlorhydrique concentré,
- acide lactique,
- hydroxyde de sodium.

Lorsqu'une solution ou dilution a fait l'objet d'un ajustement de pH, elle ne doit plus subir de déconcentration.

**MÉTHODE 3.1.3**

**Véhicules**

La déconcentration peut être effectuée avec des véhicules appropriés, utilisés seuls ou en mélange, par exemple de l'éthanol de titre adéquat, du glycérol ou de l'eau purifiée.

**Déconcentration**

Sauf indication contraire, la 2e dilution décimale (D2) est préparée avec :

1 partie de la 1re dilution décimale (D1),

9 parties du véhicule approprié.

Les dilutions décimales suivantes sont préparées comme indiqué pour D2.

Sauf indication contraire, la 2e dilution centésimale (C2) est préparée avec :

1 partie de la 1re dilution centésimale (C1),

99 parties du véhicule approprié.

Les dilutions centésimales suivantes sont préparées comme indiqué pour C2.

*MÉTHODE 3.2*

La méthode 3.2 est généralement utilisée pour préparer des dilutions liquides à partir de triturations de substances le plus souvent assez solubles à pratiquement insolubles.

**MÉTHODES 3.2.1, 3.2.2 (ÉQUIVALENTES AUX MÉTHODES HAB 8a, 8b : PRÉPARATIONS LIQUIDES OBTENUES À PARTIR DE TRITURATIONS, PRÉPARATIONS AQUEUSES OBTENUES À PARTIR DE TRITURATIONS)**

Les dilutions liquides préparées selon les méthodes 3.2.1 et 3.2.2 sont produites à partir de triturations D4, D5 et D6 ou de triturations C4, C5 et C6, préparées selon la méthode 4.1.1, par 2 étapes de déconcentration au moins.

**Véhicules**

Les véhicules indiqués dans le tableau 2371.-3 peuvent être utilisés.

Tableau 2371.-3

| Méthode 3.2.1 | Méthode 3.2.2 |
|---|---|
| 1re déconcentration :<br>eau purifiée<br><br>2e déconcentration :<br>éthanol à 36 pour cent *V/V*<br>(30 pour cent *m/m*)<br>Déconcentrations suivantes :<br>éthanol à 50 pour cent *V/V*<br>(43 pour cent *m/m*) | Toutes déconcentrations :<br>eau pour préparations injectables<br>eau purifiée |

**Déconcentration**

Pour la première déconcentration liquide, dissolvez 1 partie de la trituration dans 9 parties (dilutions décimales) ou 99 parties (dilutions centésimales) du véhicule spécifié (voir tableau 2371.-3) et dynamisez par succussion. Pour les déconcentrations suivantes, procédez de même sur 1 partie de la dilution antérieure.

Les dilutions D6, D7, C6 et C7 préparées selon la méthode ci-dessus ne doivent pas servir à préparer de nouvelles dilutions.

**MÉTHODE 3.2.3**

Les dilutions liquides préparées selon la méthode 3.2.3 sont produites à partir de triturations D2 et suivantes ou de triturations C1, C2, C3 ou C4, préparées selon la méthode 4.1.2.

**Véhicules**

Des véhicules appropriés tels que de l'éthanol de titre approprié ou de l'eau purifiée peuvent être utilisés.

**Déconcentration**

Sauf indication contraire, la première dilution décimale liquide (Dn-1) est préparée avec :

1 partie de la trituration décimale Dn-2,

9 parties d'eau purifiée ou d'un autre véhicule approprié en proportions convenables.

La dilution décimale suivante (Dn) est préparée avec :

1 partie de la première dilution décimale liquide Dn-1,

9 parties d'un véhicule approprié.

Les dilutions décimales suivantes sont préparées comme indiqué pour Dn.

Sauf indication contraire, la première dilution centésimale liquide (Cn-1) est préparée avec :

1 partie de la trituration centésimale Cn-2,

99 parties d'eau purifiée ou d'un autre véhicule approprié en proportions convenables.

La dilution centésimale suivante (Cn) est préparée avec :

1 partie de la première dilution centésimale liquide Cn-1,

99 parties d'un véhicule approprié.

Les dilutions centésimales suivantes sont préparées comme indiqué pour Cn.

4. TRITURATIONS

*MÉTHODE 4.1*

La méthode 4.1 est utilisée pour la préparation de triturations (ou « dilutions solides ») à partir de matières premières ou à partir de triturations obtenues selon les méthodes 4.2.1 ou 4.2.2. La durée et l'intensité de trituration sont suffisantes pour assurer l'homogénéité et réaliser la déconcentration.

**Véhicule**

Le lactose monohydraté est utilisé, sauf indication contraire.

**MÉTHODE 4.1.1 (ÉQUIVALENTE À LA MÉTHODE HAB 6 : TRITURATIONS)**

La préparation des triturations peut être manuelle ou mécanique. Les quantités supérieures à 1 kg sont traitées par trituration mécanique. La taille des particules de matière première obtenues dans la première dilution décimale ou centésimale n'est pas supérieure à 100 μm, sauf avis contraire dans la monographie spécifique.

**Rapport matière première/véhicule**

| Triturations décimales | Triturations centésimales |
|---|---|
| La 1re trituration décimale (D1) est préparée avec : | La 1re trituration centésimale (C1) est préparée avec : |
| 1 partie de matière première | 1 partie de matière première |
| 9 parties de véhicule | 99 parties de véhicule |
| Les triturations décimales suivantes (Dn) sont préparées comme indiqué pour D1, avec 1 partie de la trituration précédente (Dn-1). | Les triturations centésimales suivantes (Cn) sont préparées comme indiqué pour C1, avec 1 partie de la trituration précédente (Cn-1). |

Lorsque la matière première est une plante fraîche, la quantité de véhicule ajouté est déterminée de façon à obtenir 10 parties de trituration (trituration décimale) ou 100 parties de trituration (trituration centésimale) à partir de 1 partie de matière première (remplacer la masse d'eau perdue par rapport à la plante fraîche par une quantité équivalente de véhicule). Il peut être nécessaire d'appliquer à la dilution solide un traitement de dessiccation douce approprié.

Dans les cas justifiés et autorisés, il peut être nécessaire de produire directement une dilution C1 (ou « D2 » si elle doit servir à la préparation de triturations décimales) avec 1 partie de matière première et 99 parties de véhicule.

**Trituration**

Sauf exception justifiée et autorisée, divisez le véhicule en 3 parties égales ; incorporez la matière première au premier tiers du véhicule, puis ajoutez le deuxième tiers et enfin le troisième, en triturant soigneusement après chaque addition.

Pour la trituration mécanique, utilisez une machine permettant d'obtenir une première trituration décimale ou centésimale satisfaisant aux exigences de taille de particules. Une machine munie d'un système de raclage peut être utilisée pour assurer l'homogénéité de la trituration. Sauf exception justifiée et autorisée, la durée de trituration requise est de 1 h au minimum.

Pour la trituration manuelle, divisez le véhicule en 3 parties égales et triturez brièvement le premier tiers du véhicule dans un mortier de porcelaine. Ajoutez la matière première, triturez le mélange pendant 6 min, remuez pendant 4 min en raclant les parois avec un instrument non métallique approprié (par exemple une spatule de porcelaine). Triturez à nouveau pendant 6 min, puis remuez pendant 4 min en raclant les parois. Ajoutez le deuxième tiers du véhicule et poursuivez comme précédemment. Procédez de même avec le reste du véhicule. La durée totale de trituration requise est donc de 1 h au minimum. Répétez l'ensemble du processus pour chacune des dilutions solides suivantes.

Les triturations D5 ou C5 et suivantes peuvent également être préparées comme suit, par traitement mécanique intense à l'aide d'un mélangeur approprié : ajoutez la dilution solide à un tiers du véhicule et mélangez. Ajoutez le second tiers du véhicule, mélangez, puis procédez de la même manière avec le dernier tiers du véhicule. Sauf exception justifiée et autorisée, la durée totale de mélange requise est de 1 h au minimum.

Dans tous les cas, il est possible de passer en milieu liquide à partir des 4$^{e}$, 5$^{e}$ et 6$^{e}$ triturations décimales ou centésimales, comme décrit dans les méthodes 3.2.1 et 3.2.2.

**MÉTHODE 4.1.2 (PHARMACOPÉE FRANÇAISE)**

**Trituration**

Effectuez la préparation des triturations selon le mode opératoire suivant.

*Triturations décimales*

Pulvérisez 1 partie de la souche homéopathique. Triturez soigneusement avec une petite quantité de véhicule. Ajoutez-en peu à peu jusqu'à utilisation de 9 parties de ce véhicule. La trituration obtenue est la 1$^{re}$ décimale (D1).

Prélevez 1 partie de cette trituration et triturez comme précédemment avec 9 parties de véhicule. La trituration obtenue est la 2$^{e}$ décimale (D2).

Dans tous les cas il est possible de passer en milieu liquide au-delà de la 7$^{e}$ décimale (D7), comme décrit dans la méthode 3.2.3.

*Triturations centésimales*

Opérez de manière identique mais selon la série centésimale.

Dans tous les cas, il est possible de passer en milieu liquide au-delà de la 3$^{e}$ centésimale (C3), comme décrit dans la méthode 3.2.3.

*MÉTHODE 4.2*

La méthode 4.2 est utilisée pour la préparation de triturations (ou « dilutions solides ») à partir de préparations liquides, telles que des teintures mères et solutions, leurs dilutions, des mélanges et des mélanges codéconcentrés.

Imprégnez graduellement la masse totale du véhicule, desséchez doucement le mélange humide, broyez et tamisez si nécessaire, puis mélangez et triturez le temps nécessaire pour assurer l'homogénéité et réaliser la déconcentration. Poursuivez la trituration comme décrit pour les méthodes 4.1.1 ou 4.1.2.

**Véhicule**

Le lactose monohydraté est utilisé, sauf indication contraire.

**MÉTHODE 4.2.1 (ÉQUIVALENTE À LA MÉTHODE HAB 7 : TRITURATIONS)**

**Rapport matière première/véhicule**

La quantité de véhicule ajoutée doit, dans tous les cas, permettre d'obtenir 10 parties de trituration (dilution décimale) ou 100 parties de trituration (dilution centésimale) à partir du nombre de parties de la préparation liquide spécifié (voir tableaux 2371.-4), compte tenu de la masse du résidu sec. Lorsque le résidu sec est considéré comme négligeable, la quantité de véhicule ajoutée est de 10 parties (dilution décimale) ou 100 parties (dilution centésimale) pour 1 partie de préparation liquide.

Tableau 2371.-4

| Triturations décimales | Triturations centésimales |
|---|---|
| **Teintures mères préparées selon les méthodes 1.1.1, 1.2.1 et 1.2.2** | |
| La 1$^{re}$ trituration « décimale » (D1) est préparée avec :<br>2 parties de teinture mère<br>au maximum 10 parties de véhicule, selon la masse du résidu sec | La 1$^{re}$ trituration « centésimale » (C1) est préparée avec :<br>2 parties de teinture mère<br>au maximum 100 parties de véhicule, selon la masse du résidu sec |
| **Teintures mères préparées selon les méthodes 1.1.2, 1.3.1, 1.3.2 et 1.3.3** | |
| La 1$^{re}$ trituration « décimale » (D1) est préparée avec :<br>3 parties de teinture mère<br>au maximum 10 parties de véhicule, selon la masse du résidu sec | La 1$^{re}$ trituration « centésimale » (C1) est préparée avec :<br>3 parties de teinture mère<br>au maximum 100 parties de véhicule, selon la masse du résidu sec |
| **Teintures mères préparées selon les méthodes 1.4.1 et 1.4.2**<br>*La teinture mère correspond à la 1$^{re}$ dilution décimale (D1).* | |
| La 2$^{e}$ trituration décimale (D2) est préparée avec :<br>1 partie de teinture mère<br>au maximum 10 parties de véhicule, selon la masse du résidu sec | La 1$^{re}$ trituration « centésimale » (C1) est préparée avec :<br>10 parties de teinture mère<br>au maximum 100 parties de véhicule, selon la masse du résidu sec |
| **Solutions préparées selon la méthode 3.1.1 ou dilutions liquides, mélanges et mélanges codéconcentrés** | |
| La (n+1)$^{e}$ trituration décimale (Dn+1) est préparée avec :<br>1 partie de la dilution Dn<br>au maximum 10 parties de véhicule, selon la masse du résidu sec | La (n+1)$^{e}$ trituration centésimale (Cn+1) est préparée avec :<br>1 partie de la dilution Cn<br>au maximum 100 parties de véhicule, selon la masse du résidu sec |

**MÉTHODE 4.2.2**

**Rapport matière première/véhicule**

| **Teintures mères préparées selon les méthodes 1.4.3 et 1.4.4** | |
|---|---|
| La 1$^{re}$ trituration décimale (D1) est préparée avec :<br>1 partie de la teinture mère<br>10 parties de véhicule | 1$^{re}$ trituration centésimale (C1) est préparée avec :<br>1 partie de la teinture mère<br>100 parties de véhicule |

5. AUTRES PRÉPARATIONS

*MÉTHODE 5.1*

La méthode 5.1 est utilisée pour produire des préparations homéopathiques par codéconcentration d'au moins 2 souches et/ou dilutions de souches, la codéconcentration consistant à mélanger plusieurs souches ou dilutions de souches puis à effectuer sur le mélange une ou plusieurs étapes de déconcentration.

**MÉTHODES 5.1.1, 5.1.2, 5.1.3 (ÉQUIVALENTES AUX MÉTHODES HAB 40a, 40b, 40c : MÉLANGES CODÉCONCENTRÉS)**

Les souches et/ou dilutions de souches indiquées dans le tableau 2371.-5 peuvent être utilisées.

Tableau 2371.-5

| Méthode 5.1.1 | Méthode 5.1.2 | Méthode 5.1.3 |
|---|---|---|
| Souches | Préparations aqueuses | Triturations |
| Solutions | Macérats glycérinés et leurs dilutions aqueuses | |
| Triturations | Triturations | |
| Dilutions liquides | | |
| Teintures mères préparées par une méthode spécifiant une dilution au 1/10 (ou au 1/100) | | |

Préparations homéopathiques

**Véhicules**

Le choix du véhicule est déterminé par les exigences spécifiques s'appliquant éventuellement à la souche et à la forme pharmaceutique considérées, et est soumis à ces exigences (voir tableau 2371.-6).

Tableau 2371.-6

| Méthode 5.1.1 | Méthode 5.1.2 | Méthode 5.1.3 |
|---|---|---|
| Ethanol à 96 pour cent *V/V* (94 pour cent *m/m*) | Eau pour préparations injectables | Lactose monohydraté |
| Ethanol à 90 pour cent *V/V* (86 pour cent *m/m*) | Eau purifiée | |
| Ethanol à 80 pour cent *V/V* (73 pour cent *m/m*) | Sirop de sucre [saccharose, eau purifiée (64:36)] | |
| Ethanol à 70 pour cent *V/V* (62 pour cent *m/m*) | | |
| Ethanol à 50 pour cent *V/V* (43 pour cent *m/m*) | | |
| Ethanol à 36 pour cent *V/V* (30 pour cent *m/m*) | | |
| Ethanol à 18 pour cent *V/V* (15 pour cent *m/m*) | | |

Dans la méthode 5.1.1, si l'on procède à partir d'une trituration et sous réserve de justification, le véhicule utilisé pour la 1re étape de déconcentration est de l'eau purifiée.

Dans la méthode 5.1.2, si l'on procède à partir d'un macérat glycériné contenant du chlorure de sodium, le véhicule utilisé est, sauf exception justifiée et autorisée, un mélange de 0,2 partie de bicarbonate de sodium et de 8,8 parties de chlorure de sodium dans 991 parties d'eau pour préparations injectables.

**Déconcentration**

Pour chaque étape de déconcentration, mélangez et dynamisez par succussion ou trituration 1 partie du mélange avec 9 parties (dilution décimale) ou 99 parties (dilution centésimale) du véhicule approprié.

MÉTHODE 5.1.4

**Véhicules**

L'éthanol de titre approprié, l'eau purifiée ou le lactose monohydraté peuvent par exemple être utilisés.

**Déconcentration**

La déconcentration peut être effectuée comme prescrit pour les méthodes 5.1.1, 5.1.2 et 5.1.3, soit à la dernière étape soit sur plusieurs étapes successives.

MÉTHODE 5.1.5

**Véhicule**

L'éthanol de titre approprié, l'eau purifiée ou le lactose monohydraté peuvent par exemple être utilisés.

**Déconcentration**

Pour une codéconcentration de dilutions centésimales, chaque dilution Cn-1 représentera 1 pour cent du produit final et la proportion de véhicule à ajouter sera ajustée en conséquence, en fonction de la proportion des substances actives [100 pour cent – (1 pour cent × nombre de substances actives)]. La même procédure s'applique, en proportions appropriées, à la codéconcentration de dilutions décimales.

**01/2011:1038**

# PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

## Praeparationes homoeopathicae

DÉFINITION

Les préparations homéopathiques sont obtenues à partir de substances, de produits ou de préparations appelés souches selon un procédé de fabrication homéopathique. Une préparation homéopathique est généralement désignée par le nom latin de la souche suivi de l'indication du degré de dilution.

**Matières premières**

Les matières premières utilisées pour la fabrication de préparations homéopathiques peuvent être d'origine naturelle ou synthétique.

Dans le cas de matières premières d'origine animale ou humaine, des mesures appropriées sont prises afin de réduire le risque lié à la présence d'agents infectieux, notamment les virus (*5.1.7*), dans les préparations homéopathiques. A cette fin, il est démontré que :

– la méthode de préparation inclut une ou plusieurs étapes dont il a été démontré qu'elles permettent l'élimination ou l'inactivation des agents infectieux,
– dans les cas appropriés, les matières premières d'origine animale satisfont à la monographie *Produits comportant un risque de transmission d'agents d'encéphalopathies spongiformes animales (1483),*
– dans les cas appropriés, les animaux et les tissus à partir desquels les matières premières sont obtenues répondent aux exigences de santé requises par les autorités compétentes pour les animaux destinés à la consommation humaine,
– pour les produits d'origine humaine, le donneur suit les recommandations qui s'appliquent aux donneurs de sang humain et aux dons de sang (voir *Plasma humain pour fractionnement (0853)*), sauf exception justifiée et autorisée.

Les matières premières d'origine végétale, animale ou humaine peuvent être utilisées à l'état frais ou desséché. Dans les cas appropriés, les matières premières utilisées à l'état frais peuvent être conservées congelées. Les matières premières d'origine végétale satisfont aux exigences de la monographie *Drogues végétales pour préparations homéopathiques (2045).*

Dans les cas justifiés et autorisés pour le transport ou le stockage, les matières premières d'origine végétale utilisées à l'état frais peuvent être conservées dans l'éthanol à 96 pour cent *V/V* ou dans de l'alcool de titre approprié, à condition que la totalité de la matière première et du solvant soit employée pour la fabrication.

Les matières premières satisfont aux exigences des monographies correspondantes de la Pharmacopée Européenne.

**Véhicules**

Les véhicules sont des excipients utilisés pour préparer certaines souches ou pour réaliser des déconcentrations. Il peut s'agir par exemple d'eau purifiée, d'alcool de titre approprié, de glycérol ou de lactose.

Les véhicules satisfont aux exigences des monographies correspondantes de la Pharmacopée Européenne.

**Souches**

Les souches sont des substances, produits ou préparations utilisés comme matières premières pour la fabrication des préparations homéopathiques. Dans le cas de matières premières d'origine végétale, animale ou humaine, il s'agit généralement d'une teinture mère ou d'un macérat glycériné ; dans le cas de matières premières d'origine chimique ou minérale, il s'agit généralement de la substance elle-même.

Les teintures mères satisfont aux exigences de la monographie *Teintures mères pour préparations homéopathiques (2029).*

Les macérats glycérinés sont des préparations liquides obtenues à partir de matières premières d'origine végétale, animale ou humaine par action du glycérol ou d'un mélange de glycérol et d'alcool de titre approprié ou de glycérol et d'une solution de chlorure de sodium de concentration appropriée.

**Déconcentration**

Les dilutions et triturations sont obtenues à partir des souches par déconcentration selon un procédé de fabrication homéopathique, c'est-à-dire par dilutions et dynamisations successives, ou par triturations appropriées successives, ou par une combinaison des 2 procédés.

Les opérations de déconcentration correspondent généralement à :

– 1 partie de souche et 9 parties de véhicule ; elles peuvent être désignées par « D », « DH » ou « X » (décimal),
– 1 partie de souche et 99 parties de véhicule ; elles peuvent être désignées par « C » ou « CH » (centésimal).

Le nombre d'opérations de déconcentration ainsi effectuées définit le degré de dilution (exemples : « D3 », « 3 DH » ou « 3X » signifie 3 déconcentrations décimales ; « C3 », « 3 CH » ou « 3C » signifie 3 déconcentrations centésimales).

Les dilution « LM » (ou « Q ») sont préparées selon une procédure spécifique.

**Formes pharmaceutiques**

Les formes pharmaceutiques des préparations homéopathiques satisfont à toute monographie correspondante de forme pharmaceutique de la Pharmacopée Européenne, avec les précisions suivantes :

– aux fins des formes pharmaceutiques pour usage homéopathique, les « substances actives » sont considérées comme étant les « dilutions ou triturations de souches homéopathiques »,
– ces formes pharmaceutiques sont préparées au moyen d'excipients appropriés,
– l'essai d'uniformité de teneur (*2.9.6*) ou l'essai d'uniformité des préparations unidoses (*2.9.40*) ne leur sont normalement pas applicables ; ils sont cependant exigés dans certains cas par l'Autorité compétente.

*Forme homéopathique « granule »*

Les granules pour usage homéopathique sont des préparations de consistance solide obtenues à partir de saccharose, de lactose ou d'autres excipients appropriés. Ils peuvent être préparés par imprégnation de granules préformés avec une ou plusieurs dilutions de souches homéopathiques ou par addition progressive de ces excipients, puis addition d'une (ou de) dilution(s) de souches homéopathiques. Ils sont destinés à l'administration par voie orale ou sublinguale.

*Forme homéopathique « comprimé »*

Les comprimés pour usage homéopathique sont des préparations solides fabriquées à partir de saccharose, de lactose ou d'autres excipients appropriés conformément aux spécifications de la monographie *Comprimés (0478)*. Ils peuvent soit être préparés par compression d'une ou plusieurs substances actives solides avec les excipients, ou par imprégnation de comprimés préformés avec une ou plusieurs dilutions de souches homéopathiques. Les comprimés préformés pour imprégnation sont fabriqués à partir de saccharose, de lactose ou d'autres excipients appropriés conformément aux spécifications de la monographie *Comprimés (0478)*. Ils sont destinés à être administrés par voie orale ou sublinguale.

*Méthodes de fabrication*

Les préparations homéopathiques sont produites par différentes méthodes et présentées sous diverses formes pharmaceutiques (couvertes par les monographies générales de formes pharmaceutiques). Les méthodes de préparation sont décrites dans la monographie *Méthodes de préparation des souches homéopathiques et déconcentration (2371)*. L'emploi de certaines préparations obtenues par les méthodes mentionnées ci-après est restreint à certaines formes pharmaceutiques, indiquées dans le tableau 1038.-1.

Tableau 1038.-1.

| Méthodes de préparation | Formes pharmaceutiques |
|---|---|
| 2.1.2 | Collyres<br>Solutions pour injection<br>Préparations nasales |
| 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3 | Collyres<br>Granules *(globuli velati)*<br>Solutions pour injection<br>Préparations nasales<br>Pommades, crèmes et gels<br>Poudres orales (triturations)<br>Suppositoires |
| 2.2.4 | Solutions pour injection |
| 3.1.2, 3.2.2 | Collyres<br>Granules *(globuli velati)*<br>Solutions pour injection<br>Préparations nasales<br>Pommades, crèmes et gels<br>Suppositoires |

**01/2008:2029**

# TEINTURES MÈRES POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

## Tincturae maternae ad praeparationes homoeopathicas

DÉFINITION

Les teintures mères pour préparations homéopathiques sont des préparations liquides, obtenues par l'action dissolvante d'un véhicule approprié sur des matières premières. Ces dernières sont généralement utilisées à l'état frais ou, parfois, sous forme desséchée. Elles peuvent également être obtenues à partir de sucs végétaux avec ou sans addition d'un véhicule. Pour certaines préparations, les matières à extraire peuvent subir un traitement préalable.

PRODUCTION

Les teintures mères pour préparations homéopathiques sont obtenues par macération, digestion, infusion, décoction, fermentation ou, comme décrit dans les monographies individuelles, en utilisant généralement de l'alcool de titre approprié.

Les teintures mères pour préparations homéopathiques sont obtenues en utilisant des proportions fixes de matières premières et de solvant, en tenant compte de la teneur en eau de la matière première, sauf exception justifiée et autorisée.

Lorsque des plantes fraîches sont utilisées, des procédés adéquats sont mis en oeuvre pour garantir la fraîcheur. Les autorités compétentes peuvent exiger que la fraîcheur soit démontrée par un essai approprié.

Les teintures mères pour préparations homéopathiques sont généralement limpides. Au repos, elles peuvent présenter un léger sédiment qui est acceptable à condition que la composition de la teinture n'en soit pas modifiée de manière significative.

Le procédé de fabrication est défini de sorte qu'il soit reproductible.

**Production par macération**. Sauf indication contraire, réduisez la drogue en morceaux de taille appropriée, mélangez soigneusement et procédez à l'extraction selon le procédé d'extraction prescrit, à l'aide du solvant d'extraction prescrit. Laissez reposer dans un flacon fermé pendant le temps prescrit.

La drogue épuisée est séparée du liquide extractif et, si nécessaire, pressée. Dans ce dernier cas, les 2 liquides obtenus sont réunis.

**Ajustement des constituants**. Si nécessaire, l'ajustement de la teneur en constituants peut être effectué, soit en ajoutant du solvant d'extraction d'un titre approprié, soit en ajoutant une autre teinture mère pour préparations homéopathiques obtenue à partir de la matière végétale ou animale utilisée pour la préparation.

IDENTIFICATION

Dans les cas appropriés, au moins 1 réaction d'identification par un procédé chromatographique est effectuée.

ESSAI

Les limites des monographies individuelles sont fixées de manière à tenir compte des méthodes de production officielles. Des limites spécifiques s'appliqueront pour chaque méthode de production donnée.

*Si l'essai de densité est réalisé, il n'est pas nécessaire de réaliser l'essai d'éthanol et vice versa.*

**Densité** (*2.2.5*). La teinture mère pour préparations homéopathiques satisfait aux limites prescrites dans la monographie.

**Ethanol** (*2.9.10*). La teneur en éthanol satisfait à la teneur prescrite dans la monographie.

**Méthanol et 2-propanol** (*2.9.11*) : au maximum 0,05 pour cent *V/V* de méthanol et au maximum 0,05 pour cent *V/V* de 2-propanol, sauf indication contraire.

**Résidu sec** (*2.8.16*). Dans les cas appropriés, la teinture mère pour préparations homéopathiques satisfait aux limites prescrites dans la monographie.

**Pesticides** (*2.8.13*). Dans les cas appropriés, la teinture mère pour préparations homéopathiques satisfait aux exigences de l'essai. Cette exigence est remplie s'il est démontré que la drogue végétale satisfait à cet essai.

DOSAGE

Dans les cas appropriés, un dosage est effectué et des limites sont fixées.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière. Une température maximale de conservation peut être indiquée.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– que le produit est une teinture mère pour préparations homéopathiques (désignée par les symboles « TM » ou « Ø »),

– le nom de la matière première, en utilisant le titre latin de l'éventuelle monographie de la Pharmacopée Européenne,

– la méthode de préparation,

– la teneur pour cent *V/V* en éthanol ou autre solvant de la teinture mère,

– le rapport entre la matière première et la teinture mère,

– dans les cas appropriés, les conditions de conservation.

**01/2008:2024**

# ABEILLE DOMESTIQUE POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

## Apis mellifera ad praeparationes homoeopathicas

DÉFINITION

Abeille ouvrière domestique vivante (*Apis mellifera* L.).

CARACTÈRES

Caractères décrits dans l'identification.

PRODUCTION

Si l'abeille domestique a été exposée à un traitement en vue de prévenir ou de traiter des maladies, des mesures appropriées sont prises afin de s'assurer que le taux des résidus est le plus faible possible.

IDENTIFICATION

Le corps d'une abeille domestique mesure environ 15 mm de longueur, il est noir, d'aspect soyeux et couvert de poils roux avec une nuance de gris. Les tibias sont larges et dépourvus d'épines. Les bords postérieurs des segments et les pattes ont une coloration brune virant progressivement vers une coloration rouge orangé. Les griffes sont paires, les palpes maxillaires sont composés d'un seul article. Sur les pattes arrières se situent des corbeilles couvertes de poils. Les ailes comprennent 3 cellules cubitales complètes et la cellule radiale est 2 fois plus longue que large. Les 3 cellules du bord inférieur et les 3 cellules médianes sont fermées. Un canal relie le dard barbelé au réservoir à venin.

## Teinture mère

La teinture mère satisfait aux exigences de la monographie générale *Teintures mères pour préparations homéopathiques (2029)*.

PRODUCTION

La teinture mère d'*Apis mellifera* L. est préparée par macération en utilisant de l'alcool de concentration appropriée.

CARACTÈRES

Liquide jaune pâle pouvant foncer lors de la conservation.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. La teinture mère à examiner.

*Solution témoin*. Dissolvez 12 mg d'*acide 4-aminobuta-noïque R*, 12 mg de *leucine R* et 12 mg de *proline R* dans 5 mL d'*eau R* et complétez à 50 mL avec de l'*alcool R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *eau R, éthanol R* (17:63 *V/V*).

*Dépôt* : 20 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez de la *solution de ninhydrine R* et chauffez à 100-105 °C pendant 10 min ; examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. D'autres bandes peuvent être présentes.

Préparations homéopathiques

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| ——— | ——— |
| | Une bande rose |
| Leucine : une bande rose | Une bande rose |
| | Une bande rose |
| | Une bande rose |
| ——— | ——— |
| Proline : une bande jaune orangé | Une bande jaune orangé |
| Acide 4-aminobutanoïque : une bande rose | Une bande rose |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,890 à 0,910.

**Ethanol** (*2.9.10*) : 60 pour cent *V/V* à 70 pour cent *V/V*.

**Résidu sec** (*2.8.16*) : au minimum 0,30 pour cent.

**01/2008:2023**

# AIL POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

## Allium sativum ad praeparationes homoeopathicas

DÉFINITION

Bulbe frais d'*Allium sativum* L.

CARACTÈRES

L'ail découpé dégage une odeur caractéristique.

IDENTIFICATION

Le bulbe, presque sphérique, mesure généralement 3 cm à 5 cm de large ; la base aplatie porte les restes de nombreuses racines adventives courtes de coloration brun-gris. Le bulbe est constitué d'environ 10 caïeux (gousses), grossièrement disposés en cercle autour d'un axe central. Les caïeux, observés individuellement, sont d'une longueur de 1 cm à 3 cm, comprimés latéralement et convexes du côté dorsal. Les caïeux ont une tunique résistante, blanche ou rougeâtre, enveloppant une feuille charnue tubulaire qui renferme un cône allongé, plus ou moins arrondi, composé de primordia foliaires et d'un apex végétatif.

ESSAI

**Eau** (*2.2.13*) : au minimum 55,0 pour cent, déterminé sur 10,0 g de drogue à examiner finement découpée, si l'essai est réalisé afin de démontrer la fraîcheur de la drogue.

## Teinture mère

La teinture mère satisfait aux exigences de la monographie générale *Teintures mères pour usage homéopathique (2029)*.

PRODUCTION

La teinture mère d'*Allium sativum* L. est préparée par macération de la drogue découpée en utilisant un alcool de concentration appropriée.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide jaune-brun.

La teinture mère à examiner présente une odeur aromatique particulière et désagréable.

IDENTIFICATION

A. A 2 mL de teinture mère à examiner, ajoutez 0,2 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R*. Il se développe un précipité blanc-jaune.

B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Extrayez 5 mL de teinture mère à examiner avec 2 fois 10 mL d'*éther R*. Réunissez les phases éthérées et séchez-les sur du *sulfate de sodium anhydre R*. Filtrez et évaporez le filtrat dans un bain-marie à basse température. Dissolvez le résidu dans 0,4 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg de *résorcinol R*, 10 mg de *thymol R* et 30 mg d'*acide gallique R* dans 10 mL de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, toluène R, éther isopropylique R* (10:40:50 *V/V/V*).

*Dépôt* : 40 µL de la solution à examiner et 10 µL de la solution témoin.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm et identifiez l'acide gallique. Pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R*, chauffez à 105-110 °C pendant 5-10 min, puis examinez à la lumière du jour dans les 10 min.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. D'autres bandes peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque | |
|---|---|
| | Une bande violet-rouge intense |
| Thymol : une bande rouge-orange | |
| | Une bande violet-rouge intense |
| | Une bande violette |
| | Une bande jaunâtre ou verdâtre |
| ——— | ——— |
| Résorcinol : une bande rouge-orange intense | |
| ——— | ——— |
| Acide gallique : une bande jaune | Une bande violette |
| (UV à 254 nm : une bande d'atténuation de fluorescence) | Une bande jaune-verdâtre |
| | Une bande violette peut être présente |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,885 à 0,960.

**Ethanol** (*2.9.10*) : 50 pour cent *V/V* à 70 pour cent *V/V*.

**Résidu sec** (*2.8.16*) : au minimum 4,0 pour cent.

CONSERVATION

En récipient étanche.

**01/2008:2094**
**corrigé 6.0**

# ANACARDIER D'ORIENT POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

## Semecarpus anacardium ad praeparationes homoeopathicas

### DÉFINITION

Fruit séché de *Semecarpus anacardium* L. (*Anacardium orientale* L.).

*Teneur* : au minimum 6,0 pour cent *m/m* de dérivés phénoliques totaux exprimés en eugénol ($C_{10}H_{12}O_2$ ; $M_r$ 164,2) (drogue desséchée).

### IDENTIFICATION

A. Le fruit séché de l'anacardier d'Orient est ovale, plus ou moins cordiforme. Il mesure environ 2 cm de long, près de 2 cm de large et 0,5 cm d'épaisseur. Sa surface est lisse, brillante, de couleur noirâtre. La section transversale montre un péricarpe assez développé, coriace et perforé d'assez larges lacunes renfermant un suc abondant brun-rouge, épais. Le péricarpe recouvre une amande blanche sous une pellicule rougeâtre. Le fruit peut comprendre le réceptacle cupulifère, charnu, fripé, de couleur noirâtre.

B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Ajoutez à 1,0 g de drogue convenablement divisée, 10 mL d'*éthanol à 90 pour cent V/V R*. Chauffez à reflux au bain-marie à 60 °C pendant 15 min. Laissez refroidir. Filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg d'*acide gallique R* et 5 mg d'*acide caféique R* dans du *méthanol R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *méthanol R, toluène R* (15:85 *V/V*).

*Dépôt* : 20 µL de solution à examiner et 10 µL de solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution contenant 10 g/L de *diphénylborate d'aminoéthanol R* et 50 g/L *macrogol 400 R* dans du *méthanol R*. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de plus faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande de fluorescence bleu-vert |
| ——— | ——— |
| | Plusieurs bandes de fluorescence bleu-violet |
| | Une bande de fluorescence jaune |
| Acide caféique : une bande de fluorescence bleu-violet | |
| ——— | ——— |
| Acide gallique : une bande de fluorescence bleu-violet | Une bande de fluorescence bleu-violet (acide gallique) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

### ESSAI

***Anacardium occidentale* L.** La drogue ne contient pas de fruits d'*Anacardium occidentale* L. Ces fruits mesurent jusqu'à 35 mm de long, 30 mm de large et 20 mm d'épaisseur ; ils sont brun clair et nettement réniformes. Le péricarpe est lisse à légèrement fripé et porte des marbrures sombres par endroit.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de drogue finement divisée.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 5,0 pour cent.

### DOSAGE

**Dérivés phénoliques totaux**. Spectrophotométrie d'absorption (*2.2.25*).

*Solution mère*. Introduisez 4,500 g de drogue broyée dans un ballon. Ajoutez 200 mL d'*éthanol à 90 pour cent V/V R*. Faites bouillir et maintenez à reflux au bain-marie pendant 4 h. Refroidissez le ballon. Transvasez quantitativement dans une fiole jaugée. Complétez à 250,0 mL avec de l'*éthanol à 90 pour cent V/V R*. Filtrez le liquide sur un papier filtre d'un diamètre de 125 mm. Eliminez les 50 premiers millilitres du filtrat. Prélevez 5,0 mL de filtrat et complétez à 50,0 mL avec de l'*éthanol à 90 pour cent V/V R*. Agitez. Prélevez 5,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec de l'*éthanol à 90 pour cent V/V R*. Agitez.

*Solution à examiner*. Prélevez 2,0 mL de solution mère, ajoutez 1,0 mL de *réactif phosphomolybdotungstique R* et 10 mL d'*eau R*, mélangez et complétez à 25,0 mL avec une solution de *carbonate de sodium R* à 290 g/L. Attendez exactement 3 min puis filtrez la solution sur un filtre en fibre de verre, de 1 µm d'ouverture de maille, en éliminant les 5 premiers millilitres.

*Solution témoin*. Dissolvez 80,0 mg d'*eugénol R* dans de l'*éthanol à 90 pour cent V/V R* et complétez à 250,0 mL avec le même solvant. Prélevez 5,0 mL de solution et complétez à 25,0 mL avec de l'*éthanol à 90 pour cent V/V R*. A 2,0 mL de cette solution, ajoutez 1,0 mL de *réactif phosphomolybdotungstique R* et 10 mL d'*eau R*, mélangez et complétez à 25,0 mL avec une solution de *carbonate de sodium R* à 290 g/L. Attendez exactement 3 min puis filtrez la solution sur un filtre en fibre de verre de 1 µm d'ouverture de maille en éliminant les 5 premiers millilitres.

Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner et de la solution témoin à 755 nm après 30 min en utilisant l'*eau R* comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent *m/m* en dérivés phénoliques totaux, exprimés en eugénol, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times 400}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = absorbance de la solution à examiner,

$A_2$ = absorbance de la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai de la drogue à examiner, en milligrammes,

$m_2$ = masse de la prise d'essai d'eugénol dans la solution témoin, en milligrammes.

## Teinture mère

La teinture mère satisfait aux exigences de la monographie générale *Teintures mères pour préparations homéopathiques (2029)*.

### DÉFINITION

La teinture mère d'anacardier d'Orient est préparée par macération en utilisant de l'éthanol de concentration appropriée, à partir du fruit séché de *Semecarpus anacardium* L. (*Anacardium orientale* L.).

*Teneur* : 0,5 pour cent *m/m* à 1,0 pour cent *m/m* de dérivés phénoliques totaux, exprimés en eugénol.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide brun-jaune ou brun-rouge.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*) selon les indications de l'identification B, de la drogue avec la modification suivante.

*Solution à examiner.* La teinture mère à examiner.

*Résultats* : voir identification B de la drogue.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,815 à 0,845.

**Ethanol** (*2.9.10*) : 85 pour cent *V/V* à 95 pour cent *V/V*.

**Résidu sec** (*2.8.16*) : au minimum 1,50 pour cent *m/m*.

DOSAGE

**Dérivés phénoliques totaux**. Spectrophotométrie d'absorption (*2.2.25*) selon les indications du dosage de la drogue à examiner avec les modifications suivantes.

*Solution mère.* Introduisez 8,000 g de teinture mère à examiner dans une fiole jaugée et complétez à 250,0 mL avec de l'*éthanol à 90 pour cent V/V R*. Prélevez 5,0 mL de cette solution et complétez à 20,0 mL avec de l'*éthanol à 90 pour cent V/V R*.

*Solution à examiner.* A 2,0 mL de solution mère, ajoutez 1,0 mL de *réactif phosphomolybdotungstique R* et 10 mL d'*eau R*, mélangez et complétez à 25,0 mL avec une solution de *carbonate de sodium R* à 290 g/L. Attendez exactement 3 min puis filtrez la solution sur un filtre en fibre de verre de 1 µm d'ouverture de maille en éliminant les 5 premiers millilitres.

*Solution témoin.* Dissolvez 80,0 mg d'*eugénol R* dans de l'*éthanol à 90 pour cent V/V R* et complétez à 250,0 mL avec le même solvant. Prélevez 5,0 mL de solution et complétez à 25,0 mL avec de l'*éthanol à 90 pour cent V/V R*. Prélevez 2,0 mL de cette solution, ajoutez 1,0 mL de *réactif phosphomolybdotungstique R* et 10 mL d'*eau R*, mélangez et complétez à 25,0 mL avec une solution de *carbonate de sodium R* à 290 g/L. Attendez exactement 3 min puis filtrez la solution sur un filtre en fibre de verre de 1 µm d'ouverture de maille en éliminant les 5 premiers millilitres.

Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) de la solution à examiner et de la solution témoin à 755 nm après 30 min en utilisant l'*eau R* comme liquide de compensation.

Calculez la teneur en pourcentage *m/m* en dérivés phénoliques totaux, exprimés en eugénol, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times 80}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = absorbance de la solution à examiner,

$A_2$ = absorbance de la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai de teinture mère à examiner, en milligrammes,

$m_2$ = masse de la prise d'essai d'eugénol dans la solution témoin, en milligrammes.

**01/2008:1599**

# ARSÉNIEUX (ANHYDRIDE) POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

## Arsenii trioxidum ad praeparationes homoeopathicas

$As_2O_3$ $M_r$ 197,8

[1327-53-3]

DÉFINITION

*Teneur* : 99,5 pour cent à 100,5 pour cent d'$As_2O_3$.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre blanche ou sensiblement blanche.

*Solubilité* : pratiquement insoluble à assez soluble dans l'eau. L'anhydride arsénieux se dissout dans les solutions d'hydroxydes et de carbonates alcalins.

IDENTIFICATION

A. Dissolvez 20 mg de substance à examiner dans 1 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*. Ajoutez 4 mL d'*eau R* et 0,1 mL de *solution de sulfure de sodium R*. Il se forme un précipité jaune soluble dans l'*ammoniaque diluée R1*.

B. Dissolvez 20 mg de substance à examiner dans 1 mL d'*acide chlorhydrique R1*, ajoutez 5 mL de *réactif hypophosphoreux R* et chauffez pendant 15 min au bain-marie. Il se forme un précipité noir.

ESSAI

**Aspect de la solution**. Une solution de substance à examiner à 100 g/L dans l'*ammoniaque diluée R1* est limpide (*2.2.1*) et incolore (*2.2.2, Procédé II*).

**Sulfures**. Dissolvez 1,0 g de substance à examiner dans 10,0 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R*. Ajoutez 0,05 mL de *solution d'acétate de plomb R*. Si la solution à examiner présente une coloration, celle-ci n'est pas plus intense que celle d'une solution témoin préparée simultanément et dans les mêmes conditions avec un mélange de 10,0 mL d'une solution de *sulfure de sodium R* à 0,015 g/L dans de la *solution diluée d'hydroxyde de sodium R* et de 0,05 mL de *solution d'acétate de plomb R* (20 ppm).

DOSAGE

Dissolvez 40,0 mg de substance à examiner dans un mélange de 10 mL d'*eau R* et de 10 mL de *solution diluée d'hydroxyde de sodium R*. Ajoutez 10 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et 3 g de *bicarbonate de sodium R*. Mélangez. Ajoutez 1 mL de *solution d'amidon R* et titrez par l'*iode 0,05 M*.

1 mL d'*iode 0,05 M* correspond à 4,946 mg d'$As_2O_3$.

**01/2008:2142**

# BARYUM (CHLORURE DE) DIHYDRATÉ POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

## Barii chloridum dihydricum ad praeparationes homoeopathicas

$BaCl_2,2H_2O$ $M_r$ 244,3

[10326-27-9]

DÉFINITION

*Teneur* : 99,0 pour cent à 101,0 pour cent de $BaCl_2,2H_2O$.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores.

*Solubilité* : facilement soluble dans l'eau, très peu soluble ou pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

IDENTIFICATION

A. Dissolvez 0,1 g de substance à examiner dans 1 mL d'*eau R*. Ajoutez 0,3 mL d'*acide sulfurique dilué R*. Il se forme un précipité blanc insoluble dans l'*acide chlorhydrique dilué R* et dans l'*acide nitrique dilué R*.

B. La substance à examiner donne la réaction (a) des chlorures (*2.3.1*).

ESSAI

**Solution S**. Dissolvez 10,0 g de substance à examiner dans de l'*eau R* et complétez à 100 mL avec le même solvant.

**Aspect de la solution**. La solution S est limpide (*2.2.1*) et incolore (*2.2.2, Procédé II*).

**Acidité ou alcalinité**. A 10 mL de solution S, ajoutez 0,1 mL de *solution de phénolphtaléine R*. Le virage de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,2 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M* ou d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*.

**Métaux lourds** (*2.4.8*) : au maximum 10 ppm.

12 mL de solution S satisfont à l'essai limite A. Préparez la solution témoin avec la *solution à 1 ppm de plomb (Pb) R*.

DOSAGE

Dissolvez 0,200 g de substance à examiner dans 100 mL d'*eau R*. Ajoutez 100 mL de *méthanol R*, 10 mL d'*ammoniaque concentrée R* et 2 mg de *pourpre de phtaléine R*. Titrez par l'*édétate de sodium 0,1 M* jusqu'à virage du violet à l'incolore.

1 mL d'*édétate de sodium 0,1 M* correspond à 24,43 mg de $BaCl_2,2H_2O$.

**01/2008:2143**
**corrigé 6.0**

# CADMIUM (SULFATE DE) HYDRATÉ POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

## Cadmii sulfas hydricus ad praeparationes homoeopathicas

$CdSO_4,8/3H_2O$ — $M_r$ 256,5

DÉFINITION

*Teneur* : 98,0 pour cent à 102,0 pour cent (substance anhydre).

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche.

*Solubilité* : facilement soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

IDENTIFICATION

A. La substance à examiner donne la réaction (a) des sulfates (*2.3.1*).

B. A 2 mL de solution S (voir Essai), ajoutez 2 mL de *solution de sulfure de sodium R*. Il se forme un précipité jaune.

ESSAI

**Solution S**. Dissolvez 5,0 g de substance à examiner dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R* et complétez à 50 mL avec le même solvant.

**Aspect de la solution**. La solution S est limpide (*2.2.1*) et incolore (*2.2.2, Procédé II*).

**Acidité ou alcalinité**. A 10 mL de solution S, ajoutez 0,3 mL de *solution de méthylorange R*. Le virage de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,5 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M* ou d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*.

**Nitrates** : au maximum 100 ppm.

Dissolvez 1,0 g de substance à examiner dans de l'*eau R* et complétez à 20,0 mL avec le même solvant. A 1,0 mL de cette solution, ajoutez 0,2 mL d'une solution d'*acide sulfanilique R* à 10 g/L dans l'*acide acétique R* et 0,2 mL d'une solution récemment préparée de *naphtylamine R* à 3 g/L dans l'*acide acétique R*. Ajoutez un grain de *zinc R*. Il apparaît une coloration rose dans les 5 min. Cette coloration n'est pas plus intense que celle obtenue avec un mélange, préparé simultanément, de 0,5 mL de *solution à 10 ppm de nitrate* ($NO_3$) *R* et de 0,5 mL d'*eau R*.

**Sulfate de zinc, sulfates de terres alcalines, sulfates de terres rares**. Dissolvez 1,0 g de substance à examiner dans 17 mL d'*eau R*. Ajoutez 0,5 mL d'*acide chlorhydrique R* et 1 g de *thioacétamide R*. Chauffez au bain-marie pendant 10 min. Complétez à 20,0 mL avec de l'*eau R* et filtrez. Evaporez à siccité à l'étuve 10,0 mL de cette solution. Calcinez le résidu à masse constante à environ 800 ± 50 °C. La masse du résidu est au maximum de 2 mg.

**Arsenic** (*2.4.2, Procédé A*) : au maximum 2 ppm, déterminé sur 5 mL de solution S.

**Eau** (*2.5.12*) : 16,0 pour cent à 20,0 pour cent, déterminé sur 80 mg de substance à examiner. Agitez pendant 10 min avant d'effectuer la détermination.

DOSAGE

Dissolvez 0,200 g de substance à examiner dans 50 mL d'*eau R*. Ajoutez 10 mL de *solution tampon chlorure d'ammonium pH 10,0 R* et 50 mg de *mélange composé au mordant noir 11 R1*. Titrez par l'*édétate de sodium 0,1 M* jusqu'à virage du rouge au vert.

1 mL d'*édétate de sodium 0,1 M* correspond à 20,85 mg de $CdSO_4$.

**01/2008:2144**

# CALCIUM (IODURE DE) TÉTRAHYDRATÉ POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

## Calcii iodidum tetrahydricum ad praeparationes homoeopathicas

$CaI_2,4H_2O$ — $M_r$ 366,0
[13640-62-5]

DÉFINITION

*Teneur* : 97,0 pour cent à 102,0 pour cent de $CaI_2$ (substance anhydre).

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre blanche ou sensiblement blanche, très hygroscopique.

*Solubilité* : très soluble ou facilement soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent.

IDENTIFICATION

A. La solution S (voir Essai) donne la réaction (a) du calcium (*2.3.1*).

B. La solution S (voir Essai) donne la réaction (b) des iodures (*2.3.1*).

ESSAI

**Solution S**. Dissolvez 10,0 g de substance à examiner dans de l'*eau distillée R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

**Aspect de la solution**. La solution S est limpide (*2.2.1*) et n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin $JV_5$ (*2.2.2, Procédé II*).

**Iode libre, iodates**. A 5 mL de solution S, ajoutez 2 mL de *chlorure de méthylène R*. Agitez et laissez reposer. La phase organique est incolore (*2.2.2, Procédé I*) (iode libre). Ajoutez 0,2 mL d'*acide sulfurique dilué R*. Agitez et laissez reposer. La phase organique reste incolore (*2.2.2, Procédé I*) (iodates).

**Sulfates** (*2.4.13*) : au maximum 150 ppm.

Prélevez 10 mL de solution S et complétez à 15 mL avec de l'*eau distillée R*.

**Fer** (*2.4.9*) : au maximum 10 ppm, déterminé sur 10 mL de solution S.

**Métaux lourds** (*2.4.8*) : au maximum 10 ppm.

12 mL de solution S satisfont à l'essai limite A. Préparez la solution témoin avec la *solution à 1 ppm de plomb (Pb) R*.

**Eau** (*2.5.12*) : 18,0 pour cent à 22,0 pour cent, déterminé sur 0,100 g de substance à examiner.

DOSAGE

Dissolvez 0,300 g de substance à examiner dans 50 mL d'*eau R*. Ajoutez 5 mL d'*acide nitrique dilué R* et 25,0 mL de *nitrate d'argent 0,1 M*. Agitez. Ajoutez 2 mL de *solution de sulfate ferrique et d'ammonium R2* et titrez par le *thiocyanate d'ammonium 0,1 M* jusqu'à obtention d'une couleur jaune rougeâtre.

1 mL de *nitrate d'argent 0,1 M* correspond à 14,70 mg de $CaI_2$.

CONSERVATION

En récipient étanche.

**01/2008:2146**
**corrigé 6.0**

# CUIVRE (ACÉTATE DE) MONOHYDRATÉ POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

## Cupri acetas monohydricus ad praeparationes homoeopathicas

$Cu(C_2H_3O_2)_2,H_2O$ $M_r$ 199,7
[6046-93-1]

DÉFINITION

*Teneur* : 99,0 pour cent à 101,0 pour cent de $Cu(C_2H_3O_2)_2,H_2O$.

CARACTÈRES

*Aspect* : cristaux bleu-vert ou poudre verte.

*Solubilité* : soluble dans l'eau, peu soluble ou très peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

IDENTIFICATION

A. La substance à examiner donne la réaction (a) des acétates (*2.3.1*).

B. Dissolvez 0,1 g de substance à examiner dans 10 mL d'*eau R* et ajoutez au goutte à goutte de l'*ammoniaque diluée R1*. Il apparaît une coloration bleu foncé.

ESSAI

**Solution S**. Dissolvez 3,0 g de substance à examiner dans un mélange de 40 mL d'*eau distillée R* et de 0,6 mL d'*acide acétique glacial R*, en chauffant à 70 °C. Refroidissez et complétez à 45 mL avec de l'*eau distillée R*.

**Aspect de la solution**. La solution S est limpide (*2.2.1*).

**Impuretés ne formant pas de précipité avec le sulfure d'hydrogène** : au maximum 0,1 pour cent, calculé en sulfates.

A 2,000 g de substance à examiner, ajoutez 92 mL d'*eau R* et 8,0 mL d'*acide sulfurique dilué R*. Chauffez à 70 °C. Faites passer un courant de *sulfure d'hydrogène R* jusqu'à l'arrêt de la précipitation de sulfure cuivrique. Laissez refroidir et reposer, puis filtrez. Evaporez à siccité 50,0 mL de filtrat dans un creuset. Calcinez le résidu à masse constante à environ 600 ± 50 °C.

**Chlorures** (*2.4.4*) : au maximum 50 ppm, déterminé sur 15 mL de solution S.

**Sulfates** (*2.4.13*) : au maximum 150 ppm, déterminé sur 15 mL de solution S.

**Fer** (*2.4.9*) : au maximum 20 ppm.

Dissolvez 0,500 g de substance à examiner dans 10 mL d'*eau R*. Transvasez dans une ampoule à décantation. Ajoutez 20 mL d'*acide chlorhydrique R1* et 10 mL de *méthylisobutylcétone R*. Agitez vigoureusement pendant 3 min. Laissez reposer. Transvasez la phase organique dans une deuxième ampoule à décantation et ajoutez 10 mL d'*eau R*. Agitez vigoureusement pendant 3 min. Laissez reposer. La phase aqueuse satisfait à l'essai limite du fer.

**Nickel** : au maximum 10 ppm.

Au résidu obtenu dans l'essai des impuretés ne formant pas de précipité avec le sulfure d'hydrogène, ajoutez 2,0 mL d'*acide chlorhydrique R* et 1,0 mL d'*acide sulfurique R*. Évaporez à siccité. Dissolvez le résidu dans un mélange de 3,0 mL d'*acide sulfurique dilué R* et de 17,0 mL d'*eau R*. A 4,0 mL de cette solution, ajoutez 4,0 mL d'*eau R*, 5,0 mL d'*eau de brome R*, 7,0 mL d'*ammoniaque diluée R1* et 3,0 mL d'une solution de *diméthylglyoxime R* à 10 g/L dans l'*éthanol à 90 pour cent V/V R*. Dans la minute suivante, la coloration de cette solution ne devient pas plus intense que celle d'une solution préparée comme suit : mélangez 4,0 mL d'une solution à 1 ppm de nickel (Ni) préparée à partir de la *solution à 10 ppm de nickel (Ni) R*, 4,0 mL d'*eau R* et 5,0 mL d'*eau de brome R* ; ajoutez prudemment 7,0 mL d'*ammoniaque diluée R1* et 3,0 mL d'une solution de *diméthylglyoxime R* à 10 g/L dans l'*éthanol à 90 pour cent V/V R*.

DOSAGE

Dissolvez 0,400 g de substance à examiner dans de l'*eau R* et complétez à 50 mL avec le même solvant. Ajoutez 6,0 mL d'*acide acétique glacial R*, 10,0 g d'*iodure de potassium R* et 1 mL de *solution d'amidon R*. Titrez par le *thiosulfate de sodium 0,1 M*.

1 mL de *thiosulfate de sodium 0,1 M* correspond à 19,97 mg de $Cu(C_2H_3O_2)_2,H_2O$.

**01/2008:1610**
**corrigé 7.0**

# CUIVRE POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

## Cuprum ad praeparationes homoeopathicas

Cu $A_r$ 63,5
[7440-50-8]

DÉFINITION

*Teneur* : 99,0 pour cent à 101,0 pour cent de Cu.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre brun-rouge.

*Solubilité* : pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'acide chlorhydrique et dans l'acide nitrique, pratiquement insoluble dans l'alcool.

IDENTIFICATION

A. A 2 mL de solution S (voir Essai), ajoutez 0,5 mL de *solution de ferrocyanure de potassium R*. Il se forme un précipité brun-rouge.

B. A 5 mL de solution S, ajoutez 0,6 mL d'*ammoniaque R*. Il se forme un précipité bleu. Ajoutez 2 mL d'*ammoniaque R*. Le précipité disparaît ; la solution obtenue est bleu intense.

ESSAI

**Solution S**. Dissolvez 2,0 g de substance à examiner dans 10 mL d'*acide nitrique R*. Après dégagement des vapeurs nitreuses, complétez à 60 mL avec de l'*eau distillée R*.

**Acidité ou alcalinité**. A 5,0 g de substance à examiner, ajoutez 20 mL d'*eau exempte de dioxyde de carbone R*. Chauffez à ébullition pendant 1 min. Refroidissez. Filtrez et complétez à 25,0 mL avec de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R*. A 10 mL de solution, ajoutez 0,1 mL de *solution de bleu de bromothymol R1*. Le virage de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,5 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M* ou d'*hydroxyde de sodium 0,01 M*.

**Chlorures** (*2.4.4*) : au maximum 100 ppm.

15 mL de solution S satisfont à l'essai limite des chlorures.

**Sulfates** (*2.4.13*) : au maximum 300 ppm.

15 mL de solution S satisfont à l'essai limite des sulfates.

**Fer** : au maximum 50 ppm.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 1,00 g de substance à examiner dans 5 mL d'*acide nitrique R* et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R*.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 20 ppm de fer (Fe) R*, diluée si nécessaire avec une solution d'*acide nitrique R* à 1 pour cent *V/V*.

*Source* : lampe à cathode creuse au fer.

*Longueur d'onde* : 248,3 nm.

*Flamme* : air-acétylène.

**Plomb** : au maximum 100 ppm.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner*. Utilisez la solution à examiner préparée pour l'essai du fer.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 0,1 pour cent de plomb (Pb) R*, diluée si nécessaire avec une solution d'*acide nitrique R* à 1 pour cent *V/V*.

*Source* : lampe à cathode creuse au plomb.

*Longueur d'onde* : 283,3 nm.

*Flamme* : air-acétylène.

**Zinc** : au maximum 50 ppm.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner*. Utilisez la solution à examiner préparée pour l'essai du fer.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 100 ppm de zinc (Zn) R*, diluée si nécessaire avec une solution d'*acide nitrique R* à 1 pour cent *V/V*.

*Source* : lampe à cathode creuse au zinc.

*Longueur d'onde* : 213,9 nm.

*Flamme* : air-acétylène.

DOSAGE

Dissolvez 0,100 g de substance à examiner dans 5 mL d'*acide nitrique R*. Chauffez pour chasser les vapeurs nitreuses. Ajoutez 200 mL d'*eau R* et neutralisez (*2.2.3*) avec de l'*ammoniaque diluée R1*. Ajoutez 1 g de *chlorure d'ammonium R* et 3 mg de *murexide R*. Titrez par l'*édétate de sodium 0,1 M* jusqu'à virage du vert au violet.

1 mL d'*édétate de sodium 0,1 M* correspond à 6,354 mg de Cu.

**01/2008:2026**
**corrigé 7.0**

# FER POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

## Ferrum ad praeparationes homoeopathicas

Fe $A_r$ 55,85

[7439-89-6]

DÉFINITION

Le fer pour préparations homéopathiques est obtenu par réduction ou sublimation sous forme d'une fine poudre gris-noir.

*Teneur* : 97,5 pour cent à 101,0 pour cent.

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre fine, gris-noir sans éclat métallique.

*Solubilité* : pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'alcool. La substance à examiner se dissout à chaud dans les acides minéraux dilués.

IDENTIFICATION

Dissolvez 50 mg de substance à examiner dans 2 mL d'*acide sulfurique dilué R* et complétez à 10 mL avec de l'*eau R*. La solution donne la réaction (a) du fer (*2.3.1*).

ESSAI

**Solution S**. A 10,0 g de substance à examiner, ajoutez 40 mL d'*eau R*. Chauffez à ébullition pendant 1 min. Refroidissez. Filtrez et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R*.

**Alcalinité**. A 10 mL de solution S, ajoutez 0,1 mL de *solution de bleu de bromothymol R1*. Le virage de l'indicateur au jaune ne nécessite pas plus de 0,1 mL d'*acide chlorhydrique 0,01 M*.

**Substances insolubles dans l'acide chlorhydrique**. Dissolvez 2,00 g de substance à examiner dans 40 mL d'*acide chlorhydrique R*. Chauffez au bain-marie. Dès la fin du dégagement gazeux, filtrez sur verre fritté (16) (*2.1.2*). Rincez à l'*eau R*. Séchez le résidu à l'étuve à 100-105 °C pendant 1 h. La masse du résidu est au maximum de 20 mg (1,0 pour cent).

**Substances solubles dans l'eau**. Evaporez au bain-marie 10,0 mL de solution S et desséchez à 100-105 °C pendant 1 h. La masse du résidu est au maximum de 2 mg (0,1 pour cent).

**Chlorures** (*2.4.4*) : au maximum 50 ppm.

Prélevez 5 mL de solution S et complétez à 15 mL avec de l'*eau R*. La solution satisfait à l'essai limite des chlorures.

**Sulfures et phosphures**. Mélangez soigneusement dans une fiole conique de 100 mL, 1,0 g de substance à examiner avec 10 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*. Les gaz dégagés ne provoquent pas, dans les 30 s, une coloration plus intense que le brun pâle du *papier à l'acétate de plomb R*, préalablement humidifié avec de l'*eau R*, placé sur l'ouverture de la fiole.

**Arsenic** (*2.4.2*) : au maximum 5 ppm.

Chauffez à ébullition, jusqu'à dissolution totale, 0,2 g de substance à examiner dans 25 mL d'*acide chlorhydrique dilué R*. La solution satisfait à l'essai limite A.

**Cuivre** : au maximum 50 ppm.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 1,00 g de substance à examiner dans un mélange de 60 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et de 10 mL de *solution diluée de peroxyde d'hydrogène R*. Evaporez jusqu'à un volume de 5 mL et complétez à 50,0 mL avec de l'*eau R*.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence à partir de la *solution à 0,1 pour cent de cuivre (Cu) R*, diluée si nécessaire avec une solution d'*acide chlorhydrique R* à 1 pour cent *V/V*.

*Source* : lampe à cathode creuse au cuivre.

*Longueur d'onde* : 324,8 nm.

*Flamme* : air-acétylène.

**Plomb** : au maximum 50 ppm.

Spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé I*).

*Solution à examiner*. Dans une ampoule à décantation, introduisez 20 mL de solution à examiner préparée pour l'essai du cuivre. Ajoutez 25 mL d'*acide chlorhydrique exempt de plomb R*. Agitez avec 3 fois 25 mL d'*éther isopropylique R*. Recueillez la phase aqueuse. Ajoutez 0,10 g de *sulfate de sodium décahydraté R*. Evaporez à siccité. Reprenez le résidu avec 1 mL d'*acide nitrique exempt de plomb R* et complétez à 20 mL avec de l'*eau R*.

*Solutions de référence*. Préparez les solutions de référence à partir d'une *solution à 0,1 pour cent de plomb (Pb) R*, diluée si nécessaire avec une solution d'*acide nitrique R* à 10 pour cent *V/V* et contenant 5 g/L de *sulfate de sodium décahydraté R*.

*Source* : lampe à cathode creuse au plomb.

*Longueur d'onde* : 217 nm.

*Flamme* : air-acétylène.

DOSAGE

Agitez 0,100 g de substance à examiner dans une fiole conique de 100 mL fermée par un bouchon rodé pendant 10 min avec une solution chaude contenant 1,25 g de *sulfate de cuivre R* dans 20 mL d'*eau R*. Filtrez rapidement et lavez le filtre. Réunissez le filtrat et les eaux de lavage, acidifiez par l'*acide sulfurique dilué R* et titrez par le *permanganate de potassium 0,02 M* jusqu'à obtention d'une coloration rose.

1 mL de *permanganate de potassium 0,02 M* correspond à 5,585 mg de Fe.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique si le fer pour préparation homéopathique a été obtenu par réduction ou sublimation.

**01/2008:2091**
**corrigé 6.0**

# JUSQUIAME NOIRE POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

## Hyoscyamus niger ad praeparationes homoeopathicas

DÉFINITION

Plante entière fleurie fraîche de *Hyoscyamus niger* L.

IDENTIFICATION

La jusquiame noire est une plante annuelle ou bisannuelle, à racine principale pivotante développée. La tige robuste, dressée, creuse et subcylindrique, peut atteindre 80 cm de hauteur. Les feuilles, molles, visqueuses, vert sombre mat, sont fortement pubescentes sur les 2 faces, en particulier le long des nervures. Les feuilles inférieures, pétiolées, sont disposées en rosette ; les feuilles inférieures caulinaires sont semi-amplexicaules et les feuilles supérieures sont totalement embrassantes. Le limbe dont la longueur peut atteindre 25 cm, est oblongue à ovale avec 2 à 5 lobes grossièrement dentés sur chaque côté. La nervure médiane est très développée. Les nervures secondaires font un angle prononcé avec la nervure médiane et se terminent au sommet des lobes. Les sommités fleuries sont fortement pubescentes et forment une grappe courte, très recourbée. Chaque fleur se développe à l'aisselle d'une grande bractée. Le calice gamosépale est recouvert de poils denses cotonneux et a 5 divisions ovales triangulaires, terminées chacune par une pointe courte qui devient épineuse. La corolle gamopétale, à 5 lobes très peu inégaux, est jaunâtre et délicatement veinée de brun à violet-noir. A la base des inflorescences, les fruits, parfois présents, sont des pyxides nettement renflés à leur base.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : si l'essai est exigé par l'Autorité compétente, au maximum 5 pour cent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : si l'essai est exigé par l'Autorité compétente, au minimum 50 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 5,0 g de drogue finement découpée.

***Hyoscyamus albus* L.** La présence de feuilles supérieures et médianes pétiolées et de fruits à peine renflés à leur base indique une falsification par *Hyoscyamus albus* L.

## Teinture mère

La teinture mère satisfait aux exigences de la monographie générale *Teintures mères pour préparations homéopathiques (2029)*.

PRODUCTION

La teinture mère d'*Hyoscyamus niger* L. est préparée par macération de la drogue en utilisant de l'éthanol de concentration appropriée.

*Teneur* : 0,002 pour cent *m/m* à 0,01 pour cent *m/m* d'alcaloïdes totaux, exprimés en hyoscyamine ($C_{17}H_{23}NO_3$ ; $M_r$ 289,4).

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide brun-vert foncé.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Evaporez dans un bain-marie à 40 °C, à pression réduite, 10 mL de teinture mère à examiner. Reprenez le résidu par 1 mL d'*ammoniaque R*, puis agitez à 2 reprises avec 10 mL d'*éther R*. Réunissez les phases éthérées, séchez sur du *sulfate de sodium anhydre R* et filtrez. Evaporez au bain-marie et dissolvez le résidu dans 0,50 mL de *méthanol R*.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 50 mg de *sulfate d'hyoscyamine R* dans 10 mL de *méthanol R* (solution A). Dissolvez 15 mg de *bromhydrate de scopolamine R* dans 10 mL de *méthanol R* (solution B). Mélangez 4 mL de solution A et 2 mL de solution B puis complétez à 10 mL avec du *méthanol R*.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 20 mg de *sulfate d'atropine R* dans du *méthanol R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *ammoniaque concentrée R, eau R, acétone R* (3:7:90 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C pendant 15 min.

*Détection A* : pulvérisez de la *solution diluée d'iodobismuthate de potassium R* jusqu'à apparition de bandes orangées. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats A* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins et la solution à examiner. D'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | | |
|---|---|---|
| Scopolamine : une bande orangée | | Une bande orangée (scopolamine) |
| _______ | _______ | _______ |
| Hyoscyamine : une bande orangée | Atropine : une bande orangée | Une bande orangée (hyoscyamine/atropine) |
| _______ | _______ | _______ |
| | | Bandes orangées de faible intensité (ligne de dépôt) |
| **Solution témoin (a)** | **Solution témoin (b)** | **Solution à examiner** |

*Détection B* : pulvérisez ensuite de la *solution de nitrite de sodium R* jusqu'à ce que le fond jaune disparaisse. Examinez à la lumière du jour après 15 min.

*Résultats B* : voir essai de l'atropine.

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,930 à 0,960.

**Atropine**. Examinez les chromatogrammes obtenus sous Identification.

*Résultats* : la bande due à l'hyoscyamine dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner passe de l'orange au brun-rouge mais pas au bleu-gris (atropine).

**Ethanol** (*2.9.10*) : 40 pour cent *V/V* à 50 pour cent *V/V*.

**Résidu sec** (*2.8.16*) : au minimum 1,2 pour cent.

DOSAGE

Evaporez, à basse température, sous pression réduite, 100,0 g de teinture mère à examiner jusqu'à obtention d'un résidu d'environ 10 g. Transvasez quantitativement le résidu dans une ampoule à décantation en utilisant quelques millilitres

d'*éthanol à 70 pour cent V/V R*. Ajoutez 5 mL d'*ammoniaque concentrée R* et 25 mL d'*eau R*. Extrayez par des fractions successives d'un mélange de 1 volume de *chloroforme R* et de 3 volumes d'*éther exempt de peroxydes R* jusqu'à extraction complète des alcaloïdes. Evaporez à siccité quelques millilitres de la dernière fraction organique. Reprenez le résidu par l'*acide sulfurique 0,25 M* et vérifiez l'absence d'alcaloïdes avec de la *solution de tétraiodomercurate de potassium R*. Réunissez les phases organiques et épuisez-les, à plusieurs reprises, par une solution d'*acide sulfurique 0,25 M*. Séparez les phases par centrifugation, si nécessaire, puis versez les fractions acides dans une deuxième ampoule à décantation. Alcalinisez les solutions acides par l'*ammoniaque R* et agitez avec au moins 3 fois 30 mL de *chloroforme R*. Réunissez les phases chloroformiques ; ajoutez 4 g de *sulfate de sodium anhydre R* et laissez en contact pendant 30 min en agitant de temps en temps. Recueillez la phase chloroformique et lavez le sulfate de sodium anhydre avec 3 fois 10 mL de *chloroforme R*. Réunissez les fractions chloroformiques, évaporez à siccité au bain-marie et desséchez à l'étuve à 100-105 °C pendant 15 min. Dissolvez le résidu dans quelques millilitres de *chloroforme R*, ajoutez 10,0 mL d'*acide sulfurique 0,005 M*. Eliminez le chloroforme par évaporation au bain-marie. Titrez l'excès d'acide par l'*hydroxyde de sodium 0,01 M* en présence d'*indicateur mixte au rouge de méthyle R*.

Calculez la teneur pour cent *m/m* en alcaloïdes totaux, exprimés en hyoscyamine, à l'aide de l'expression :

$$\frac{0,2894\,(10-n)}{m}$$

$n$ = nombre de millilitres d'*hydroxyde de sodium 0.01 M* utilisés,

$m$ = masse de la prise d'essai, en grammes.

**01/2008:2092**
**corrigé 6.8**

# LIERRE GRIMPANT POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

## Hedera helix ad praeparationes homoeopathicas

### DÉFINITION

Jeune rameau frais, pleinement développé mais pas encore lignifié d'*Hedera helix* L., récolté immédiatement avant ou en début de floraison.

### IDENTIFICATION

Les jeunes rameaux frais d'*Hedera helix* L. sont minces et flexibles, grimpants ; ils s'accrochent sur leur support par des crampons radiciformes. Les feuilles sont alternes, simples et pétiolées. Le pétiole présente une section cylindrique. La face supérieure des feuilles, glabre et luisante, est plus foncée que la face inférieure. Le limbe est ordinairement divisé en 3-5 lobes plus ou moins profonds, sur les rameaux stériles ; il est ovale, en pointe au sommet, sur les rameaux fertiles. Les inflorescences sont en corymbe simple, à contour semi-globuleux et groupées en grappes terminales. Les rayons de l'ombelle sont poilus, blanchâtres. Chaque fleur présente 5 petites dents formées par la partie supérieure des sépales et 5 pétales couverts de très petits poils renversés.

### ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : si l'essai est exigé par l'Autorité compétente, au maximum 5 pour cent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : si l'essai est exigé par l'Autorité compétente, au minimum 50 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h, sur 5,0 g de drogue finement découpée.

## Teinture mère

La teinture mère satisfait aux exigences de la monographie générale *Teintures mères pour préparations homéopathiques (2029)*.

### PRODUCTION

La teinture mère d'*Hedera helix* L. est préparée par macération en utilisant de l'éthanol de concentration appropriée.

*Teneur* : au minimum 0,15 pour cent *m/m* d'hédéracoside C ($C_{59}H_{96}O_{26}$ ; $M_r$ 1221).

### CARACTÈRES

*Aspect* : liquide brun-vert foncé.

### IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* La teinture mère à examiner.

*Solution témoin.* Dissolvez 1 mg d'*α-hédérine R* et 1 mg d'*hédéracoside C R* dans du *méthanol R* et complétez à 2 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, eau R, butanol R* (1:1:4 *V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL en bandes.

*Développement* : sur la moitié de la plaque.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution d'*acide sulfurique R* à 10 pour cent *V/V* dans le *méthanol R* et chauffez à 100-105 °C pendant 10 min. Examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. D'autres bandes de faible intensité peuvent également être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| α-Hédérine : une bande violette | Une bande violette (α-hédérine) |
| Hédéracoside C : une bande brune | Une bande brune (hédéracoside C) |
| _______ | Une bande brun-gris _______ |
| | Une bande jaune |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

### ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,890 à 0,925.

**Ethanol** (*2.9.10*) : 60 pour cent *V/V* à 70 pour cent *V/V*.

**Résidu sec** (*2.8.16*) : au minimum 2,0 pour cent.

### DOSAGE

Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Dans une fiole jaugée de 20,0 mL, introduisez 3,000 g de teinture mère à examiner et complétez à 20,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin.* Dans une fiole jaugée de 50,0 mL, dissolvez 20,0 mg d'*hédéracoside C R* dans la phase mobile et complétez à 50,0 mL avec la phase mobile.

*Colonne* :

– *dimensions* : $l$ = 0,25 m, Ø = 4 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : mélangez 35 volumes d'*eau R*, ajustée à pH 3 avec de l'*acide phosphorique R*, et 65 volumes de *méthanol R*.

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 205 nm.

*Injection* : 20 µL.

*Temps de rétention* : hédéracoside C = environ 8 min.

Calculez la teneur pour cent *m/m* en hédéracoside C à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times C \times 0,4}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$ = surface du pic dû à l'hédéracoside C dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_2$ = surface du pic dû à l'hédéracoside C dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,

$m_1$ = masse de la prise d'essai de la teinture mère dans la solution à examiner, en grammes,

$m_2$ = masse d'*hédéracoside C R* dans la solution témoin, en grammes,

$C$ = teneur pour cent de l'*hédéracoside C R*.

**01/2008:2028**
**corrigé 6.0**

# MILLEPERTUIS POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

## Hypericum perforatum ad praeparationes homoeopathicas

DÉFINITION

Plante fraîche entière d'*Hypericum perforatum* L., en début de floraison.

IDENTIFICATION

La plante vivace est constituée d'une racine fusiforme et d'un rhizome ramifié, qui donne naissance à de longues marcottes décombantes. La tige ligneuse à la base, est cylindrique et dressée ; elle mesure 0,2 m à 1 m de longueur ; elle est ramifiée dans sa partie supérieure et possède 2 côtes longitudinales saillantes.

Les feuilles, opposées, sessiles, non stipulées, ovalesoblongues, mesurent 15 mm à 30 mm de long. Elles présentent sur les bords des points glanduleux noirs et, sur toute la surface, de nombreuses petites poches sécrétrices, translucides, visibles par transparence.

Les fleurs sont régulières et réunies en grappes corymbiformes à l'extrémité de la tige. Elles comportent 5 sépales verts, lancéolés, aux apex acuminés, avec des poches sécrétrices noires à proximité des bords entiers ; 5 pétales jaune-orangé, beaucoup plus longs que les sépales, ne portant des poches sécrétrices noires qu'à proximité des bords terminaux ; 3 lames staminales, divisées chacune en un grand nombre d'étamines jaune-orangé et 3 carpelles surmontés de styles rouges. Chaque pétale est de forme ovale-linéaire asymétrique, un des bords est entier, l'autre est denté.

ESSAI

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 4 pour cent de fruits et au maximum 1 pour cent d'autres éléments étrangers.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : si l'essai est effectué afin de démontrer la fraîcheur de la drogue, au minimum 55 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 5,0 g de drogue finement découpée.

## Teinture mère

La teinture mère satisfait aux exigences de la monographie générale *Teintures mères pour préparations homéopathiques (2029).*

PRODUCTION

La teinture mère d'*Hypericum perforatum* L. est préparée par macération en utilisant de l'alcool de concentration appropriée.

CARACTÈRES

Liquide rouge sombre à rouge-brun.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner.* La teinture mère à examiner.

*Solution témoin.* Dissolvez 5 mg de *rutine R*, 1 mg d'*hypéricine R* et 5 mg d'*hypéroside R* dans du *méthanol R* et complétez à 5 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R.*

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, acétate d'éthyle R* (6:9:90 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL de solution à examiner et 5 µL de solution témoin, en bandes de 10 mm.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à 100-105 °C pendant 10 min.

*Détection* : pulvérisez une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R*, puis une solution de *macrogol 400 R* à 50 g/L dans le *méthanol R*. Après 30 min, examinez les plaques en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, la bande due à la rutine peut être de faible intensité voire absente. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente un ensemble de bandes, pouvant être bleues ou jaunes, de $R_F$ voisin de celui de la bande due à l'hyperoside dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin. D'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| | Une bande jaune à bleue |
| Hypéricine : une bande rouge | 2 bandes rouges |
| _______ | _______ |
| | Plusieurs bandes |
| _______ | _______ |
| Hypéroside : une bande jaune à orange | Des bandes bleues ou jaunes |
| Rutine : une bande jaune à orange | Une bande jaune à orange |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,900 à 0,920.

**Ethanol** (*2.9.10*) : 60 pour cent *V/V* à 75 pour cent *V/V*.

**Résidu sec** (*2.8.16*) : au minimum 1,3 pour cent.

**01/2008:2030**
**corrigé 6.0**

# ORTIE DIOÏQUE POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

## Urtica dioica ad praeparationes homoeopathicas

DÉFINITION

Plante entière fraîche *Urtica dioica* L. en cours de floraison.

CARACTÈRES

La plante entraîne une sensation de démangeaison et de brûlure sur la peau.

IDENTIFICATION

A. L'ortie dioïque est une plante vivace. La racine principale, pivotante, émet des tiges souterraines, rampantes, à section plus ou moins quadrangulaire, d'où partent des racines secondaires adventives et de très nombreuses radicules brunâtres et chevelues. La tige, dressée, généralement non ramifiée, mesure environ de 3-5 mm de diamètre et de 0,3-1,5 m de hauteur, voire dans certains cas, 2,5 m de hauteur. Elle est quadrangulaire, de coloration vert-gris, couverte de poils courts et de poils urticants.

   Les feuilles décussées mesurent de 30-150 mm de longueur et de 20-80 mm de largeur. Le pétiole est hispide et mesure généralement un peu moins d'un tiers de la longueur du limbe. Le limbe est ovale, acuminé, en coeur ou arrondi à la base et grossièrement dentelé ; la dent apicale est nettement plus large que les dents latérales. La face supérieure des feuilles est vert foncé et généralement mate, les 2 faces sont couvertes de poils courts serrés, mêlés à de longs poils urticants. Les 2 stipules sont linéaires-subulées et libres. Les inflorescences issues des aisselles des feuilles sont complexes, les fleurs sont unisexuées et sont généralement nettement plus longues que le pétiole, notamment chez les plantes mâles. Après la libération du pollen, les inflorescences mâles sont dressées selon un angle oblique ou à l'horizontale ; les inflorescences femelles pendent quand le fruit est mûr. Toutes les fleurs ont de longs pédoncules. Le périanthe des fleurs mâles est divisé à mi-hauteur en sépales verts, identiques, élargis à la base, avec des poils courts et des poils urticants sur les bords. Les étamines sont identiques et opposées aux sépales, chacune possède un long filament blanchâtre incurvé vers l'intérieur avant la libération du pollen et qui se redresse ensuite. L'ovaire est rudimentaire, en forme de bouton ou de coupe. Le périanthe des fleurs femelles est duveté ou poilu à l'extérieur, et constitué de segments extérieurs et de 2 segments intérieurs ; ces derniers sont 2 fois plus longs que les segments extérieurs. L'ovaire supère, ovale et uniloculaire est surmonté d'un large stigmate capité et en pinceau. Lors du mûrissement du fruit à une seule graine, les 2 segments internes du calice se replient tels des ailes sur le fruit.

B. L'ortie dioïque pour préparations homéopathiques satisfait à l'essai *Urtica urens* (voir Essai).

ESSAI

***Urtica urens***. Le bord du limbe des feuilles n'est pas découpé en dents de scie 2 fois plus longues que larges. Les grappes de fleurs, à l'aisselle des feuilles, ont une taille supérieure à celle du pétiole de la feuille. Les fleurs unisexuées, apétales, ne sont pas réunies sur un même plant et sur une même grappe.

**Eléments étrangers** (*2.8.2*) : au maximum 5 pour cent.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au minimum 65,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 5,0 g de drogue finement découpée, si l'essai est réalisé afin de démontrer la fraîcheur de la drogue.

## Teinture mère

La teinture mère satisfait aux exigences de la monographie générale *Teintures mères pour préparations homéopathiques (2029)*.

PRODUCTION

La teinture mère d'*Urtica dioica* L. est préparée par macération en utilisant de l'alcool de concentration appropriée.

CARACTÈRES

*Aspect* : liquide brun-vert ou brun-orange.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. La teinture mère à examiner.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg de *phénylalanine R* et 10 mg de *sérine R* dans un mélange à volumes égaux de *méthanol R* et d'*eau R* et complétez à 10 mL avec le même mélange de solvants.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide acétique glacial R, eau R, acétone R, butanol R* (10:20:35:35 *V/V/V/V*).

*Dépôt* : 20 µL, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : pulvérisez une solution de *ninhydrine R* à 1 g/L dans l'*alcool R*. Chauffez la plaque à 105-110 °C pendant 5-10 min, puis examinez à la lumière du jour dans les 10 min.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| _______ | _______ |
| Phénylalanine : une bande violette à brun-rouge | |
| | 4 bandes rouges à violettes |
| _______ | _______ |
| Sérine : une bande violet-rouge | Une bande violette |
| | Une bande violette |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

ESSAI

**Densité** (*2.2.5*) : 0,930 à 0,950.

**Ethanol** (*2.9.10*) : 40 pour cent *V/V* à 56 pour cent *V/V*.

**Méthanol** (*2.9.11*) : au maximum 0,10 pour cent *V/V*.

**Résidu sec** (*2.8.16*) : au minimum 1,1 pour cent.

**01/2008:1624**
**corrigé 6.0**

# SAFRAN POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

## Croci stigma ad praeparationes homoeopathicas

DÉFINITION

Stigmates séchés de *Crocus sativus* L., généralement joints par leur base à un style court.

CARACTÈRES

Odeur aromatique caractéristique.

IDENTIFICATION

A. Les stigmates, de couleur rouge orangé foncé, ont une longueur de 20 mm à 40 mm lorsqu'ils sont secs et de 35 mm à 50 mm environ après immersion dans l'eau. Les tubes, qui s'élargissent progressivement au sommet, présentent une incision sur l'un des côtés, et leur marge supérieure est ouverte et finement crénelée. Le style, qui porte 3 stigmates, est jaune pâle et sa longueur ne dépasse pas 5 mm.

B. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. Le safran présente des cellules épidermiques allongées, comportant souvent une courte papille centrale, qui libèrent dans l'eau une matière colorante jaune ; la marge supérieure des stigmates présente des papilles de forme digitée d'une longueur pouvant atteindre 150 µm ; entre les papilles apparaissent des grains de pollen simples, globuleux,

d'un diamètre de 100 µm environ, à exine finement ponctuée, à faisceaux vasculaires à petits vaisseaux spiralés, et sans fibres.

C. Ecrasez avec précaution des stigmates de safran afin d'obtenir des particules et humectez avec 0,2 mL de *solution d'acide phosphomolybdique R*. Les particules virent au bleu en 1-2 min, ou s'entourent d'une auréole bleue.

D. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Ecrasez avec précaution à l'aide d'une baguette de verre 0,1 g de safran, puis humectez avec 0,2 mL d'*eau R*. Après 3 min, ajoutez 5 mL de *méthanol R*, puis laissez reposer pendant 20 min à l'abri de la lumière et filtrez à travers un tampon de laine de verre.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *jaune naphtol R* dans 5 mL de *méthanol R* puis ajoutez une solution de 5 mg de *rouge Soudan G R* dans 5 mL de *chlorure de méthylène R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $F_{254}$ pour CCM R.*

*Phase mobile* : *eau R, 2-propanol R, acétate d'éthyle R* (10:25:65 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µL de solution à examiner et 5 µL de solution témoin, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Une bande rouge | |
| Une bande jaune | |
| | 2 bandes jaunes |
| | Une bande jaune intense (crocine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Une bande rouge | 1 ou 2 bandes d'atténuation de fluorescence |
| Une bande jaune | Une bande d'atténuation de fluorescence |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

*Détection* : pulvérisez de la *solution d'aldéhyde anisique R*. Examinez à la lumière du jour, en chauffant à 100-105 °C pendant 5-10 min.

*Résultats* : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

| **Haut de la plaque** | |
|---|---|
| Une bande rouge | 1 ou 2 bandes rouges à violet-rouge |
| Une bande bleue à vert-bleu | Une bande rouge à violet-rouge |
| | 2 bandes bleues à vert-bleu |
| | Une bande bleue à vert-bleu intense (crocine) |
| **Solution témoin** | **Solution à examiner** |

E. Diluez 0,1 mL de solution à examiner (voir Identification D) avec 1 mL de *méthanol R*. Déposez 0,1 mL de cette solution sur un filtre de papier, laissez sécher et pulvérisez une solution de *diphénylborate d'aminoéthanol R* à 10 g/L dans le *méthanol R*. Examinez en lumière ultraviolette à 365 nm. La tache présente une intense fluorescence jaune-orangé.

ESSAI

**Pouvoir colorant**. Dans une fiole jaugée de 5 mL, introduisez 0,10 g de safran et complétez à 5,0 mL avec de l'*eau distillée R*. Bouchez la fiole et agitez toutes les 30 min pendant 8 h, puis laissez reposer pendant 16 h. Prélevez 1,0 mL de solution et complétez à 500,0 mL avec de l'*eau distillée R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) à 440 nm, en utilisant de l'*eau distillée R* comme liquide de compensation. L'absorbance n'est pas inférieure à 0,44.

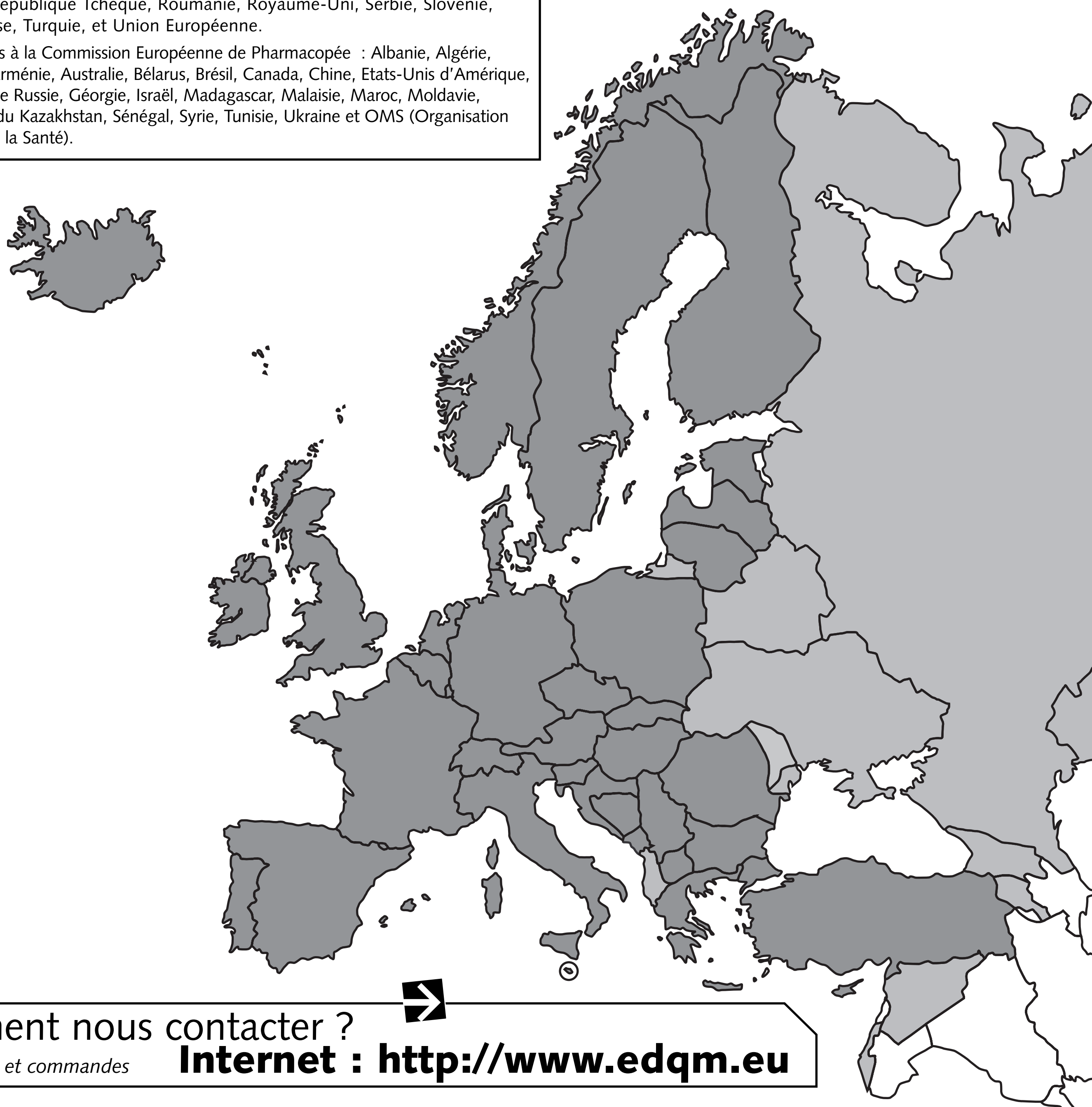
**Eléments étrangers**. Examinez la drogue au microscope. Elle ne présente ni éléments à parois irrégulières, ni cristaux, ni grains de pollen contenant 3 pores germinatifs.

**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 0,200 g de safran.

**Cendres totales** (*2.4.16*) : au maximum 7,0 pour cent, déterminé sur le résidu obtenu dans l'essai de perte à la dessiccation.

Membres de la Commission Européenne de Pharmacopée : Allemagne, Autriche, Belgique, Bosnie-Herzégovine, Bulgarie, Chypre, Croatie, Danemark, Espagne, Estonie, Finlande, France, Grèce, Hongrie, Irlande, Islande, Italie, Lettonie, « l'ex-République yougoslave de Macédoine », Lituanie, Luxembourg, Malte, Monténégro, Norvège, Pays-Bas, Pologne, Portugal, République Slovaque, République Tchèque, Roumanie, Royaume-Uni, Serbie, Slovénie, Suède, Suisse, Turquie, et Union Européenne.

Observateurs à la Commission Européenne de Pharmacopée : Albanie, Algérie, Argentine, Arménie, Australie, Bélarus, Brésil, Canada, Chine, Etats-Unis d'Amérique, Fédération de Russie, Géorgie, Israël, Madagascar, Malaisie, Maroc, Moldavie, République du Kazakhstan, Sénégal, Syrie, Tunisie, Ukraine et OMS (Organisation Mondiale de la Santé).



# Comment nous contacter ?

*Informations et commandes* **Internet : http://www.edqm.eu**

**Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé (DEQM)**
Conseil de l'Europe - 7 allée Kastner
CS 30026, F-67081 STRASBOURG, FRANCE
**Tél:** +33 (0)3 88 41 30 30
**Fax:** +33 (0)3 88 41 27 71

**Correspondance** ........ Via Helpdesk (http://www.edqm.eu/site/FAQ_Helpdesk-521.html)

**Commande**

Publications ........ https://www.edqm.eu/store
Etalons de référence ........ http://www.edqm.eu
Bon de commande en ligne ........ http://www.edqm.eu/site/EDQM_Reference_standards-649.html

Des informations complémentaires, notamment les réponses aux questions les plus fréquemment posées concernant les commandes, sont disponibles via Helpdesk.

**Tout autre sujet** ........ info@edqm.eu

*Tous les étalons de référence nécessaires à l'application des monographies peuvent être obtenus auprès de la DEQM.*
*Un catalogue des étalons de référence disponibles peut être consulté sur le site internet de la DEQM et imprimé directement.*
*La liste des étalons de référence les plus récents (nouveaux étalons de référence et nouveaux lots) est accessible sur le site internet http://crs.edqm.eu, en cliquant sur le lien «new».*

# PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 7e ÉDITION

## publiée le 15 juillet 2010

remplace la 6e Edition à date du 1er janvier 2011

Les tomes 1 et 2 de cet ouvrage 7.0 constituent la 7e Edition de la Pharmacopée Européenne. Ils seront complétés par des **suppléments non cumulatifs** qui doivent tous être conservés pendant la durée de la 7e Edition. 2 suppléments paraîtront en 2010 et 3 suppléments paraîtront chaque année en 2011 et 2012. Une liste cumulative des réactifs sera publiée dans les suppléments 7.4 et 7.7.

Pour des raisons réglementaires, la date officielle de publication d'un supplément de la Pharmacopée Européenne précède de 6 mois sa date de mise en application. Cependant, il se peut qu'en pratique un supplément soit disponible avant sa date officielle de publication. Veuillez noter que cette disponibilité anticipée ne modifie pas les dates officielles de publication et de mise en application.

Si vous utilisez la 7e Edition après le 1er avril 2011, assurez-vous que vous disposez de tous les suppléments parus et consultez l'index du dernier d'entre eux pour vérifier que vous vous référez aux versions les plus récentes des monographies et chapitres généraux.

Les **archives** de la Pharmacopée Européenne contiennent les 6 premières Editions en format PDF. Elles sont accessibles à tous les abonnés à la Pharmacopée Européenne ayant une souscription à jour (livre, internet ou clé USB) et un code EPID enregistré. Pour y accéder, veuillez enregistrer le code EPID figurant sur la 2e de couverture.

La page d'enregistrement est accessible sur le site internet de la DEQM à http://www.edqm.eu/register.

# PHARMACOPÉE EUROPÉENNE - VERSION ÉLECTRONIQUE

La 7e Edition est également disponible sous forme électronique (internet et clé USB) reprenant tous les textes, monographies et chapitres généraux, publiés dans la version imprimée. Elle fait l'objet d'une mise à jour cumulative à chaque publication d'un supplément.

En plus des textes officiels en anglais et en français, une version des textes en **espagnol** est disponible pour le confort des utilisateurs.

# PHARMEUROPA

## Forum de la Pharmacopée Européenne, à publication trimestrielle

Tous les projets de monographies (nouvelles ou révisées) sont publiés dans Pharmeuropa, ce qui permet à toutes les parties intéressées de commenter les spécifications proposées avant leur adoption. Pharmeuropa contient également des informations relatives au programme de travail et des articles d'intérêt général. L'abonnement à Pharmeuropa peut être souscrit auprès de la DEQM. Il comprend l'abonnement à Pharmeuropa Bio & Scientific Notes (articles scientifiques traitant de sujets en relation avec la pharmacopée). L'ensemble des numéros de Pharmeuropa publiés est aussi accessible en ligne, en tant que service complémentaire aux abonnés à la version imprimée de Pharmeuropa.

# HARMONISATION DES PHARMACOPÉES

Voir informations figurant dans le chapitre *5.8. Harmonisation des pharmacopées*.

# INTERNET

http://www.edqm.eu

http://www.edqm.eu/store (pour prix et commandes)

# HELPDESK

Pour poser une question ou contacter la DEQM, utiliser le système d'aide en ligne Helpdesk qui est accessible sur le site internet de la DEQM (consulter http://www.edqm.eu/site/FAQ_Helpdesk-261.html).

# KNOWLEDGE

Consulter la base de données gratuite Knowledge disponible sur http://www.edqm.eu pour obtenir des informations sur le programme de travail de la Pharmacopée Européenne, les numéros de Pharmeuropa et de suppléments dans lesquels un texte a été publié, des noms de marque de réactifs (notamment colonnes chromatographiques) utilisés lors de l'élaboration des monographies, l'historique des révisions d'un texte depuis sa publication dans la 5e Edition, les chromatogrammes représentatifs, la liste des étalons de référence utilisés et la liste des certificats de conformité délivrés.

# COMBISTATS

CombiStats est un logiciel dédié à l'analyse statistique des résultats de titrages biologiques, conformément au chapitre *5.3* de la 7e Edition de la Pharmacopée Européenne. Pour plus d'informations, consulter http://www.edqm.eu/combistats.

# CLÉ DES MONOGRAPHIES



*Date de version du texte* — **01/2008:0884**

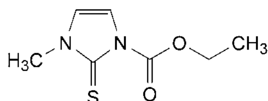
**corrigé 7.0**

*Numéro de référence du texte*

*Modification à prendre en compte dès la date de publication de l'ouvrage 7.0*

## CARBIMAZOL

## Carbimazolum




$C_7H_{10}N_2O_2S$ $M_r$ 186,2

*Numéro CAS* — [22232-54-8]

DÉFINITION

*Dénomination chimique selon les règles de nomenclature IUPAC* — 3-Méthyl-2-thioxo-2,3-dihydro-1*H*-imidazole-1-carboxylate d'éthyle.

*Teneur* : 98,0 pour cent à 102,0 pour cent (substance desséchée).

CARACTÈRES

*Aspect* : poudre cristalline, blanche ou blanc-jaune.

*Solubilité* : peu soluble dans l'eau, soluble dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 pour cent.

IDENTIFICATION

*L'application de la première et de la seconde identification est définie sous Prescriptions générales (chapitre 1)*

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A, C.*

A. Point de fusion (*2.2.14*) : 122 °C à 125 °C.

B. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*).

*Préparation* : pastilles.

*Comparaison* : *carbimazol SCR*.

*Etalon de référence disponible auprès de la DEQM (voir www.edqm.eu)*

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. Dissolvez 10 mg de carbimazol dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 10 mg de *carbimazol SCR* dans du chlorure de *méthylène R* et complétez à 10 mL avec le même solvant.

*Plaque* : *plaque au gel de silice $GF_{254}$ pour CCM R.*

*Réactif décrit au chapitre 4*

*Phase mobile* : *acétone R*, *chlorure de méthylène R* (20:80 *V/V*).

*Dépôt* : 10 µL.

*Développement* : sur un parcours de 15 cm.

*Informations complémentaires disponibles sur www.edqm.eu (KNOWLEDGE)*

*Séchage* : à l'air pendant 30 min.

*Détection* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats* : la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à sa position et ses dimensions à la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

*Référence à un chapitre général*

**Substances apparentées**. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

*Solution à examiner.* Dissolvez 5,0 mg de carbimazol dans 10,0 mL d'un mélange de 20 volumes d'*acétonitrile R* et de 80 volumes d'*eau R*. Utilisez cette solution dans les 5 min qui suivent sa préparation.

*Trait dans la marge indiquant la partie du texte qui a été modifiée (modification technique)*

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 5 mg de *thiamazol R* et 0,10 g de *carbimazol SCR* dans un mélange de 20 volumes d'*acétonitrile R* et de 80 volumes d'*eau R*, et complétez à 100,0 mL avec le même mélange de solvants. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec un mélange de 20 volumes d'*acétonitrile R* et de 80 volumes d'*eau R*.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 5,0 mg de *thiamazol R* dans un mélange de 20 volumes d'*acétonitrile R* et de 80 volumes d'*eau R*, et complétez à 10,0 mL avec le même mélange de solvants. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec un mélange de 20 volumes d'*acétonitrile R* et de 80 volumes d'*eau R*.

*Colonne* :

– *dimensions* : *l* = 0,15 m, Ø = 3,9 mm,
– *phase stationnaire* : *gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R* (5 µm).

*Phase mobile* : *acétonitrile R*, *eau R* (10:90 *V/V*).

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 254 nm.

*Injection* : 10 µL.

*Enregistrement* : 1,5 fois le temps de rétention du carbimazol.

*Temps de rétention* : carbimazol = environ 6 min.

*Conformité du système* : solution témoin (a) :

– *résolution* : au minimum 5,0 entre les pics dus à l'impureté A et au carbimazol.

*Limites* :

– *impureté A* : au maximum 0,5 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,5 pour cent),
– *impuretés non spécifiées* : pour chaque impureté, au maximum 0,1 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,10 pour cent).



**Perte à la dessiccation** (*2.2.32*) : au maximum 0,5 pour cent, déterminé dans un dessiccateur sur du *pentoxyde de diphosphore R* sous une pression ne dépassant pas 0,7 kPa pendant 24 h sur 1,000 g de carbimazol.

**Cendres sulfuriques** (*2.4.14*) : au maximum 0,1 pour cent, déterminé sur 1,0 g de carbimazol.

DOSAGE

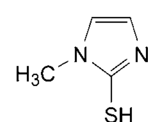
Dissolvez 50,0 mg de carbimazol dans de l'*eau R* et complétez à 500,0 mL avec le même solvant. Prélevez 10,0 mL de solution, ajoutez 10 mL d'*acide chlorhydrique dilué R* et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Mesurez l'absorbance (*2.2.25*) au maximum d'absorption à 291 nm.

Calculez la teneur en $C_7H_{10}N_2O_2S$ en prenant 557 comme valeur de l'absorbance spécifique.

IMPURETÉS

*Impuretés spécifiées : A.*

*Autres impuretés décelables* (si elles sont présentes à une teneur suffisante, les substances suivantes seront détectées par l'un des essais de la monographie. Elles sont limitées par le critère général d'acceptation applicable aux autres impuretés ou impuretés non spécifiées, ou par les dispositions de la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)*. Il n'est donc pas nécessaire de les identifier pour démontrer la conformité de la substance. Voir également chapitre *5.10. Contrôle des impuretés dans les substances pour usage pharmaceutique*) : *B.*




A. 1-méthyl-1*H*-imidazole-2-thiol (thiamazol),

*INFORMATIONS IMPORTANTES*

# MONOGRAPHIES GÉNÉRALES

La Pharmacopée Européenne contient un certain nombre de monographies générales couvrant des classes de produits. Ces monographies générales renferment des exigences qui sont applicables à tous les produits de la classe donnée ou, dans certains cas, à tout produit de la classe donnée pour lequel existe une monographie spécifique dans la Pharmacopée (voir *1. Prescriptions générales*, Monographies générales). Si aucune restriction concernant la portée d'une monographie générale n'est fournie en préambule, elle est applicable à tous les produits de la classe définie, que le produit fasse ou non l'objet d'une monographie spécifique dans la Pharmacopée.

A chaque utilisation d'une monographie, il est essentiel de vérifier s'il existe une monographie générale applicable au produit en question. Les monographies générales présentées ci-après sont publiées dans la section Monographies générales (sauf indication contraire). Cette liste est mise à jour, si nécessaire, et republiée dans chaque supplément.

ADN recombinant (produits obtenus par la méthode dite de l') (0784)

Anticorps monoclonaux pour usage humain (2031)

Drogues végétales (1433)

Drogues végétales pour préparations homéopathiques (2045)
*(publiée dans la section Préparations homéopathiques)*

Extraits (0765)

Formes pharmaceutiques
*(publiées dans la section Formes pharmaceutiques)*

Huiles essentielles (2098)

Huiles grasses végétales (1579)

Immunosérums d'origine animale pour usage humain (0084)

Immunosérums pour usage vétérinaire (0030)

Méthodes de préparation des souches homéopathiques et déconcentration (2371)
*(publiée dans la section Préparations homéopathiques)*

Plantes pour tisanes (1435)

Préparations à base de drogues végétales (1434)

Préparations homéopathiques (1038)
*(publiée dans la section Préparations homéopathiques)*

Préparations radiopharmaceutiques (0125)

Produits allergènes (1063)

Produits comportant un risque de transmission d'agents d'encéphalopathies spongiformes animales (1483)

Produits de fermentation (1468)

Substances pour usage pharmaceutique (2034)

Teintures mères pour préparations homéopathiques (2029)
*(publiée dans la section Préparations homéopathiques)*

Vaccins pour usage humain (0153)

Vaccins pour usage vétérinaire (0062)